



**HAL**  
open science

# Analyse comparative des mécanismes pathogéniques et protecteurs au cours de la fièvre de Lassa chez le singe cynomolgus

Jimmy Hortion

► **To cite this version:**

Jimmy Hortion. Analyse comparative des mécanismes pathogéniques et protecteurs au cours de la fièvre de Lassa chez le singe cynomolgus. Microbiologie et Parasitologie. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2022. Français. NNT : 2022ENSL0058 . tel-04839396

**HAL Id: tel-04839396**

**<https://theses.hal.science/tel-04839396v1>**

Submitted on 16 Dec 2024

**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.



Numéro National de Thèse : 2022ENSL0058

## **THESE**

en vue de l'obtention du grade de Docteur, délivré par  
**L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON**

**Ecole Doctorale N° 340**  
**Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire**

**Discipline** : Sciences de la vie et de la santé

Soutenue publiquement le 15/12/2022, par :

**Jimmy HORTION**

---

# **Analyse comparative des mécanismes pathogéniques et protecteurs au cours de la fièvre de Lassa chez le singe cynomolgus**

---

Devant le jury composé de :

Anne-Sophie BEIGNON, Directrice de Recherche, CNRS/CEA  
Julien POMPON, Chargé de Recherche/HDR, IRD  
Branka HORVAT, Directrice de Recherche, INSERM  
Antoine GESSAIN, Professeur des universités, Institut Pasteur  
Viktor VOLCHKOV, Professeur des universités, UCBL

Rapporteuse  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examinateur  
Examinateur

Sylvain BAIZE, Directeur de Recherche, Institut Pasteur

Directeur de thèse



La fièvre de Lassa (FL) est une fièvre hémorragique causée par le virus Lassa (LASV), elle est endémique d'Afrique de l'ouest et est responsable de la mort de quelques milliers de personnes par an. Les mécanismes pathogéniques de la FL restent encore largement non élucidés, bien que l'implication forte du système immunitaire dans la pathologie soit aujourd'hui admise. Grâce à nos modèles de FL létale et non létale chez le singe cynomolgus induites par deux souches proches de LASV, nous avons comparé les cibles et la dynamique d'expansion virales, les réponses des acteurs cellulaires majeurs de l'immunité, et enfin les modifications fonctionnelles et l'inflammation dans les organes non lymphoïdes. Nous avons pu identifier que dans le cas de la FL non létale, l'infection se limite aux macrophages et aux monocytes et reste ainsi cantonnée aux organes lymphoïdes et au sang, tandis que la souche létale de LASV infecte les cellules endothéliales dans tous les organes observés et se diffuse massivement dans les hépatocytes et les cellules surrénaliennes. Nous avons aussi identifié la mise en place d'une réponse T spécifique chez les singes survivants, totalement absente chez les singes décédés, une association entre la survie et la fonction des NK lors de la phase aiguë et des indices de présentation antigénique dysfonctionnelle dans la zone marginale splénique des singes décédés grâce à la technique de microdissection. Enfin, nous avons caractérisé l'inflammation dans le foie, le poumon et le rein grâce à la déconvolution du transcriptome et montré la proximité pathologique forte de la FL létale avec le sepsis dans tous les organes observés, et avec le COVID-19 dans le poumon.

**Mots-clés :** Arénavirus, fièvre hémorragique virale, virus Lassa, pathogénèse, primate non humain

## Comparative analysis of pathogenic and protective mechanisms occurring during the course of Lassa fever in cynomolgus monkeys

Lassa fever (LF) is a hemorrhagic fever caused by Lassa virus (LASV) which is endemic to West Africa and is responsible for several thousands of deaths each year. The pathogenic mechanisms of LF remain poorly characterized although the central implication of the immune system is now widely acknowledged. Using our models of lethal and non-lethal LF caused by two closely related strains of LASV in the cynomolgus monkey, we compared the viral targets and spreading dynamics, the responses of the key cellular actors of the immunity and finally the functional changes and inflammatory processes that occur in non-lymphoid organs. We identified that non-lethal LF is associated with an infection limited to the macrophages and monocytes and restricted to the lymphoid organs and the blood, whereas the lethal strain of LASV widely infects endothelial cells in all the investigated organs and spreads massively to the hepatocytes and the adrenal cells. We also detected the implementation of a specific T-response in surviving monkeys which is absent in deceased monkeys, we correlated survival with the effective functioning of NK cells response during the acute phase and found hints of a dysfunctional antigen presentation in the splenic marginal zone of deceased monkeys thanks to a microdissection technique. Finally, we characterized inflammation in the liver, the lung and the kidney by using transcriptome deconvolution and showed the strong pathologic similarity between lethal LF and sepsis in all investigated organs and between LF and COVID-19 in the lung.

**Key words:** Arenaviruses, viral hemorrhagic fever, Lassa virus, pathogenesis, non-human primate



# Table des matières

---

<b>Introduction</b> .....	- 17 -
<b>1. Epidémiologie du virus Lassa et des <i>Arenaviridae</i></b> .....	- 17 -
<b>1.A. La famille des <i>Arenaviridae</i> : phylogénie, évolution, répartition géographique</b> .....	- 17 -
1.A.i. <i>Phylogénie des Arenaviridae</i> .....	- 17 -
1.A.ii. <i>Evolution des Arenaviridae</i> .....	- 18 -
1.A.iii. <i>Les Mammarenavirus, agents responsables de fièvres hémorragiques</i> .....	- 20 -
1.A.iv. <i>Répartition mondiale des Mammarenavirus</i> .....	- 21 -
<b>1.B. Le virus Lassa, épidémiologie et impact sanitaire</b> .....	- 22 -
1.B.i. <i>Incidence et impact sanitaire</i> .....	- 22 -
1.B.ii. <i>Facteurs de risques</i> .....	- 23 -
1.B.iii. <i>Réservoir et transmission</i> .....	- 24 -
1.B.iv. <i>Phylogénétique du virus Lassa</i> .....	- 27 -
<b>2. Génome, structure et cycle de réplication du virus Lassa</b> .....	- 29 -
<b>2.A. Génome et structure du virus Lassa</b> .....	- 29 -
<b>2.B. Présentation structuro-fonctionnelle des protéines virales</b> .....	- 30 -
2.B.i. <i>La nucléoprotéine NP</i> .....	- 30 -
2.B.ii. <i>La glycoprotéine GP</i> .....	- 32 -
2.B.iii. <i>La polymérase L</i> .....	- 34 -
2.B.iv. <i>La protéine de matrice Z</i> .....	- 34 -
<b>2.C. Le cycle viral de LASV</b> .....	- 36 -
2.C.i. <i>L'entrée virale</i> .....	- 37 -
2.C.ii. <i>Synthèse protéique et réplication du génome viral</i> .....	- 39 -
2.C.iii. <i>Assemblage et bourgeonnement des particules virales</i> .....	- 39 -
<b>3. La pathogenèse de la fièvre de Lassa et la réponse immunitaire de l'hôte</b> .....	- 40 -
<b>3.A. Les données cliniques de la FL</b> .....	- 40 -
3.A.i. <i>Manifestations cliniques de la FL</i> .....	- 40 -

3.A.ii.	<i>Les corrélats de sévérité observés.....</i>	- 41 -
3.A.iii.	<i>Analyse pathologique des tissus lors de l'issue fatale .....</i>	- 42 -
<b>3.B.</b>	<b>Les modèles animaux d'études des Arénavirus.....</b>	- 46 -
3.B.i.	<i>Les modèles murins.....</i>	- 47 -
3.B.ii.	<i>Les modèles cobayes.....</i>	- 48 -
3.B.iii.	<i>Les modèles de PNH.....</i>	- 49 -
<b>3.C.</b>	<b>Modèle de physiopathogenèse de la FL.....</b>	- 50 -
<b>3.D.</b>	<b>Les réponses immunitaires à l'œuvre lors de l'infection .....</b>	- 51 -
3.D.i.	<i>La réponse innée.....</i>	- 52 -
3.D.ii.	<i>La réponse adaptative .....</i>	- 56 -
3.D.iii.	<i>L'évasion du système immunitaire par LASV.....</i>	- 58 -
<b>4.</b>	<b>Prophylaxie et thérapies curatives pour lutter contre la FL.....</b>	- 60 -
<b>4.A.</b>	<b>Traitements.....</b>	- 60 -
4.A.i.	<i>Ribavirine.....</i>	- 60 -
4.A.ii.	<i>Favipiravir .....</i>	- 61 -
4.A.iii.	<i>Transfert de plasma de convalescents et anticorps monoclonaux.....</i>	- 61 -
<b>4.B.</b>	<b>Approches vaccinales contre LASV .....</b>	- 62 -
	<b>Problématique et objectifs.....</b>	- 64 -
	<b>Résultats.....</b>	- 65 -
<b>1.</b>	<b>Dynamique comparative des infections par LASV AV et Josiah, caractérisation des cellules cibles de l'infection et nature de l'inflammation systémique .....</b>	- 67 -
<b>1.A.</b>	<b>Dynamique d'infection lors de l'infection par LASV AV et Josiah.....</b>	- 67 -
1.A.i.	<i>Détection précoce de l'infection dans les OLS.....</i>	- 67 -
1.A.ii.	<i>Progression et dissémination virale au cours de la phase aiguë et pathologique .....</i>	- 68 -
<b>1.B.</b>	<b>Caractérisation des premières populations cellulaires cibles dans les OLS .....</b>	- 77 -
<b>1.C.</b>	<b>Confirmation des cibles cellulaires non lymphoïdes.....</b>	- 82 -
1.C.i.	<i>Les cibles hépatiques de LASV et l'inflammation du foie.....</i>	- 82 -
1.C.ii.	<i>Les cibles pulmonaires de LASV et l'inflammation du poumon.....</i>	- 85 -
1.C.iii.	<i>Les cibles rénales de LASV et l'inflammation du rein.....</i>	- 85 -



1.C.iv.	<i>Les cibles encéphaliques de LASV et l'inflammation du cerveau</i> .....	88 -
1.D.	<b>Quantification et dynamique des infiltrations de cellules immunitaires dans les organes</b> .....	89 -
2.	<b>Evaluation comparative des réponses cellulaires spécifiques lors des infections létales et non létales, dans le sang et les organes lymphoïdes</b> .....	92 -
2.A.	<b>Etude comparative et dynamique de la composition cellulaire des PBMC et des OLS au cours de l'infection, grâce à la technique de déconvolution du transcriptome</b> .....	92 -
2.A.i.	<i>Choix de la signature et de la méthode de déconvolution</i> .....	92 -
2.A.ii.	<i>Evaluation de la dynamique de la réponse immunitaire des PBMC grâce à la méthode de déconvolution du transcriptome</i> .....	95 -
2.A.iii.	<i>Evaluation de la dynamique de la réponse immunitaire des OLS grâce à la méthode de déconvolution du transcriptome</i> .....	96 -
2.B.	<b>Mise en évidence d'une réponse T effectrice protectrice dans les PBMC et les OLS des singes survivants</b> .....	100 -
2.B.i.	<i>Mise en évidence d'une réponse T spécifique protectrice dans les PBMC</i> ....	101 -
2.B.ii.	<i>Mise en évidence d'une réponse T spécifique tardive dans les OLS</i> .....	103 -
2.C.	<b>Mise en place d'une réponse mémoire des LB et d'une différenciation en plasmocytes</b> .....	104 -
2.C.i.	<i>Evolution des populations de <math>LB_{mém}</math> dans les PBMC au cours de l'infection</i> -	105 -
2.C.ii.	<i>Evolution des populations de <math>LB_{mém}</math> dans les OLS au cours de l'infection</i> ....	106 -
2.D.	<b>Rôle et activation des cellules NK au cours de l'infection par LASV</b> .....	107 -
2.D.i.	<i>Le comportement des cellules NK dans les PBMC lors de l'infection par LASV</i> .....	107 -
2.D.ii.	<i>Activité des cellules NK dans les OLS lors de l'infection par LASV</i> .....	108 -
2.E.	<b>Analyse comparative du transcriptome de la zone marginale splénique prélevé <i>in situ</i> par microdissection par capture laser</b> .....	109 -
2.E.i.	<i>Présentation et test de la technique de microdissection par capture laser</i> ....	110 -
2.E.ii.	<i>Analyse transcriptomique différentielle des ZMS lors de la phase aiguë de la FL</i> .....	111 -
3.	<b>Caractérisation de la pathologie induite par LASV dans les organes non lymphoïdes essentiels</b> .....	115 -

<b>3.A.</b>	<b>Identification des changements fonctionnels et caractérisation de l'inflammation dans les organes clés de la pathologie grâce à la déconvolution du transcriptome</b> .....	- 115 -
3.A.i.	<i>Evolution de la composition cellulaire hépatique lors de la FL</i> .....	- 115 -
3.A.ii.	<i>Evolution de la composition cellulaire pulmonaire lors de la FL</i> .....	- 117 -
3.A.iii.	<i>Evolution de la composition cellulaire rénale lors de la FL</i> .....	- 120 -
<b>3.B.</b>	<b>Analyse différentielle de l'expression génique dans les organes clés de la pathologie de la FL</b> .....	- 122 -
3.B.i.	<i>Etude comparative des états transcriptomiques des hépatocytes par MCL-ARNseq</i> .....	- 122 -
3.B.ii.	<i>Analyse différentielle de l'expression génique dans le poumon</i> .....	- 127 -
3.B.iii.	<i>Analyse différentielle de l'expression génique dans le rein</i> .....	- 131 -
3.B.iv.	<i>Analyse différentielle de l'expression génique dans les glandes surrénales</i> ....	- 134 -
<b>3.C.</b>	<b>Comparaison des syndromes observés dans les organes des singes infectés par LASV avec des pathologies cliniquement décrites</b> .....	- 137 -
3.C.i.	<i>La pathologie pulmonaire</i> .....	- 137 -
3.C.ii.	<i>La pathologie rénale</i> .....	- 142 -
3.C.iii.	<i>La pathologie surrénalienne</i> .....	- 143 -
	<b>Discussion et perspectives</b> .....	- 147 -
<b>1.</b>	<b>Cibles virales précoces, dissémination et tropisme tardif</b> .....	- 147 -
1.A.	<b>Cibles précoces de l'infection et colonisation des OLS</b> .....	- 147 -
1.B.	<b>Dissémination systémique</b> .....	- 149 -
1.B.i.	<i>Hypothèse de dissémination via les monocytes</i> .....	- 149 -
1.B.ii.	<i>Hypothèse de dissémination par perméabilité vasculaire</i> .....	- 151 -
1.B.iii.	<i>Bilan sur les mécanismes de dissémination</i> .....	- 153 -
1.C.	<b>Cibles tardives de l'infection par LASV</b> .....	- 153 -
<b>2.</b>	<b>Réponses immunitaires protectrices et délétères</b> .....	- 155 -
2.A.	<b>La réponse T protectrice</b> .....	- 155 -
2.B.	<b>La réponse des cellules NK</b> .....	- 156 -
2.C.	<b>La réponse des cellules myéloïdes</b> .....	- 157 -
<b>3.</b>	<b>Caractérisation de la pathologie dans les organes systémiques</b> .....	- 158 -

3.A.	Caractérisation de l'inflammation .....	158 -
3.B.	Synthèse des phénomènes pathologiques observés.....	159 -
Matériels et méthodes .....		161 -
1.	Expérimentations animales : infection, suivi biologique et prélèvements....	161 -
1.A.	Infection .....	161 -
1.B.	Suivi biologique .....	161 -
1.C.	Prélèvements biologiques .....	161 -
1.C.i.	<i>Prélèvements lors du suivi</i> .....	161 -
1.C.ii.	<i>Prélèvements à l'autopsie</i> .....	162 -
2.	Caractérisation des réponses immunitaires cellulaires.....	162 -
2.A.	Stimulation avec les peptides viraux .....	162 -
2.B.	Marquages de cytométrie en flux .....	163 -
3.	Histologie.....	163 -
3.A.	Préparation des échantillons.....	163 -
3.B.	Immunomarquages en multiplex.....	164 -
3.C.	Hybridation <i>in situ</i> .....	164 -
3.D.	Immunohistochimie pour la MCL et immunofluorescence.....	165 -
3.D.i.	<i>Immunohistochimie pour la MCL</i> .....	166 -
3.D.ii.	<i>Immunofluorescence</i> .....	166 -
4.	Transcriptomique.....	166 -
4.A.	Transcriptomique sur organes totaux.....	166 -
4.B.	Microdissection au laser (MCL).....	167 -
4.C.	Analyses des données de transcriptomique.....	167 -
4.C.i.	<i>Transcriptomique sur organes</i> .....	167 -
4.C.ii.	<i>Déconvolution du transcriptome</i> .....	167 -
Références.....		168 -
Annexes .....		188 -

# Liste des figures et tableaux

---

Figure 1. Phylogénie des <i>Arenaviridae</i> en 2019.....	- 17 -
Figure 2. Diversité et répartition globale des <i>Mammarenavirus</i> . .....	- 21 -
Figure 3. Intervention scolaire sur la FL dans une école élémentaire au Bénin .....	- 24 -
Figure 4. Répartition géographique prédictive de <i>Mastomys natalensis</i> .....	- 25 -
Figure 5. Dynamiques de transmission zoonotique de LASV .....	- 27 -
Figure 6. Zone d'endémicité des différents clades de LASV .....	- 28 -
Figure 7. Bourgeonnement de virions d' <i>Arenaviridae</i> (virus Lujjo) en microscopie électronique à transmission .....	- 29 -
Figure 8. Structure de la particule virale et organisation du génome de LASV .....	- 30 -
Figure 9. Structure cristallographique de la NP de LASV .....	- 31 -
Figure 10. Structure du complexe glycoprotéique de LASV.....	- 32 -
Figure 11. Structure des glycanes à la surface de la <i>spike</i> de LASV .....	- 33 -
Figure 12. Structure de la polymérase L de LASV.....	- 34 -
Figure 13. Structure des formes oligomériques de la protéine Z de LASV .....	- 35 -
Figure 14. Les différents rôles de la protéine de matrice Z chez les <i>Mammarenavirus</i> .....	- 36 -
Figure 15. Cycle réplcatif du virus Lassa .....	- 38 -
Figure 16. Histopathologie de la FL dans le foie, la rate et le poumon humain.....	- 43 -
Figure 17. Immunodétection de LASV dans des tissus humains.....	- 44 -
Tableau 1. Tropicisme de LASV chez l'humain et implications pathogéniques.....	- 46 -
Figure 18. Réponse immunitaire innée et mécanismes d'évasion de LASV .....	- 55 -
Tableau 2. Composition des groupes de singes cynomolgus dans le schéma expérimental....	- 65 -
Figure 19. Dynamique de la charge virale et du titre viral dans les organes au cours de l'infection par LASV AV ou LASV Josiah.....	- 67 -
Figure 20. Détection <i>in situ</i> de l'ARN viral dans les OLS à 2 jpi.....	- 68 -
Figure 21. Détection <i>in situ</i> de l'ARN viral au cours du temps dans les OLS .....	- 70 -
Figure 22. Détection <i>in situ</i> de l'ARN viral au cours du temps dans les organes clés de la pathologie.....	- 72 -
Figure 23. Détection <i>in situ</i> de l'ARN viral au cours du temps dans le système nerveux central et dans les glandes surrénales.....	- 75 -
Figure 24. Détection <i>in situ</i> de l'ARN viral au cours du temps dans l'intestin, le cœur et l'appareil reproducteur .....	- 75 -
Figure 25. Détection <i>in situ</i> de l'ARN viral au cours du temps dans le thymus et le pancréas.....	- 77 -
Figure 26. Identification des cellules cibles de LASV dans les GGM au cours du temps.....	- 79 -
Figure 27. Identification des cellules cibles de LASV dans la rate au cours du temps.....	- 81 -

Figure 28. Identification des cellules cibles de LASV dans le foie à 11 jpi.....	85 -
Figure 29. Identification des cellules cibles de LASV dans le poumon à 11 jpi.....	85 -
Figure 30. Identification des cellules cibles de LASV dans le rein à 11 jpi.....	88 -
Figure 31. Identification des cellules cibles de LASV dans le cerveau à 11 jpi.....	88 -
Figure 32. Numération de marqueurs phénotypiques d'inflammation dans le poumon.....	89 -
Figure 33. Mise en évidence d'infiltration neutrophilique dans les organes lors de l'infection létale.....	90 -
Figure 34. Quantification de l'infiltration de cellules cytotoxiques dans les organes lors de l'infection par LASV.....	91 -
Figure 35. Composition cellulaire des PBMC des singes cynomolgus au cours de l'infection par LASV.....	96 -
Figure 36. Composition cellulaire des GGM des singes cynomolgus au cours de l'infection par LASV.....	98 -
Figure 37. Composition cellulaire de la rate des singes cynomolgus au cours de l'infection par LASV.....	99 -
Figure 38. Activation d'une réponse T spécifique dans les PBMC lors de l'infection non létale par LASV.....	102 -
Figure 39. Dynamique de la réponse T spécifique dans les OLS lors de l'infection par LASV.....	104 -
Tableau 3. Marqueurs d'indentification des différentes catégories de LB <sub>mém</sub> par cytométrie.....	105 -
Figure 40. Dynamique de différenciation des LB <sub>mém</sub> et des plasmocytes dans les PBMC lors de la FL.....	105 -
Figure 41. Prolifération des LB <sub>mém</sub> et des plasmocytes dans les OLS lors de la FL.....	106 -
Figure 42. Prolifération et cytotoxicité des NK dans les PBMC lors de l'infection par LASV.....	107 -
Figure 43. Epuisement et cytotoxicité des NK dans les PBMC lors de l'infection par LASV.....	108 -
Figure 44. Prolifération et cytotoxicité des NK dans les OLS lors de l'infection par LASV.....	109 -
Figure 45. Technique de microdissection par capture laser.....	110 -
Figure 46. Pourcentage de reads viraux dans les transcriptomes obtenus dans la ZMS à 11 jpi.....	111 -
Figure 47. Analyse comparative des transcriptomes de la ZMS à 11 jpi.....	112 -
Figure 48. Composition cellulaire du foie au cours de l'infection par LASV.....	116 -
Figure 49. Proportions relatives des différents types d'hépatocytes et des cellules immunitaires dans le foie.....	117 -
Figure 50. Proportions relatives des types cellulaires pulmonaires regroupés par ensembles fonctionnels.....	118 -
Figure 51. Composition cellulaire du poumon au cours de l'infection par LASV.....	120 -

Figure 52. Proportions relatives des types cellulaires rénaux regroupés par ensembles fonctionnels .....	- 120 -
Figure 53. Composition cellulaire du rein au cours de l'infection par LASV .....	- 121 -
Figure 54. Discrimination de l'état d'infection des hépatocytes en préparation de la MCL	- 123 -
Figure 55. Pourcentage de reads viraux dans les transcriptomes d'hépatocytes à 11 jpi ....	- 124 -
Figure 56. Analyse comparative des transcriptomes d'hépatocytes à 11 jpi.....	- 125 -
Figure 57. Comparaison de l'activation des voies de la base HALLMARK chez les hépatocytes lors de l'infection par LASV.....	- 126 -
Figure 58. Analyse différentielle de l'expression génique dans le poumon des singes infectés .....	- 129 -
Figure 59. Analyse différentielle des gènes impliqués dans la réponse immune dans le poumon lors de l'infection par LASV à 11 jpi.....	- 130 -
Figure 60. Analyse différentielle de l'expression génique dans le rein des singes infectés....	- 132 -
Figure 61. Analyse différentielle des gènes impliqués dans la réponse immune dans le rein lors de l'infection par LASV .....	- 133 -
Figure 62. Analyse différentielle de l'expression génique dans les glandes surrénales des singes infectés .....	- 135 -
Figure 63. Analyse différentielle des gènes impliqués dans la réponse immune dans les glandes surrénales lors de l'infection par LASV.....	- 136 -
Figure 64. Analyse comparative de l'infection par LASV avec le sepsis et la LPA dans le poumon .....	- 138 -
Figure 65. Analyse comparative de l'infection par LASV avec la pathologie pulmonaire induite par SARS-CoV2.....	- 140 -
Figure 66. Comportement des gènes montrant une ED comparable à celle mesurée lors du COVID-19.....	- 141 -
Figure 67. Analyse comparative de l'infection par LASV avec le sepsis et l'IRA dans le rein.....	- 142 -
Figure 68. Analyse comparative de l'infection par LASV avec l'insuffisance surrénalienne et le sepsis dans les glandes surrénales.....	- 144 -
Figure 69. Description des zones fonctionnelles de la glande surrénale.....	- 145 -
Figure 70. Niveaux plasmatiques d'hormones surrénaliennes et rénales lors de l'infection par LASV.....	- 146 -
Figure 71. Mise en évidence cellules infectées dans l'épiderme et le derme au site d'injection. ....	- 188 -

## Liste des abréviations utilisées

---

AAM : Arénavirus de l'Ancien Monde

ALT : Alanine Transaminase

ANM : Arénavirus du Nouveau Monde

AST : Aspartate Transaminase

CESF : Cellule Endothéliale Sinusoïdale du Foie

CHAPV : Virus Chapare

CITV : Comité International de Taxonomie des Virus

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

DC : Cellule Dendritique

mDC : Cellule Dendritique Myéloïde

moDC : Cellules Dendritiques dérivées de Monocytes

pDC : Cellule Dendritique Plasmacytoïde

DE- : Négativement Différentiellement Exprimé

DE+ : Positivement Différentiellement Exprimé

ED : Expression Différentielle

FHV : Fièvre Hémorragique Virale

FL : Fièvre de Lassa

FRC : Cellule Fibroblastique Réticulaire

GALT : *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (Tissu Lymphoïde Associé à l'Intestin)

GTOV : Virus Guanarito

HE: Hématoxyline-Eosine

HIS : Hybridation *In Situ*

HISV : Virus du Serpent de l'Institut Haartman

IFN $\alpha$  : Interféron alpha

IFN $\beta$  : Interféron bêta

IFN $\gamma$  : Interféron gamma

IFN $\lambda$  : Interféron lambda

Ig : Immunoglobuline

IGR : *Intergenic Region* (Région Intergénique)

IHA : Insuffisance Hépatique Aiguë

IRA : Insuffisance Rénale Aiguë

ISG : Gènes Stimulés par l'Interféron

Jpi : jour(s) post-infection

JUNV : Virus Junín

LASV : Virus Lassa

LCMV : Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire

LPA : Lésion Pulmonaire Aiguë

LUJV : Virus Lujó

MACV : Virus Machupo

MCI : Maladie des Corps d'Inclusion

MDSC : *Myeloid-Derived Suppressor Cell* (Cellule Suppressive d'Origine Myéloïde)

MOPV : Virus Mopeia

OLP : Organe Lymphoïde Primaire

OLS : Organe Lymphoïde Secondaire

ORF : *Open Reading Frame* (Cadre Ouvert de Lecture)

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*



PBMC : *Periphal Blood Mononuclear Cells* (Cellules Mononucléées du Sang Périphérique)

PMN : Polymorphonucléaire

PNH : Primate Non Humain

PRR : *Pattern Recognition Receptor* (Récepteur de Reconnaissance de Motifs Moléculaires)

RLR : *Rig-I-Like Receptor*

scRNAseq : *single-cell RNA sequencing*

RNP : Ribonucléoprotéine

SABV : Virus Sabiá

SDMV : Syndrome de Défaillance Multiviscérale

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

SSP : Peptide Signal

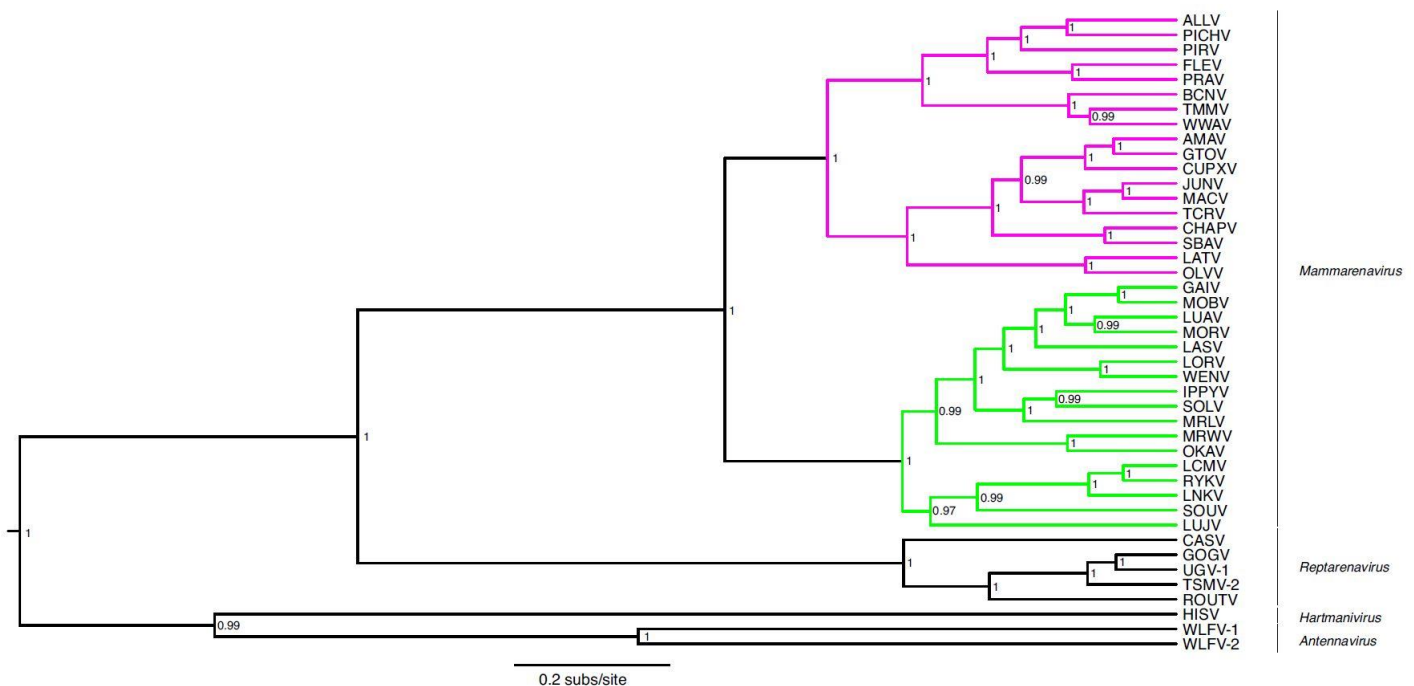
ZMS : Zone Marginale Splénique

## 1. Epidémiologie du virus Lassa et des *Arenaviridae*

### 1.A. La famille des *Arenaviridae* : phylogénie, évolution, répartition géographique

#### 1.A.i. *Phylogénie des Arenaviridae*

Appartenant à l'ordre des Bunyavirales, qui regroupe des virus enveloppés à génomes segmentés de polarité négative, la famille des *Arenaviridae* – du latin *arena*, signifiant sable – tient son nom de l'aspect granuleux des particules virales. Depuis sa découverte en 1976 et jusqu'à 2012, la famille des *Arenaviridae* était composée d'un genre unique – *Arenavirus*, devenu depuis *Mammarenavirus*, pour « mammalian arenavirus » – regroupant des virus ayant pour hôtes majoritaires des mammifères, et historiquement classifiés en Arénavirus du nouveau monde (ANM) et Arénavirus de l'ancien monde (AAM). Mais en 2009, plusieurs spécimens de serpents en captivité sont atteints de la maladie des corps d'inclusion (MCI), dont l'agent pathogène reste non identifié pendant plusieurs années. Des études de métagénomique permirent finalement d'identifier au moins deux nouveaux Arénavirus à l'origine de la MCI, et par là même de découvrir un nouveau genre appartenant à la famille des *Arenaviridae*, les *Reptarenavirus*<sup>1,2</sup>. De 2012 à 2015, le genre des *Reptarenavirus* est petit à petit complété grâce à la découverte de nouvelles espèces virales infectant des boïdés captifs



**Figure 1. Phylogénie des *Arenaviridae* en 2019.** Etablie à partir du gène de la nucléoprotéine (NP), présent sur le segment S du génome viral. Vert : AAM, magenta : ANM. Adapté de Pontremoli *et al.*, 2019 .

de par le monde (Californie, Allemagne, Finlande) <sup>3,4</sup>, et un nouveau genre baptisé *Hartmanivirus* est défini avec la caractérisation d'une nouvelle espèce divergente, le virus du serpent de l'institut Haartman (HISV-1) <sup>5,6</sup>. En 2018, une nouvelle étude de métatranscriptomique de grande ampleur réalisée sur des poissons, des amphibiens et des reptiles a permis d'identifier deux nouvelles espèces d'Arénavirus présentes dans l'intestin, les branchies et le foie de poissons actinoptérygiens <sup>7</sup>. Ces nouvelles espèces, après séquençage, ne pouvaient se classer dans aucun des trois genres précédemment décrits et constituent donc un nouveau genre, les *Antennavirus* (cf. **Figure 1**) <sup>8</sup>. A la date du mois d'août 2022, le Comité International de Taxonomie des Virus (CITV) dénombre 41 espèces dans le genre *Mammarenavirus*, 5 espèces dans le genre *Reptarenavirus*, 6 espèces dans le genre *Hartmanivirus* et 3 espèces dans le genre *Antennavirus* <sup>9</sup>. Ce nombre est appelé à augmenter, avec l'émergence régulière d'espèces virales non décrites et la multiplication d'études de métagénomique et de métatranscriptomique visant à identifier de nouveaux virus dans des hôtes variés.

#### 1.A.ii. Evolution des Arenaviridae

La plupart des études sur l'évolution des réservoirs des virus à ARN s'accordent à décrire une évolution vers la stabilité de l'association spécifique entre un virus et son hôte, malgré des phénomènes de changements d'hôtes notables. En 2007, Gonzalez *et al.* <sup>10</sup> s'appuient sur d'autres travaux <sup>11,12</sup> pour proposer l'hypothèse selon laquelle l'ancêtre commun des *Mammarenavirus* avait pour hôte stable un ancêtre commun des familles de rongeurs qui sont connues comme réservoirs aujourd'hui, et que l'évolution et la spéciation lentes des rongeurs sont à l'origine de la diversité des Arénavirus. Mais si la divergence des *Arenaviridae* semble de prime abord corrélée avec l'éloignement phylogénétique des hôtes qui leur correspondent, l'hypothèse de phénomènes de coévolution et de cospéciation virus-hôte à l'origine de la diversité de cette famille virale est aujourd'hui écartée. En effet, bien que les hôtes des ANM et des AAM appartiennent à des sous-familles de rongeurs distinctes – Sigmodontinae et Neotominae pour les ANM, Murinae pour les AAM – les familles des Cricetidae et des Muridae ont divergé phylogénétiquement près de 20 millions d'années avant notre ère <sup>13</sup>. Ce temps très long n'est pas compatible avec la date de divergence des ANM et des AAM, qui est estimée inférieure à 45000 ans <sup>14</sup>. D'autre part, des événements de changements d'hôtes dans l'histoire des *Mammarenavirus*, permis par le recouvrement éco-géographique de populations de rongeurs d'espèces ayant une forte proximité phylogénétique, ont été décrits au sein de plusieurs clades <sup>15</sup>. Ces événements de transferts horizontaux et d'apparition de nouveaux hôtes spécifiques sont à présent considérés comme les moteurs majeurs de la divergence et de la spéciation des *Mammarenavirus* <sup>8</sup>.

Au sens large, il apparaît que l'origine des AAM se situe en Afrique subsaharienne, tandis que l'émergence des ANM semble avoir eu lieu en Amérique du

Sud ou en Amérique Centrale. On pense aujourd'hui que la répartition globale des *Mammarenavirus* trouve son explication dans des causes anthropogéniques, essentiellement à cause de flux migratoires humains, souvent accompagnés de mouvements d'espèces de rongeurs. C'est notamment le cas du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) qui a pour réservoir la souris commune (*Mus musculus*), dont le commensalisme établi laisse supposer des co-déplacements avec les populations humaines, et qui est aujourd'hui le seul *Mammarenavirus* présent sur les cinq continents <sup>8</sup>. Cependant ce dernier constitue tout de même un cas singulier, puisque son génome suggère qu'il aurait émergé en Amérique du Nord, il y a environ 6700 ans, et ce malgré son appartenance au clade des AAM. Or l'hypothèse de migrations humaines de grande ampleur à cette période reste très incertaine, et nous ne pouvons aujourd'hui pas conclure sur la cause de la présence d'un AAM sur le continent américain à la date présumée de l'émergence de LCMV. On peut cependant imaginer qu'un *Mammarenavirus* ancestral ait été transporté d'un continent à l'autre par un réservoir compatible (poissons, oiseaux, chauve-souris) et capable d'effectuer de longues distances.

#### *Les déterminants génétiques de l'évolution des Arenaviridae*

Les processus génétiques à l'origine de l'évolution des virus à ARN ayant un génome segmenté sont au nombre de trois : l'accumulation de mutations non synonymes dans le génome, la recombinaison et le réassortiment génétiques <sup>10</sup>.

La dérive génétique constitue un vecteur fort d'évolution des virus à ARN, et elle est principalement permise par l'absence de fonction de relecture de la polymérase lors du processus de réplication, ce qui autorise l'accumulation de mutations et l'apparition de souches divergentes qui constituent des quasi-espèces. Parmi la diversité des virions produits grâce à ce phénomène, seuls les plus adaptés à leur environnement sont sélectionnés et peuvent devenir majoritaires. Le taux d'erreur mesuré pour la polymérase de LCMV, l'arénavirus standard, est compris entre  $1.10^{-4}$  et  $5,7.10^{-4}$  substitution par nucléotide selon les régions du génome, ce qui en fait un processus évolutif majeur <sup>16</sup>. Toutefois, il est intéressant d'observer que certaines régions du génome sont hautement conservées et d'autres plus variables. Le gène de la polymérase des Arénavirus est notamment sujet à une sélection positive forte – avec au moins 53 sites de sélection positive identifiés – et constitue donc un déterminant majeur de l'adaptation évolutive des *Mammarenavirus* <sup>8,14</sup>.

Quant aux processus de recombinaison et de réassortiment génétiques, ils nécessitent tous deux un événement de coinfection par deux Arénavirus distincts au sein de la même cellule. S'il a été montré expérimentalement qu'une coinfection avec deux *Mammarenavirus* était possible *in vitro* <sup>17</sup>, et qu'elle pouvait aboutir à la formation d'un virus réassorti <sup>18,19</sup>, l'importance de ces phénomènes *in vivo* demeure incertaine. En effet, il existe des mécanismes immunitaires de protection croisée

empêchant le plus souvent la coinfection par deux *Mammarenavirus* proches <sup>17,20-22</sup>, et qui selon toute vraisemblance fonctionnent grâce aux similarités structurales entre les glycoprotéines (GP) <sup>23</sup>. Toutefois, plusieurs études génomiques suggèrent que certains ANM nord-américains (virus Whitewater Arroyo, Catarina, Tamiami et Skinner Tank) résulteraient d'un événement de recombinaison au sein du segment S entre deux clades distincts d'ANM <sup>24-26</sup>. Bien que non encore élucidée, la raison la plus probable de cette recombinaison serait l'infection par un Arénavirus d'un réservoir rongeur présentant une infection persistante préalable par un autre Arénavirus. En revanche, aucun événement génétique similaire n'a été identifié chez les AAM <sup>27</sup>, ce qui laisse penser que ces phénomènes sont rares et ponctuels dans l'évolution des *Mammarenavirus*. Les *Reptarenavirus* en revanche semblent avoir une grande permissivité pour les coinfections, comme le démontre l'étude d'Hepojoki *et al.* <sup>5</sup>, ce qui pourrait participer activement à leur évolution. En outre, la séquence de la GP des *Reptarenavirus* présente une similarité forte avec celle des Filovirus <sup>1</sup>, ce qui suggère un événement de recombinaison entre l'ancêtre des *Reptarenavirus* et un Filovirus.

Pour résumer, les trois processus d'évolution décrits chez les virus sont possibles chez les *Arenaviridae*, mais ils n'ont pas tous la même importance. Un seul cas de réassortiment naturel entre Arénavirus a été documenté dans la littérature, chez des patients transplantés <sup>28</sup>, ce qui montre le caractère très anecdotique de ce phénomène dans l'évolution de cette famille virale. Les événements de recombinaison semblent quant à eux être à l'origine d'au moins un clade d'ANM, il s'agit donc d'un processus génétique rare mais d'un facteur d'évolution non négligeable des *Arenaviridae*. La majorité de la diversité génétique de la famille dépend tout de même de la dérive génétique et de la sélection naturelle qui en découle et permet la détection de clusters de spéciation <sup>29</sup>.

### 1.A.iii. Les Mammarenavirus, agents responsables de fièvres hémorragiques

Six familles virales distinctes – toutes appartenant aux ordres des Bunyavirales et des Mononegavirales – sont connues pour être à l'origine de syndromes graves et à fort taux de mortalité appelés fièvre hémorragiques virales (FHV) : les *Arenaviridae* (virus Lassa), les *Phenuiviridae* (virus de la fièvre de la vallée du Rift), les *Nairoviridae* (virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo), les *Hantaviridae* (virus Hantaan), les *Filoviridae* (virus Ebola) et les *Flaviviridae* (virus de la dengue). La famille des *Arenaviridae* est celle qui contient le plus grand nombre de virus causant des FHV avec deux AAM – les virus Lassa <sup>30,31</sup> et Lujo (LUJV) <sup>32,33</sup> – et six ANM – les virus Machupo (MACV) <sup>34</sup>, Guanarito (GTOV) <sup>35,36</sup>, Junín (JUNV) <sup>37,38</sup>, Sabiá (SABV) <sup>39,40</sup>, Chapare (CHAPV) <sup>41,42</sup> et Whitewater Arroyo (WWAV) <sup>43</sup> – ayant déjà causé un syndrome hémorragique chez l'humain. Bien qu'il soit très difficile d'évaluer correctement l'incidence des maladies causées par ces agents étiologiques, il apparaît que la grande majorité d'entre eux ont une incidence moyenne faible, avec des flambées épidémiques

sporadiques mais toujours très limitées géographiquement <sup>34,44</sup>. Depuis que l'utilisation du vaccin Candid-1 a fait drastiquement chuter les cas d'infection par le virus Junín en Argentine, moins de 1000 cas par an sont enregistrés pour chacun des virus susnommés, à l'exception du virus Lassa.

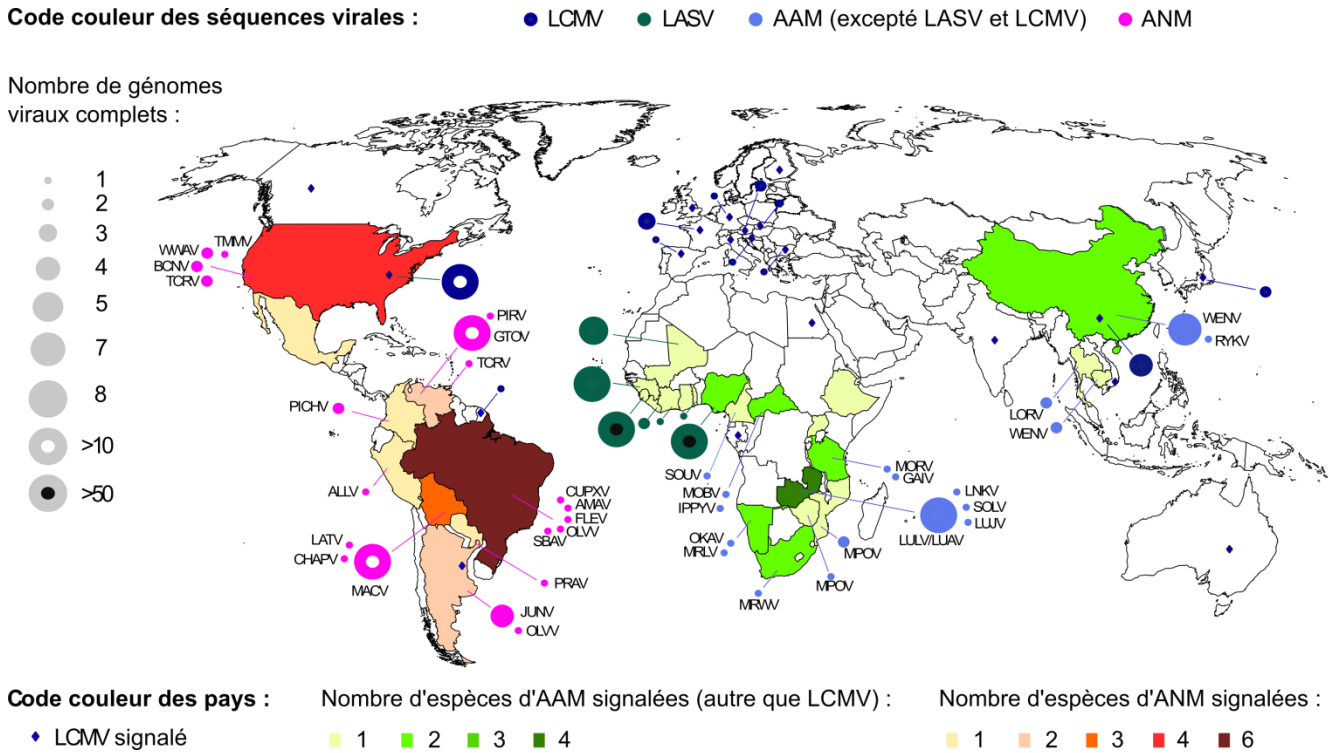


Figure 2. Diversité et répartition globale des *Mammarenavirus*. Adapté de Pontremoli *et al.*, 2019.

#### 1.A.iv. Répartition mondiale des Mammarenavirus

Les *Mammarenavirus* sont présents sur les cinq continents grâce à la très vaste répartition de LCMV, qui est l'unique virus de cette famille présent en Europe et en Océanie, mais la diversité de ce genre viral est la plus forte sur les continents africains et américains (cf. **Figure 2**). Parmi les ANM responsables de FHV, JUNV circule en Argentine, MACV et CHAPV en Bolivie, SABV au Brésil et GTOV au Venezuela. Chez les AAM, seuls LASV et LUJV ont causé des cas de FHV, avec un tableau clinique similaire <sup>32</sup>. La seule épidémie de LUJV identifiée à ce jour s'est déroulée en Zambie et en Afrique du Sud. Cinq cas ont été enregistrés et quatre d'entre eux ont connu une issue fatale, ce qui fait de LUJV l'Arénavirus au taux de mortalité le plus élevé, même si la fiabilité de ces estimations est difficile à établir étant donné le très faible nombre de cas. Après LCMV, le virus Lassa (LASV) est l'Arénavirus qui possède l'aire de recouvrement la plus étendue, avec pas moins de 8 pays d'Afrique de l'Ouest et du Golfe de Guinée ayant déclaré la présence d'au moins une souche de LASV :

Nigeria, Bénin, Togo, Côte d'Ivoire, Liberia, Guinée, Sierra Leone et Mali. Des cas d'importation de LASV sont également survenus à plusieurs reprises dans des pays non-endémiques (Allemagne, Etats-Unis, Pays-Bas), causant parfois des transmissions mortelles, comme au Royaume-Uni en 2022 <sup>45</sup>. Avec 36 cas d'infection primaire importés et deux transmissions causant des infections secondaires entre 1969 et 2019, LASV est l'agent étiologique de FHV le plus exporté en dehors de sa zone d'endémicité <sup>46</sup>.

## **1.B. Le virus Lassa, épidémiologie et impact sanitaire**

### *1.B.i. Incidence et impact sanitaire*

LASV est l'Arénavirus qui constitue la plus grande préoccupation en termes de santé humaine, il est l'agent étiologique de la fièvre de Lassa (FL), et a été découvert pour la première fois en 1969 lors de la mort de deux missionnaires dans le village de Lassa au Nigeria <sup>47,48</sup>. Malgré le fait que cet événement ait marqué la première identification de cet agent pathogène, il est plus que probable que de nombreux cas de FL qualifiés d'autres infections aient sévi en Afrique de l'Ouest bien avant sa découverte. Dans la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, de nombreux cas de fièvres ont été attribués au typhus dans cette région, mais rétrospectivement on pense qu'une partie de ces cas étaient en réalité causés par LASV.

Dans les cinq décennies qui ont suivi la découverte du virus, et grâce à l'amélioration des méthodes de diagnostic et à leur implémentation dans les pays environnants, celui-ci a été identifié dans plusieurs autres pays d'Afrique de l'Ouest : Liberia <sup>49</sup>, Sierra Leone <sup>50</sup>, Guinée <sup>51</sup>, Bénin <sup>52,53</sup>, Mali <sup>54,55</sup>, Côte d'Ivoire <sup>56</sup>, Togo <sup>57</sup>. Plusieurs patients séropositifs pour les antigènes de LASV ont également été détectés en république Centrafricaine <sup>58</sup>. Aujourd'hui, on estime que 83 (76 – 87, 95% CI) millions de personnes vivent dans les zones d'endémicité de LASV, un chiffre qui pourrait atteindre 187 (172 – 192) millions d'ici 2030 selon les prédictions <sup>59</sup>. Malgré ces estimations, il reste très compliqué d'évaluer précisément le nombre de cas d'infections annuel par LASV. Le nombre le plus souvent avancé fait état d'au moins 100000 cas (et jusqu'à 300000) par an, dont approximativement 5000 seraient fatals <sup>60</sup>, mais on peut raisonnablement penser que ce chiffre est surestimé. En effet, le Nigeria, qui est le pays le plus atteint par la FL à ce jour, a rapporté 1189 cas au cours de l'année 2020 <sup>61</sup>, un chiffre en hausse de 356 cas par rapport à l'année précédente. Cette évolution montre clairement que l'implémentation au fil des années d'une surveillance plus systématique permet de dresser un tableau plus réaliste de l'épidémiologie de LASV dans la région. Malgré cela, LASV reste une préoccupation sanitaire majeure listée par l'Organisation Mondiale de la Santé parmi les pathogènes prioritaires <sup>62,63</sup>, notamment à cause de l'absence de vaccin approuvé et de traitement efficace (cf. **4.A.** et **4.B.**). Tous ces facteurs sont responsables de la classification de LASV comme agent pathogène du

groupe à risque 4, devant par conséquent être manipulé dans un laboratoire ayant un niveau de confinement équivalent.

Le taux global de mortalité de la FL chez l'humain est compris entre 1 et 2%, ce qui distingue LASV de beaucoup d'autres FHV qui sont souvent associées à des taux de mortalité beaucoup plus élevés. On estime le taux d'infections asymptomatiques pour la FL autour de 80%<sup>64</sup>, un chiffre fondé sur la comparaison entre les études de séroprévalence dans les zones d'endémicité et les cas sévères menant à une hospitalisation. La terminaison pauci-symptomatique devrait toutefois être préférée au terme asymptomatique, pour lequel il est difficile de mettre en avant des preuves évidentes. En effet, les personnes atteintes ne sont identifiées que longtemps après l'infection dans ce genre d'études, et l'inaccessibilité des hôpitaux dans certaines régions, le coût des traitements associés, les croyances locales ainsi que l'exclusion sociale des personnes atteintes dissuadent parfois les malades de réaliser un diagnostic<sup>30</sup>. La séroprévalence de la FL est très variable en fonction des pays et même entre les régions de ces mêmes pays. Par exemple, une étude au Sierra Leone a estimé la séroprévalence entre 8 et 52% selon les localités<sup>65</sup>. Une méta-analyse datant de 2020 et regroupant 291 études de prévalence réalisées chez l'humain, les rongeurs et les autres mammifères dans 25 pays d'Afrique a permis d'établir une valeur de prévalence de 8,7% (6,8 – 10,8 ; 95% CI) pour la FL chez l'homme<sup>66</sup>.

Au cours des 20% d'infections considérées comme fortement symptomatiques, la maladie progresse vers une forme sévère qui peut nécessiter un monitoring médical avancé avec contrôle de l'équilibre des fluides vitaux et des troubles de la tension artérielle. Parmi les patients atteints par cette forme sévère de FL, une issue fatale est à déplorer dans 15 à 20% des cas d'hospitalisations, un chiffre qui peut atteindre 60% lors des rares flambées épidémiques<sup>67</sup>. Selon la méta-analyse évoquée plus haut, le taux moyen de mortalité parmi les cas symptomatiques de FL a été évalué à 29,7% (22,3 – 37,5 ; 95% CI)<sup>66</sup>. Les paramètres déterminants qui orientent le pronostic vers une FL pauci-symptomatique ou au contraire très sévère sont encore très mal compris, mais on sait que plusieurs facteurs peuvent jouer un rôle important dans l'issue de l'infection : souche virale à l'origine de la FL, soins médicaux prodigués, précédent contact avec un virus proche, dose et voie d'infection et bien sûr la variabilité génétiques entre les individus atteints<sup>68</sup>.

### *1.B.ii. Facteurs de risques*

Dans toutes les études sur les facteurs de risque de la FL, aucune association avec le sexe des patients n'est mise en évidence<sup>69</sup>. L'âge a été décrit comme associé à une plus forte séroprévalence dans certaines régions, notamment dans le sud du Mali<sup>55</sup> et sans effet dans d'autres zones géographiques, comme en Guinée<sup>69</sup>. Ces différences peuvent être dues à la circulation localisée de souches de LASV ayant des niveaux de pathogénicité variables, en effet une souche peu mortelle est supposée s'accompagner



d'une hausse de la séroprévalence dans les tranches d'âge les plus âgées de la population. Cela semble être le cas pour les souches qui circulent dans le sud du Mali, qui appartiennent majoritairement au clade V, décrit comme un des clades les moins pathogènes (cf. 1.B.iv.).

Le déterminant majeur du risque d'infection par LASV demeure la proximité fréquente avec des rongeurs, notamment dans l'environnement domestique et péri-domestique <sup>70</sup>. La densité des populations de rongeurs autour des habitations peut varier avec la saisonnalité – ce qui se traduit dans la fréquence des cas de LF <sup>71</sup> –, mais aussi et surtout avec les pratiques des habitants concernant l'agriculture, le stockage de la nourriture et la gestion des déchets <sup>72</sup>. Une étude récente a montré une corrélation forte entre le nombre de cas observés chez l'humain et la prévalence de LASV dans les populations de rongeurs à proximité <sup>73</sup>. De manière générale, la connaissance des facteurs de risques associés à FL ainsi que des pratiques à adopter pour se prémunir de la présence des rongeurs semble avoir un rôle très protecteur contre l'infection <sup>74</sup>, justifiant l'importance de la mise en place de campagnes éducatives sur la FL qui doivent continuer à être dispensées, en particulier dans les langues locales (cf. Figure 3) <sup>75</sup>.

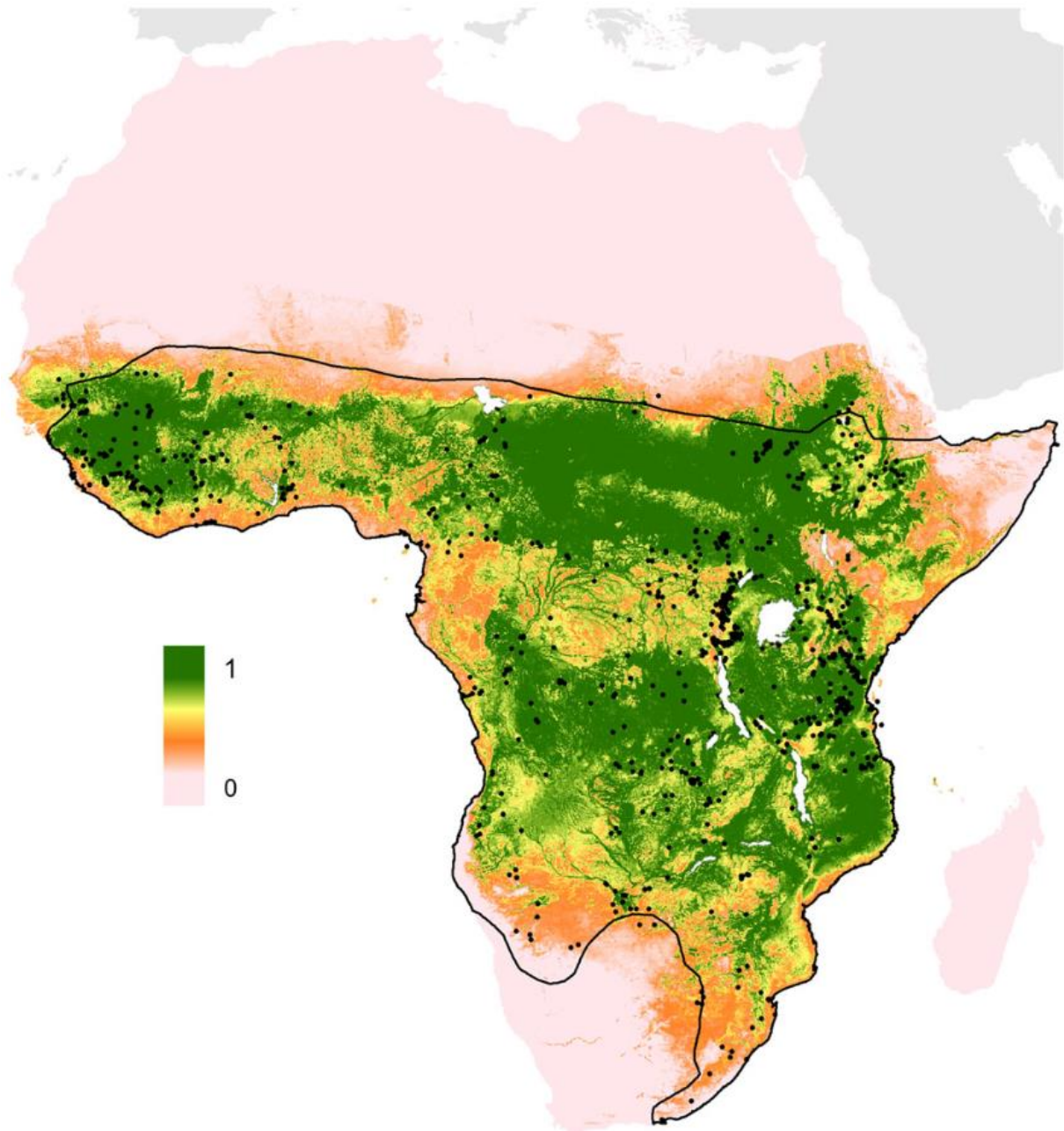


**Figure 3. Intervention scolaire sur la FL dans une école élémentaire au Bénin.** Exemple d'un flyer de sensibilisation contre les risques de la FL (UNICEF). Extrait de Lalis et Wirth, 2018 <sup>76</sup>.

### 1.B.iii. Réservoir et transmission

Le réservoir majoritaire et historiquement identifié de LASV est la souris multimammaire, encore appelé rat du Natal (*Mastomys natalensis*). Toutefois, de nombreux autres rongeurs ont récemment été identifiés comme porteurs de LASV, c'est le cas de *Mastomys erythroleucus*, *Hylomiscus pamfi* <sup>77</sup>, *Rattus rattus*, *Mus musculus* <sup>78</sup>

(et d'autres espèces du genre *Mus*), et certaines espèces des genres *Praomys* (en sérologie seulement) <sup>79</sup>, *Lemniscomys* (en sérologie seulement) <sup>80</sup>, *Crocidura* et *Tatera* <sup>73</sup>. Toutes les observations mènent à penser que des événements de transmission horizontale ont eu lieu entre des individus de *Mastomys natalensis* porteurs de l'infection latente et d'autres espèces de rongeurs <sup>80</sup>, ce qui est particulièrement inquiétant quant à la répartition future de LASV sur le continent africain, *Mastomys natalensis* étant lui-même présent dans toute l'Afrique subsaharienne (cf. **Figure 4**).



**Figure 4. Répartition géographique prédictive de *Mastomys natalensis*.** L'échelle représente la pertinence de la présence du réservoir de LASV à une localisation donnée. Les régions en vert marquent une probabilité élevée pour la présence de *Mastomys natalensis*. Les points noirs représentent des événements d'identification du vecteur, et la ligne noire marque la limite de la zone couverte par l'IUCN. Extrait de Mylne *et al*, 2015 <sup>81</sup>.

Le fait que la zone d'endémicité de LASV ne corresponde pas à l'aire de répartition de son réservoir pose question, mais aucune explication définitive n'est mise en avant. L'existence de barrières géographiques à l'Est du Nigeria empêchant les contacts entre les différentes populations de *Mastomys* est une possibilité, mais la divergence génétique de ces rongeurs associant des sous-populations différentes à des régions distinctes semble plus plausible <sup>82</sup>.

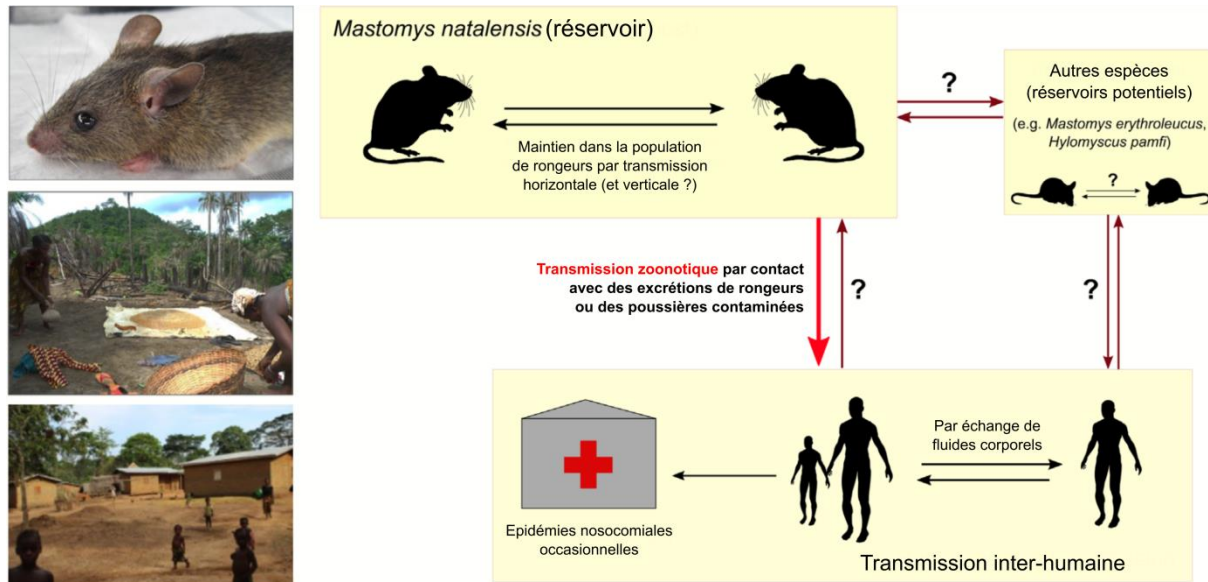
Au sein de l'espèce *Mastomys natalensis*, il a été montré que 40% des individus infectés étaient capables de transmettre LASV à un autre animal adulte par interaction directe ou bien par contact avec un environnement contaminé <sup>83</sup>. Après infection, le virus colonise transitoirement tous les organes de l'animal, mais ne persiste que dans les poumons après 40 jours, et pour une durée d'au moins trois mois. En outre, des données récentes non publiées suggèrent que l'âge des animaux au moment de l'infection a une forte influence sur la persistance virale au sein du vecteur <sup>84</sup>. En effet, lorsque les animaux sont infectés avant l'âge de deux semaines, le virus s'installe de manière persistante dans leur organisme, tandis qu'après cet âge-là, l'infection résulte en une présence virale transitoire. De plus, une étude récente montre que l'infection par voie intranasale débouche sur une infection durable des poumons et une dispersion plus forte de LASV par les animaux infectés <sup>85</sup>, ce qui suggère que cette voie de transmission est importante pour le maintien de la transmission en milieu naturel.

La méta-analyse effectuée par Kenmoe *et al.* fixe la prévalence moyenne de LASV dans son réservoir à 3,2% (1,9 – 4,6 ; 95% CI) <sup>66</sup>, mais on sait que celle-ci fluctue énormément en fonction des régions et des saisons notamment <sup>86</sup>, la séroprévalence pouvant atteindre 50% dans les populations les plus âgées de rongeurs <sup>80</sup>.

Peu de choses sont connues quant à la transmission du rongeur à l'humain, mais on présume que l'infection se fait via l'ingestion ou l'inhalation de poussières contaminées par les urines ou les matières fécales des rongeurs (cf. **Figure 5**). Des analyses récentes ont permis de détecter LASV dans des excréments de rongeurs prélevés dans des habitations <sup>87</sup>. En parallèle, il a été montré en conditions contrôlées de laboratoire que LASV peut être aérosolisé et se transmettre par voie aérienne à des singes cynomolgus et des cobayes <sup>88</sup>, ce qui schématise probablement assez bien le mode de transmission des matières contaminées à l'humain en conditions naturelles.

La transmission interhumaine de LASV est possible, bien que peu fréquente. Elle passe par le contact de fluides corporels infectés, et intervient principalement en milieu nosocomial ou domestique <sup>89,90</sup>. Une étude récente a montré que LASV peut persister dans les urines pendant plusieurs mois, et jusqu'à plus d'un an dans le sperme des individus infectés <sup>91</sup>, ce qui suggère des risques de transmission sexuelle. Cependant, les comparaisons des souches virales des patients montrent que même en période épidémique, plusieurs souches de LASV co-circulent, ce qui montre que la majorité des cas d'infection chez l'humain proviennent d'une transmission zoonotique du rongeur

vers l'homme<sup>92</sup>. Cette assertion est appuyée par les différents modèles informatiques de transmission de la FL qui estiment à environ 20% le nombre de cas causés par des transmissions interhumaines, et mettent en avant l'existence de *super-spreaders*<sup>93,94</sup>.

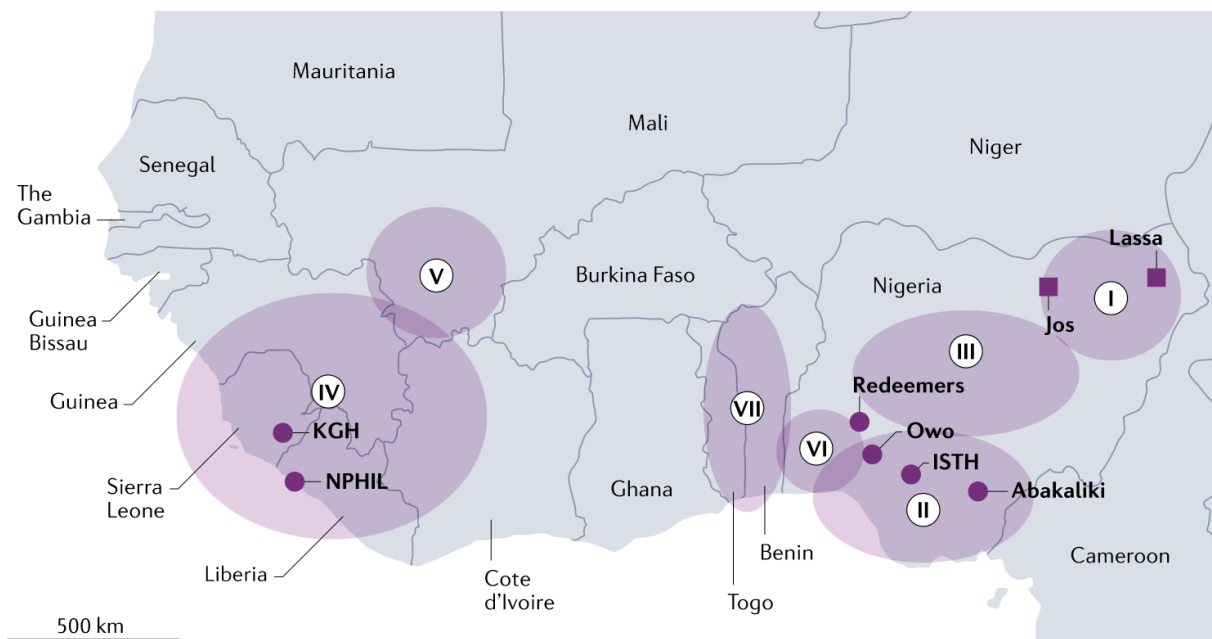


**Figure 5. Dynamiques de transmission zoonotique de LASV.** Schéma montrant les différents types de transmission connus à ce jour ou supposés (?) de LASV chez les rongeurs et l'homme. Adapté de Gibb *et al*, 2017<sup>95</sup>.

#### 1.B.iv. Phylogénétique du virus Lassa

Contrairement à d'autres espèces virales qui possèdent un génome hautement conservé et sont peu sujettes à la dérive génétique, LASV est une espèce très diversifiée génétiquement. On dénombre aujourd'hui 7 clades – possiblement huit – de LASV circulant dans des régions essentiellement distinctes (cf. **Figure 6**), bien que des souches puissent être transportées<sup>53</sup>. Les différents clades de LASV ont été isolés à partir de prélèvements de sang de patients ou de rongeurs, ou encore pendant les périodes d'épidémie, et leur classification est d'ordre essentiellement phylogénétique. Les clades I, II et III proviennent de différentes régions du Nigeria<sup>96</sup>. Le clade IV circule en Guinée, au Sierra Leone, au Liberia et au Mali et il contient la souche prototypique de LASV, baptisée Josiah, qui sera utilisée dans notre étude comme modèle de FL létale chez le singe cynomolgus. Il s'agit de la souche la plus communément utilisée dans les études de pathogenèse et elle est particulièrement virulente. Le clade V circule au Mali et en Côte d'Ivoire<sup>97</sup> et il contient la souche LASV AV, qui sera également utilisée dans notre étude comme modèle de FL non létale chez le singe cynomolgus, bien qu'elle ait été isolée chez un patient décédé<sup>98</sup>. La proximité génétique des souches LASV Josiah et LASV AV est très forte. Le clade VI a été découvert dans des rongeurs de l'espèce *Hylomyscus pamfi* au Nigeria et représente

une entité phylogénétiquement distincte des autres clades avec un segment S proche du clade I et un segment L proches des clades II et III <sup>77</sup>. Enfin, le clade VII a été isolé au Bénin lors de deux épidémies survenues en 2014 et 2016 <sup>53</sup> et au Togo en 2016 <sup>99</sup>. La variabilité génétique entre les clades les plus divergents de LASV est élevée : les gènes du segment L présentent une différence d'acides aminés pouvant aller jusqu'à 20%, tandis que la divergence des gènes du segment S s'élève à 8% au niveau de la séquence protéique.

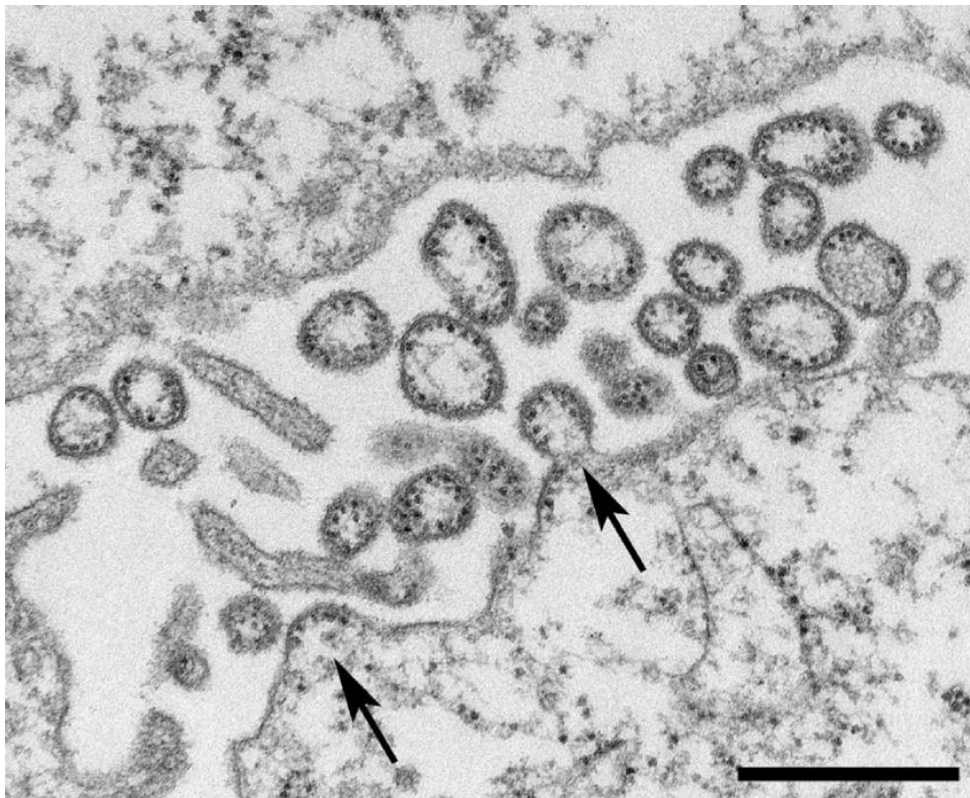


**Figure 6. Zone d'endémicité des différents clades de LASV.** Les carrés violets montrent la première émergence de LASV en 1969 (les cas identifiés à Lassa étaient transportés à Josiah). Les ronds violets montrent la localisation des centres importants menant des recherches sur la FL. KGH : *Kenema Government Hospital*, NPHIL : *National Public Health Institute of Liberia*, ISTH: *Irrua Specialist Teaching Hospital*. Les ellipses mauves représentent les zones approximatives de circulation des différents clades de LASV, numérotés de I à VII. Extrait de Garry, 2022 <sup>68</sup>.

## 2. Génome, structure et cycle de réplication du virus Lassa

### 2.A. Génome et structure du virus Lassa

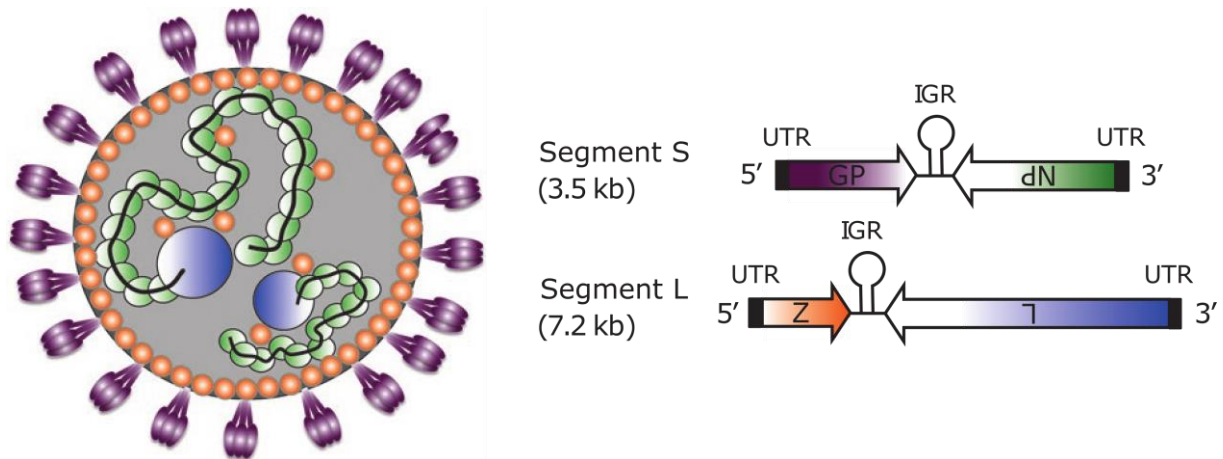
Le virus Lassa est un virus enveloppé à ARN bisegmenté monocaténaire de polarité ambisens – bien qu’il soit classé parmi les ARN à polarité négative – composé de quatre types de protéines. Les particules virales apparaissent sphériques en microscopie même si elles ont des propriétés pléomorphes (cf. **Figure 7**) et leur diamètre moyen est de 150 nm. Les virions ont un aspect granuleux qui est dû à la présence de ribosomes issus de la cellule-hôte et inclus dans les particules virales lors du bourgeonnement, ce qui a donné son nom à la famille des *Arenaviridae* – du latin *arena*, sable. Aucun rôle majeur de ces ribosomes dans la réplication virale n’a été démontré, et des particules virales du virus Pichinde contenant des ribosomes inactivés ont montré une réplication comparable aux particules virales contenant des ribosomes natifs<sup>100</sup>. Cette structure est commune à tous les *Mammarenavirus*.



**Figure 7.** Bourgeonnement de virions d'*Arenaviridae* (virus Lujo) en microscopie électronique à transmission. Extrait du livre *Arenaviridae*<sup>101</sup>.

Le génome viral est composé de deux segments comportant chacun deux cadres ouverts de lecture (ORF) codant chacun pour une des protéines virales (cf. **Figure 8**). Le segment L, long d’approximativement 7,2 kilobases, code pour la polymérase virale L et la protéine de matrice Z, dont les gènes ont des orientations opposées et sont séparées par une région intergénique (IGR) structurée en épingle à cheveux. Le segment S (3,5 kilobases) contient quant à lui les gènes codant pour le précurseur du

complexe glycoprotéique GPC et pour la nucléoprotéine NP, et sa structure est comparable à celle du segment L, avec deux gènes orientés en sens opposés et une IGR tridimensionnelle repliée en tige-boucle <sup>102,103</sup>. Les régions intergéniques des segments S et L n'ont pas la même séquence ni la même structure secondaire, et elles jouent un rôle central dans le contrôle de la transcription et dans la production des particules virales des Arénavirus <sup>104,105</sup>.



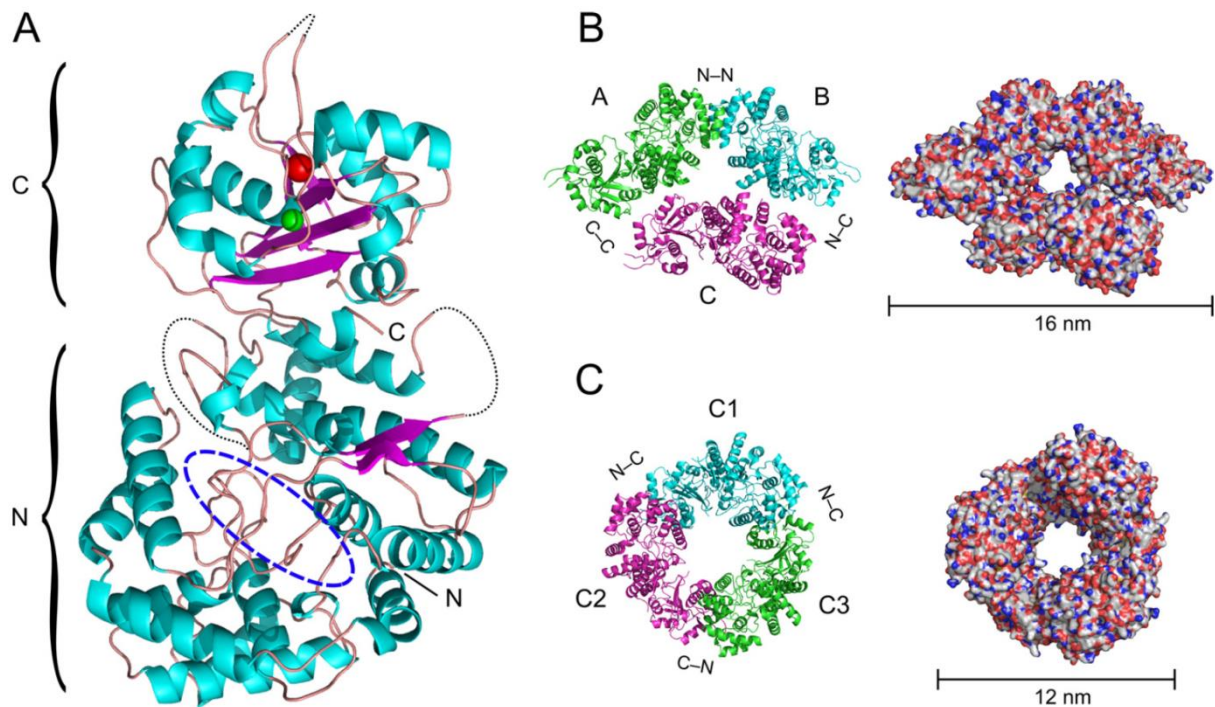
**Figure 8. Structure de la particule virale et organisation du génome de LASV.** A gauche, disposition des quatre protéines virales au sein du virion : GP (violet), NP (vert), Z (orange) et L (bleu). Les deux lignes courbes noires représentent les brins d'ARN viraux génomiques. A droite, détail et orientation des ORF des deux segments d'ARN génomique de LASV. Adapté de Martínez-Sobrido et al, 2016 <sup>106</sup>.

La GP est la seule protéine virale exposée à l'extérieur de la particule virale, et il s'agit en fait d'un complexe trimérique parfois qualifié de *spike*. Le gène de la GP code en effet pour une protéine qui est clivée co-traductionnellement en un précurseur appelé GPC et un peptide signal (SSP) par une peptidase cellulaire. La GPC est elle-même clivée post-traductionnellement en sous-unités GP1 et GP2, qui associées au SSP forment la GP mature enchâssée dans l'enveloppe membranaire à la surface du virion. A l'intérieur de la particule virale, les protéines NP et L forment un complexe avec les brins d'ARN viraux, qualifié de ribonucléoprotéine (RNP). Cette RNP interagit également avec la protéine de matrice Z, qui tapisse la face interne de l'enveloppe.

## 2.B. Présentation structuro-fonctionnelle des protéines virales

### 2.B.i. La nucléoprotéine NP

La nucléoprotéine de LASV est constituée de 569 acides aminés que l'on peut séparer fonctionnellement en un domaine N-terminal impliqué dans la multimérisation de la NP et dans la liaison aux ARN viraux génomiques et un domaine C-terminal possédant une capacité unique de dégradation des ARN doubles brins, reliés entre eux par un connecteur sans structure tertiaire (cf. **Figure 9**).



**Figure 9. Structure cristallographique de la NP de LASV.** A : Monomère de NP de LASV, construit par cristallographie aux rayons X, montrant le domaine N-terminal possédant une cavité (ovale pointillé bleu) permettant la liaison aux nucléotides pyrimidiques et le domaine C-terminal contenant un ion Mn<sup>2+</sup> (rouge) et un ion Zn<sup>2+</sup> (vert). B. Structure du trimère asymétrique de NP (représentation en ruban à gauche et surface moléculaire à droite). C. Structure du trimère symétrique de NP (représentation en ruban à gauche et surface moléculaire à droite). Extrait de Brunotte et al, 2011 <sup>107</sup>.

Au cours de la réplication virale, la NP est recrutée de manière concomitante à l'élongation des ARN produits et les encapside sans délai, limitant ainsi la formation d'ARN double brin qui seraient reconnus par les senseurs de la cellule infectée. Ce processus nécessite une forte abondance de la NP pour être efficace – on en dénombre en moyenne 1500 unités par virion <sup>108,109</sup> – sans quoi la réplication perd en efficacité et la réponse immunitaire de la cellule-hôte est fortement activée <sup>110</sup>.

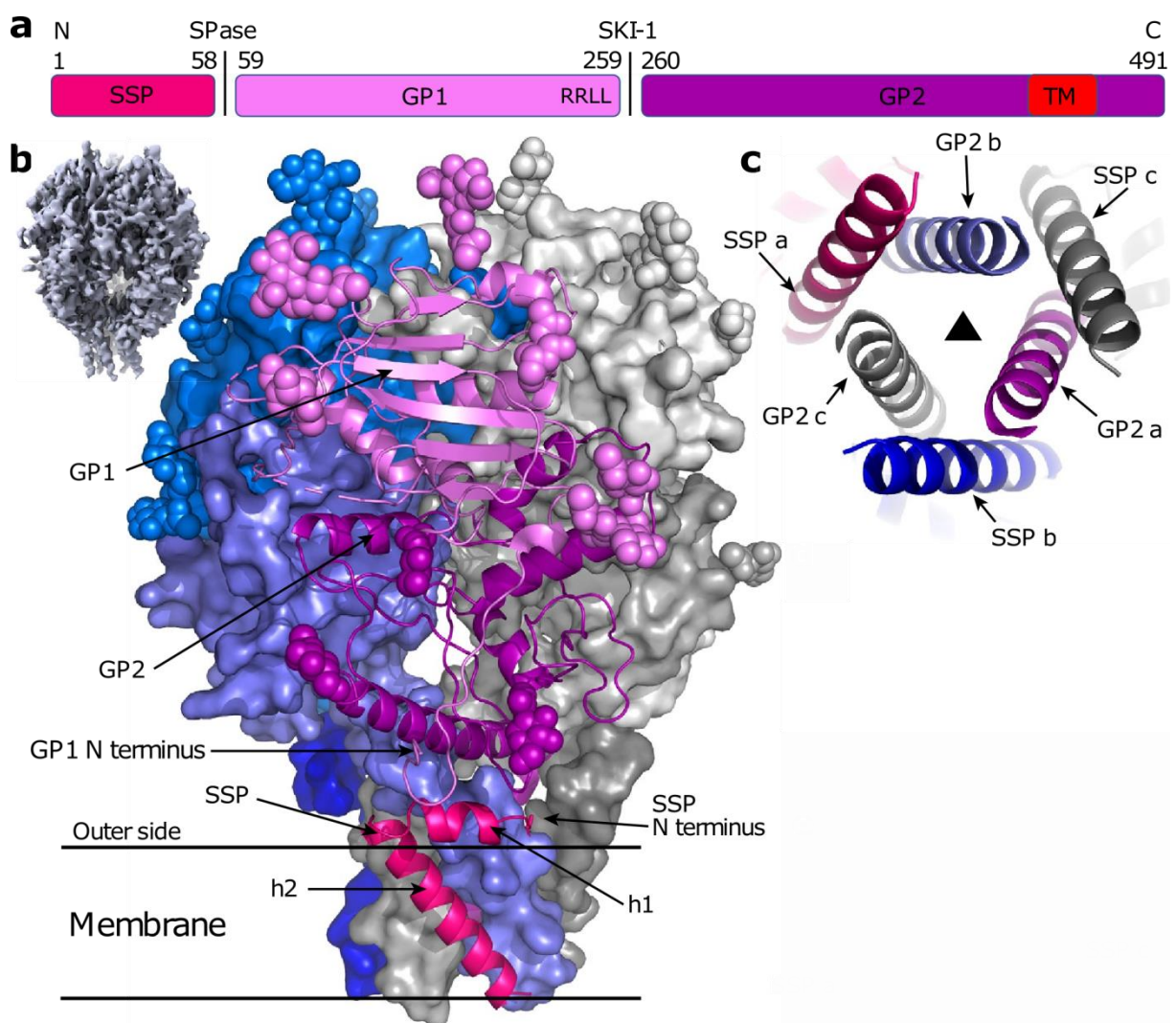
De plus, la NP joue un rôle enzymatique dans l'évasion du système immunitaire grâce à l'activité exonucléasique de son domaine C-terminal qui lui permet de lier et dégrader les ARN doubles brins de manière spécifique <sup>111-113</sup> et d'ainsi empêcher l'induction de la réponse IFN de type I. En effet, ces ARN double brin, nécessairement produits lors de la réplication des virus à ARN, sont aussi liés par les systèmes de reconnaissance de la cellule infectée appelés PRR (*Pattern Recognition Receptor*) ou récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, qui enclenchent les mécanismes de la réponse immunitaire innée. En abolissant la fonction exonucléasique de la NP de LASV, on détecte une forte activation de l'immunité innée médiée par le PRR RIG-I dans les cellules dendritiques (DC) et les macrophages infectés par LASV <sup>114,115</sup>. Le domaine C-terminal a également montré des capacités d'édition de la séquence génomique en excisant les nucléotides mal appariés <sup>116</sup>.



Comme on peut le voir sur la **Figure 9** (B et C), les monomères de NP interagissent entre eux pour former des trimères qui présentent différentes conformation rendant plus ou moins accessible le domaine de liaison à l'ARN en fonction des besoins au cours du cycle viral <sup>107,117</sup>.

Enfin, la NP subit des modifications post-traductionnelles dont certaines sont réversibles, on a notamment identifié deux phosphorylations localisées en T210 et Y125. La première semble avoir un rôle dans l'initiation du complexe de réplication tandis que l'importance de la deuxième n'est pas avérée <sup>118</sup>.

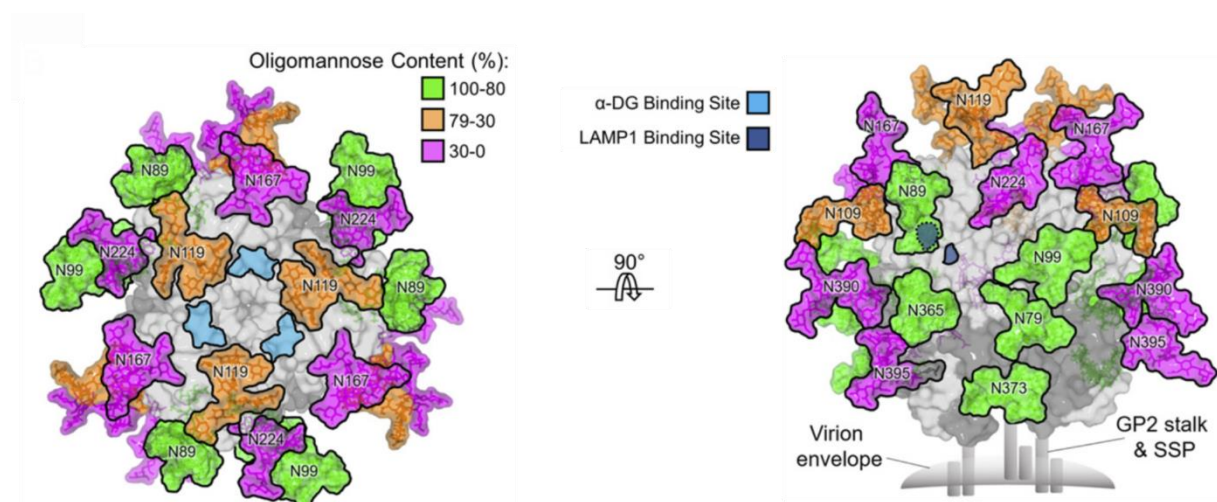
### 2.B.ii. La glycoprotéine GP



**Figure 10. Structure du complexe glycoprotéique de LASV.** A. Représentation des sites de clivage de la GPC et des sous-unités du complexe *spike*, avec le domaine transmembranaire (TM). B. Structure de la *spike* de LASV, composé d'un trimère de GP (gris, bleu et rose) et montrant le détail des sous-unités d'un monomère de GP : GP1 (parme), GP2 (violet) et SSP (fuchsia) et les domaines enchâssés dans la membrane. C. Organisation des hélices  $\alpha$  transmembranaires du point de vue intracellulaire. Extrait de Katz *et al*, 2022 <sup>119</sup>.

Le complexe *spike* (cf. **Figure 10**), composé d'une association oligomérique de trois protéines GP – comprenant elles-mêmes trois sous-unités chacune : GP1, GP2 et SSP – intervient dans l'arrimage du virion au récepteur cellulaire, puis dans l'induction de la fusion membranaire qui aboutit à l'entrée virale <sup>120</sup>. Chacune des sous-unités de la GP est impliquée dans des fonctions précises. Si le clivage du peptide signal est nécessaire à la réplication de LASV <sup>121</sup> et à l'ancrage membranaire de la *spike*, la GP1 effectue la reconnaissance et la liaison aux récepteurs cellulaires  $\alpha$ -dystroglycane ( $\alpha$ -DG) et LAMP1 <sup>122,123</sup>, tandis que la GP2 provoque la fusion des membranes virales et cellulaires <sup>124</sup>. Du fait de la spécificité de son site de liaison, la sous-unité GP1 est centrale dans la détermination du tropisme des différents Arénavirus <sup>125,126</sup>.

La conformation oligomérique de la *spike* lui confère une plasticité tridimensionnelle et une capacité aux modifications de conformation, qui peuvent être induites par l'interaction avec le récepteur d'entrée ou par l'acidification du milieu <sup>123</sup>. Le complexe glycoprotéique interagit successivement avec l' $\alpha$ -dystroglycane à la surface de la cellule cible <sup>127,128</sup> et avec LAMP1 après endocytose des particules virales par la cellule. L'acidification de l'endosome précoce permet la protonation d'une triade d'histidines dans la GP1 et induit un changement conformationnel de la *spike* qui libère le site de fixation à LAMP1 <sup>123</sup>.



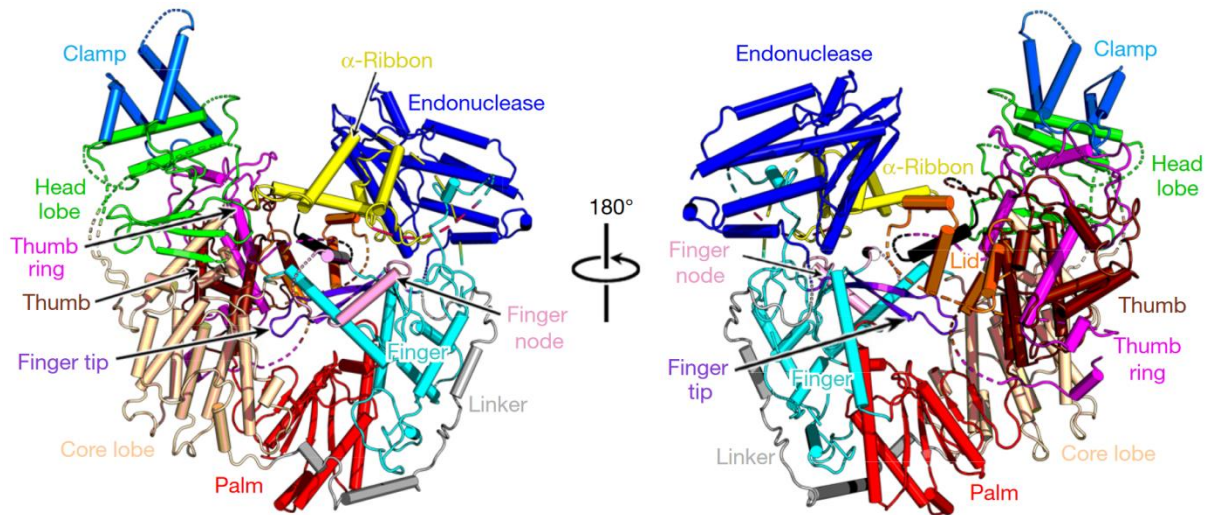
**Figure 11. Structure des glycanes à la surface de la *spike* de LASV.** Emplacements des glycosylations et des sites de liaison aux récepteurs sur la structure cristallographique du trimère de GP. La proportion d'oligomannose dans les glycanes est indiquée. Extrait de Watanabe *et al*, 2018 <sup>129</sup>.

La GP est le seul antigène viral exposé aux interactions avec le milieu de son hôte, ce qui en fait une cible privilégiée pour la réponse immunitaire en général et plus particulièrement la réponse humorale. Mais la GP subit un grand nombre de modifications post-traductionnelles, des N-glycosylations, qui recouvrent une grande partie de sa surface et représentent près de 25% de sa masse protéique <sup>120</sup> (cf. **Figure 11**). Ces modifications, de type oligomannose, agissent comme un bouclier stérique qui empêche la fixation des immunoglobulines (Ig) et permettent une forme avancée de

résistance à l'immunité adaptative humorale <sup>129,130</sup>. Ce mécanisme d'évasion permet d'expliquer que la grande majorité des anticorps détectés chez les patients infectés par LASV sont non-neutralisants.

### 2.B.iii. La polymérase L

La polymérase est la protéine virale la moins abondante des virions malgré son rôle absolument central dans les processus de transcription et de réplication <sup>131,132</sup>, elle est par conséquent la plus difficile à observer en condition d'infection bien qu'elle soit la plus grosse protéine virale avec 2218 acides aminés <sup>133</sup>. Elle se classe parmi les polymérases à ARN dépendantes de l'ARN, et assure les deux processus essentiels de polymérisation nucléotidique. La réplication du génome est initiée *de novo* tandis que l'initiation de la transcription passe par un « vol de coiffe » à un ARNm de la cellule-hôte opéré par le domaine N-terminal de la polymérase qui possède une activité endonucléasique <sup>134</sup> et médié par le domaine C-terminal <sup>135</sup>.



**Figure 12. Structure de la polymérase L de LASV.** Les différentes unités structuro-fonctionnelles sont présentées dans des couleurs distinctes : la paume (rouge), le lobe central (beige), le bout du doigt (violet), le pouce (marron), la bague d'archer (magenta), le lobe supérieur (vert), la pince (bleu), le connecteur (gris), le doigt (cyan), le nodule du doigt (rose), l'endonucléase (indigo), le ruban  $\alpha$  (jaune) et le couvercle (orange). Extrait de Peng *et al*, 2020 <sup>133</sup>.

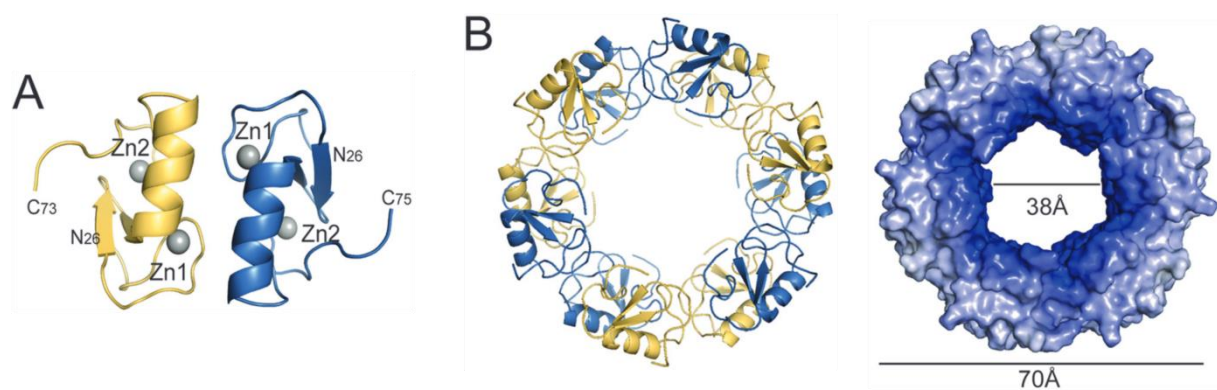
Comme la majorité des polymérases de virus à ARN négatif, celle de LASV possède une structure de type « main droite » avec une paume et des doigts qui fonctionnent en pince et permettent le repliement des structures actives autour du site catalytique (cf. **Figure 12**) <sup>136</sup>. Au sein des virions, la L est connue pour former un complexe avec la protéine de matrice Z et l'ARN viral <sup>137</sup>.

### 2.B.iv. La protéine de matrice Z

La protéine Z est une protéine à doigt de zinc (domaine RING) et c'est la plus petite – 99 acides aminés – et la plus plastique des protéines de LASV (cf. **Figure 13**),

ce qui lui confère de multiples fonctions (cf. **Figure 14**)<sup>138</sup>. Elle possède des sites d'interaction avec chacune des trois autres protéines virales : son domaine tardif est nécessaire à l'interaction avec la NP<sup>139</sup>, elle reconnaît le peptide signal de la GP par l'intermédiaire de son résidu myristoylé<sup>140</sup> et interagit avec la L via une leucine très conservée chez les *Mammarenavirus* en position 72 (L71 chez LASV)<sup>141</sup>. La capacité à interagir à forte affinité avec tous les composants protéiques d'une particule virale est une caractéristique commune des protéines de matrice qui leur permet de réaliser leur rôle structural.

La myristoylation – ajout d'un acide gras myristique sur une glycine – de la Z est une modification post-traductionnelle irréversible qui lui confère sa capacité d'ancrage membranaire dans la cellule-hôte et au niveau de l'enveloppe dans le virion<sup>142</sup>, ce qui explique son haut niveau de conservation au sein du genre *Mammarenavirus*. Son association à la membrane lui donne un rôle critique dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales, elle est même capable de former des pseudo-particules virales en l'absence des autres protéines<sup>143</sup>.



**Figure 13. Structure des formes oligomériques de la protéine Z de LASV.** A. Forme dimérique de la protéine Z, zones d'interaction avec les ions  $Zn^{2+}$  (sphères grises). B. Complexe dodécamérique de protéines Z (gauche), et modélisation du potentiel électrostatique de surface du complexe (droite). Extrait de Hastie *et al*, 2016<sup>144</sup>.

La protéine Z interagit avec un grand nombre de protéines cellulaires par l'intermédiaire de son domaine RING. Elle inhibe fortement la traduction en liant la protéine d'initiation eIF4E ce qui diminue son affinité pour la coiffe des ARNm et empêche ainsi le rapprochement de la coiffe et des ribosomes<sup>145-147</sup>. Cette diminution de la traduction ne semble pas affecter les ARNm viraux, mais le mécanisme de détournement n'est pas compris à ce jour. Elle interagit également avec des composants ribosomiaux, ce qui pourrait jouer un rôle supplémentaire dans le contrôle de la traduction.

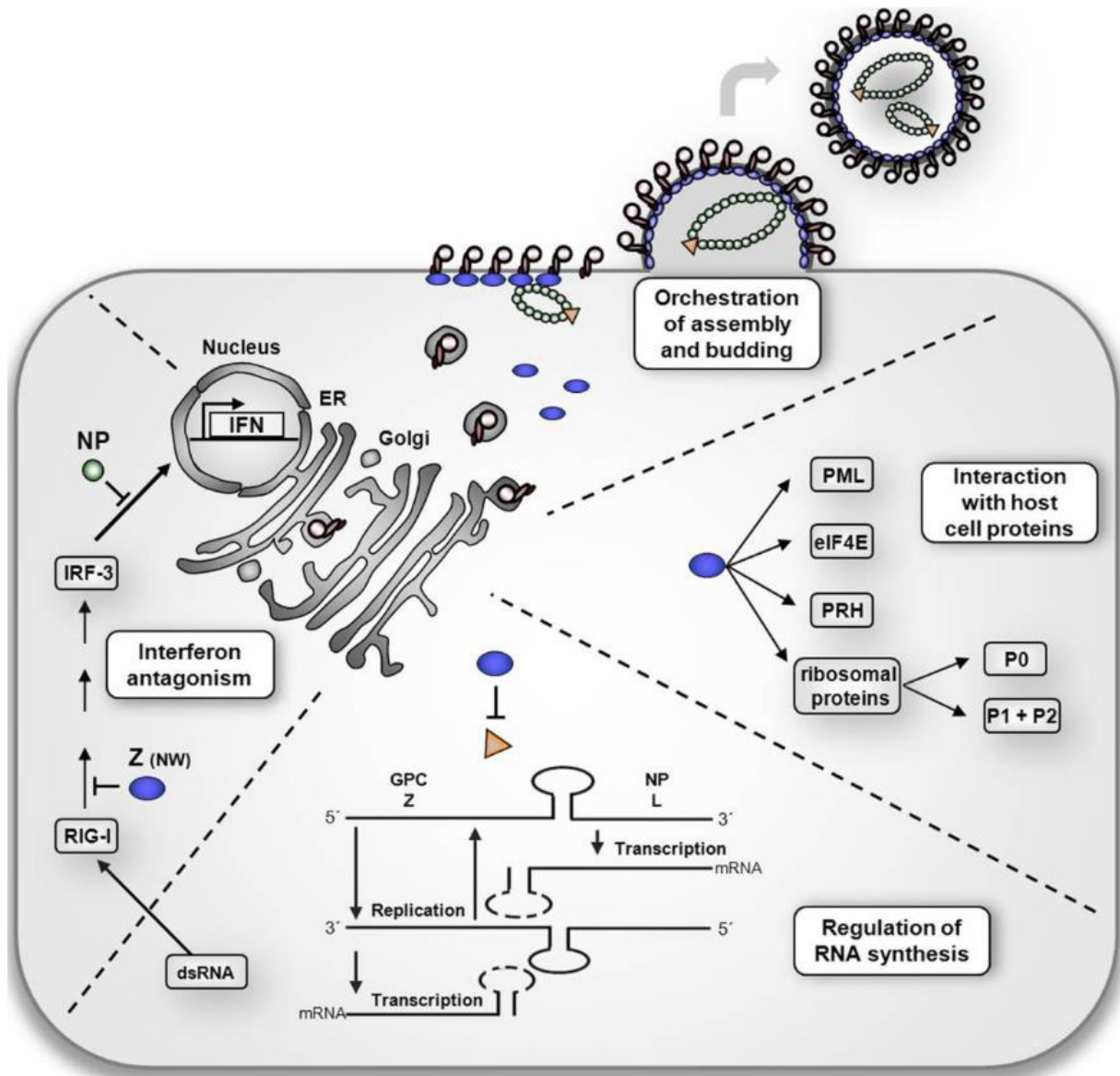


Figure 14. Les différents rôles de la protéine de matrice Z chez les *Mammarenavirus*. La protéine de matrice Z (ovale bleu) et son implication dans quatre phénomènes majeurs du cycle viral infectieux : l'organisation de l'assemblage et du bourgeonnement des particules virales, l'interaction avec des protéines centrales de l'activité de la cellule-hôte, la régulation de la réplication et de la transcription par modulation de l'activité de la L (triangle orange) et l'inhibition de la réponse IFN, spécifique des ANM. Extrait de Fehling *et al*, 2012 <sup>138</sup>.

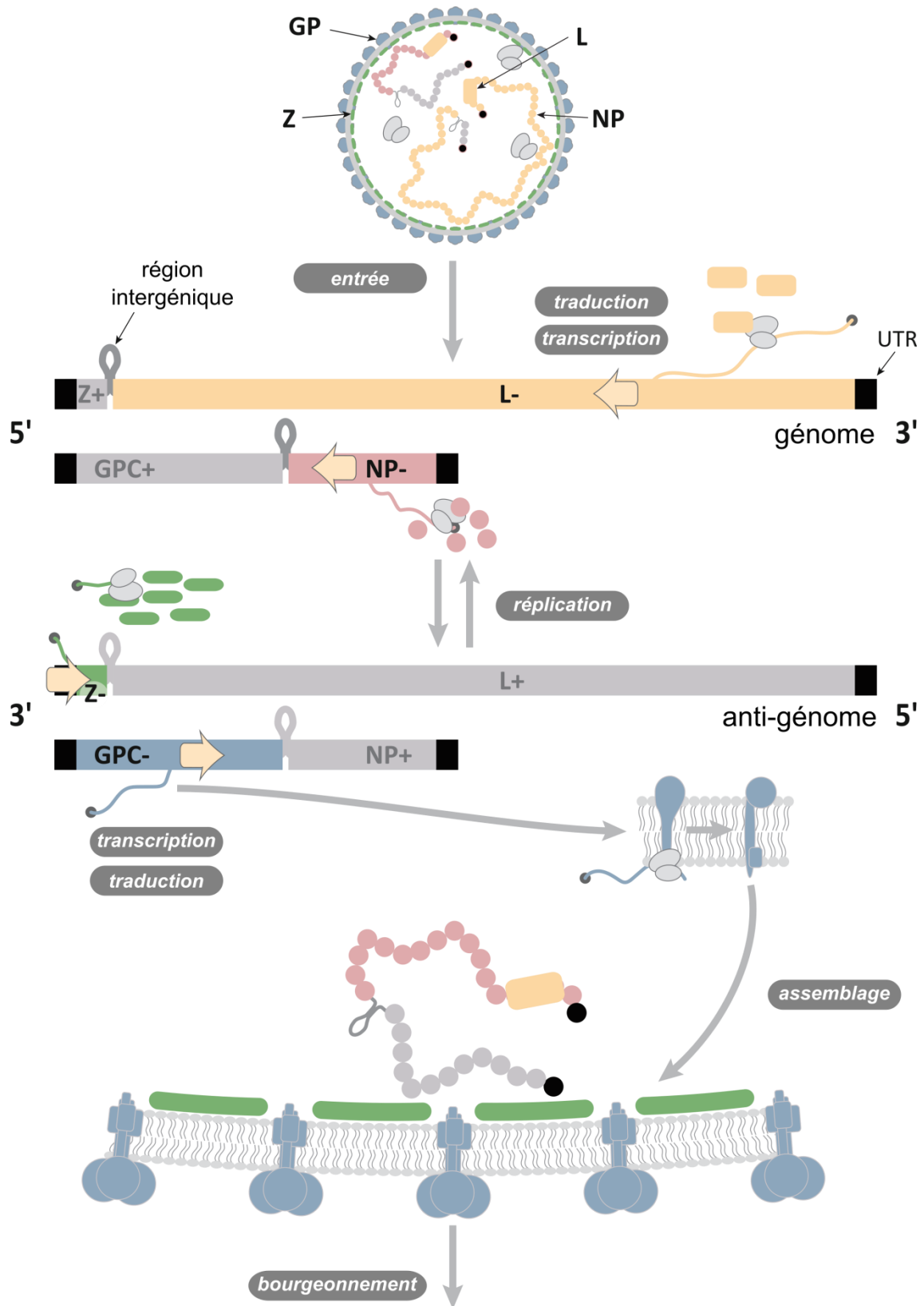
## 2.C. Le cycle viral de LASV

Le cycle viral est efficacement conservé au sein du genre *Mammarenavirus*, seul le processus d'entrée virale diverge entre les ANM et les AAM.

### 2.C.i. L'entrée virale

Chez les AAM, l'entrée virale est essentiellement médiée par l' $\alpha$ -DG, une protéine qui fait le lien – via un domaine transmembranaire – entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (MEC) et qui permet l'ancrage de la cellule au sein de celle-ci<sup>127</sup>. Cependant certains types cellulaires permissifs à l'infection par LASV comme les hépatocytes ne l'expriment pas ce qui suggère l'existence de récepteurs alternatifs<sup>148</sup> dont certains ont été identifiés : Axl, Tyro3, LSECTin et DC-SIGN<sup>149,150</sup>. Hormis ces quelques exceptions, l' $\alpha$ -DG est une protéine quasi ubiquitaire fortement exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). La fixation de la *spike* de LASV entraîne le déséquilibre de la liaison de l' $\alpha$ -DG avec les composants de la MEC et perturbe également l'interaction entre la partie intracellulaire du récepteur et les  $\alpha\beta$ -intégrines qui permettent habituellement la transduction de signaux cellulaires<sup>151</sup>. La glycosylation (O-mannosylation) de l' $\alpha$ -DG est nécessaire à l'interaction avec le complexe protéique de LASV<sup>152</sup>, il a d'ailleurs été montré récemment que la GP1 est pré-chargée avec un matriglycane libre dans les virions avant sa fixation au récepteur<sup>119</sup>. Il est par ailleurs intéressant de mentionner que le gène LARGE, codant pour une glycosyltransférase impliquée dans la glycosylation de l' $\alpha$ -DG<sup>153,154</sup>, semble avoir été l'objet d'une sélection allélique dans les régions de forte transmission de LASV, ce qui pourrait conférer une protection contre l'infection<sup>155</sup>. Après fixation, les particules virales sont internalisées par un processus peu classique de macropinocytose<sup>156</sup> de manière indépendante de la clathrine et dépendante du cholestérol<sup>157</sup> et adressées vers les endosomes tardifs. L'acidification du milieu endosomal permet un changement de conformation de la GP1 et provoque une interaction nouvelle avec la protéine LAMP1, qui facilite grandement la fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire<sup>123,158,159</sup>, sans toutefois être absolument nécessaire. Cette fusion permet le relargage des RNP dans le cytoplasme de la cellule infectée. La divergence génétique de LUJV par rapport aux autres AAM se confirme aussi au niveau de l'entrée virale, qui fait intervenir NRP2 et CD63 comme récepteur d'attachement et récepteur d'entrée en lieu et place de l' $\alpha$ -DG et LAMP1<sup>160</sup>.

Par opposition, les ANM hautement pathogènes emploient le récepteur à la transferrine 1 (TfR1) comme récepteur d'attachement<sup>161</sup>, tandis que les ANM peu ou pas pathogènes passent par des orthologues de cette protéine, ce qui peut laisser imaginer un rôle du récepteur dans la pathogénicité<sup>157</sup>. L'internalisation fait intervenir un mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine et suit a priori le trafic habituel de TfR1 dans les endosomes tardifs<sup>162</sup>. La fusion a ensuite lieu à pH très acide.



**Figure 15. Cycle réplcatif du virus Lassa.** Détail des processus de transcription, de réplcation et de traduction à l'œuvre au cours du cycle viral de LASV. Les gènes grisés sont positionnés en antisens par rapport à la transcription qui a lieu du 3'-UTR vers le 5'-UTR. Adapté de Klitting *et al*, 2020 <sup>163</sup>.

### *2.C.ii. Synthèse protéique et réplication du génome viral*

Avec le relargage des protéines virales dans le cytoplasme, la transcription/traduction des gènes viraux ainsi que la réplication génomique se met en place (cf. **Figure 15**). Il a été montré que la présence des protéines L et NP étaient suffisantes pour le processus de transcription des Arénavirus <sup>131</sup>. Le complexe réplicatif, composé d'une ou plusieurs protéines L et NP, se lie à l'ARN génomique au niveau de la séquence 3'-UTR qui contient les promoteurs des gènes viraux <sup>164</sup> et entame la polymérisation des nucléotides qui aboutit soit à la formation d'ARN antigénomiques totaux (réplication), soit à la formation d'ARNm de la L et de la NP (transcription). La production de brins antigénomiques permet conséquemment la transcription des gènes de la GPC et de la Z. Comme précisé plus haut (cf. *2.B.iii.*), l'initiation de la transcription s'accompagne d'une étape de « vol de coiffe » à un ARNm cellulaire et effectué par la L <sup>134</sup>. La formation des RNP est concomitante à la réplication virale.

Cela permet aux ARNm viraux d'avoir une structure identique aux ARNm cellulaires, et de passer par la machinerie cellulaire pour effectuer la synthèse protéique. Les protéines virales subissent ensuite les modifications post-traductionnelles adéquates (cf. **2.B.**), elles aussi assurées par la machinerie cellulaire. Le peptide précurseur GPC est adressé au réticulum endoplasmique où il est clivé en GP1, GP2 et SSP ce qui entraîne la formation de la *spike*, qui est elle-même adressée à la membrane plasmique par exocytose <sup>165</sup>.

### *2.C.iii. Assemblage et bourgeonnement des particules virales*

Comme détaillé en *2.B.iv.*, les interactions de la protéine Z avec la membrane plasmique, la GP, la NP et la L sont cruciales pour le bon déroulement de l'assemblage viral. Elles permettent en effet de regrouper tous les composants des particules virales au niveau de la membrane plasmique. Plusieurs protéines cellulaires ont été associées au processus d'assemblage et de bourgeonnement de certains Arénavirus, comme le récepteur intracellulaire cargo ERGIC-53 qui est nécessaire à la production des particules virales de JUNV et LCMV <sup>166</sup>. Aucune dépendance à des protéines cellulaires n'a encore été démontrée pour l'assemblage des particules virales de LASV. Le bourgeonnement fait intervenir le complexe ESCORT – recruté par ALIX via son interaction avec la NP et la Z – qui permet l'initiation d'une zone de courbure membranaire, finalement clivée par l'activité de la protéine Vsp4 qui relargue la particule virale <sup>167</sup>.



### 3. La pathogenèse de la fièvre de Lassa et la réponse immunitaire de l'hôte

La disponibilité des données cliniques des patients infectés par LASV est très limitée, à cause d'une combinaison de facteurs : difficulté du diagnostic, surveillance spécifique peu efficace, fort taux d'infections asymptomatiques... Ces obstacles techniques expliquent la pauvreté des connaissances dont nous disposons en la matière, bien que de rares études sur cohortes humaines nous procurent de précieuses informations qui seront détaillées ci-dessous. Malgré ça, nous sommes contraints d'avoir recours à des modèles animaux pour mieux comprendre les tenants et les aboutissants de la pathologie induite par LASV, notamment sa mise en place et les phénomènes immunitaires qui orientent le pronostic.

#### 3.A. Les données cliniques de la FL

##### 3.A.i. Manifestations cliniques de la FL

Bien que LASV représente une menace sanitaire majeure et qu'un grand nombre de personnes soient infectées annuellement, le nombre d'études transversales menées sur un échantillon représentatif de patients est très faible. La période d'incubation de l'infection virale semble être très variable en fonction des patients, elle est estimée entre 1 et 3 semaines depuis l'infection jusqu'à l'apparition des premiers symptômes <sup>168</sup>. S'en suit généralement une période de 4 à 7 jours de manifestations symptomatiques bénignes et non spécifiques assimilables à un syndrome grippal : fièvre, toux, maux de gorge, migraines, diarrhées, vomissements, arthralgie. La seule symptomatologie n'est pas suffisante pour établir un diagnostic sûr à cette phase, toutes les manifestations cliniques pouvant être causées par d'autres agents pathogènes endémiques des mêmes régions que LASV et souvent beaucoup plus prévalents : paludisme, fièvre typhoïde, arboviroses... Cela explique la difficulté de diagnostiquer efficacement la FL sans méthode moléculaire adaptée et spécifique <sup>55</sup>, et le grand nombre de malades mal diagnostiqués qui reçoivent fréquemment des traitements antipaludéens, non adaptés à leur condition mais qui toutefois ne semblent pas empirer le pronostic <sup>169</sup>. La maladie évolue ensuite vers une diminution progressive des symptômes et une phase de convalescence qui conduit à une issue favorable, ou bien vers une intensification et une diversification des symptômes qui mène à la phase hémorragique et possiblement à la mort.

Des symptômes peu spécifiques comme la pharyngite, la toux sèche, les nausées ou les douleurs gastro-intestinales sont fréquemment observés au cours de la phase précoce de la FL. La conjonctivite est aussi un des marqueurs précoces détectés chez un certain nombre de patients. Aucun de ces symptômes ne se manifeste de manière systématique, ni même dans une proportion majoritaire des cas, ce qui ne facilite en rien le diagnostic précoce.

Après la phase d'incubation de la FL, la majorité des patients (~80%) vont voir leur fièvre retomber dans les 8 à 10 jours qui suivent l'apparition des symptômes et entrer dans une phase de convalescence. Cela s'accompagne d'une baisse progressive de la virémie jusqu'à disparition complète du virus dans le sang, bien qu'il puisse persister dans certains organes pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois dans l'appareil reproducteur masculin. Si un malaise général peut être ressenti pendant quelques semaines après la fin de la fièvre, la plupart des patients récupèrent totalement de la FL. Environ un tiers des patients souffriront d'un symptôme très particulier appelé perte d'audition neurosensorielle, totale ou partielle, unilatérale ou bilatérale <sup>170</sup> et qui peut se montrer permanente dans 60% des cas où elle intervient.

Dans les 20% de cas qui progressent vers une FL sévère, on assiste à un basculement vers un syndrome caractérisé par des marqueurs de perte de l'intégrité vasculaire : œdèmes de la face et du cou, œdème pulmonaire, pétéchies, saignements souvent bénins. Environ 40% des patients sévères présentent des saignements de faible intensité au niveau d'organes et muqueuses divers (gingivorragies, épistaxis, méléna), qui ne présentent très majoritairement pas de risque vital pour les patients. En revanche, certains organes centraux commencent à montrer des signes d'insuffisance ou de dysfonction. C'est notamment le cas des fonctions hépatique et rénale qui sont impactées pendant la FL, un effet mesuré par l'accumulation d'enzymes hépatiques et d'urée dans la circulation centrale. Un syndrome de déficience respiratoire aigu (SDRA) peut aussi être diagnostiqué. Des manifestations neurologiques comme le coma ou les crises d'épilepsie ont parfois été décrites, bien qu'on ignore leur cause réelle. Enfin, des troubles de la coagulation semblent intervenir, ils sont caractérisés par une thrombocytopénie et un déficit de l'agrégation plaquettaire <sup>171</sup>. Le décès est généralement causé par un choc hypotensif, hypovolémique et hypoxique.

Il semble que la grossesse soit un facteur aggravant de la FL, le risque de mortalité pour la mère étant multiplié par 3 par rapport à une femme qui n'est pas enceinte <sup>172</sup>. Le risque de mort pour le fœtus est de plus de 60%.

Les connaissances générales sur la pathogenèse de la FL chez l'humain sont très parcellaires, en particulier sur les causes définitives de la mort des patients. En effet, les signes hémorragiques peu intenses et les lésions histologiques mineures (décrites en [3.A.iii.](#)) ne laissent en rien présager l'issue fatale de la maladie <sup>173</sup>. Les causes de la perméabilité vasculaire ne font toujours pas l'objet d'un consensus.

### *3.A.ii. Les corrélats de sévérité observés*

Deux études récentes menées sur des cohortes de patients – n=284 et n=510 – dans deux centres du Nigeria – ISTH et Owo, respectivement (cf. [Figure 6](#)) – ont permis d'établir des marqueurs associés à la sévérité de l'infection par LASV <sup>169,174</sup>. Bien que les deux centres soient relativement près l'un de l'autre, la mortalité dans la

cohorte de l'ISTH était deux fois plus élevée que dans celle recrutée à Owo (24% vs 12%).

Au sein de la cohorte de l'ISTH <sup>169</sup>, l'âge était un facteur positivement corrélé avec la mortalité, le risque d'encourir une infection létale augmentant d'un facteur 1,4 à chaque décennie supplémentaire. L'insuffisance rénale aiguë (IRA) était un syndrome très fortement associé à la mortalité (*odds ratio*, OR=15), et elle se caractérisait par des fréquences élevées de protéinurie et d'hématurie, une hausse forte de la concentration de potassium sérique et une diminution du ratio urée/créatinine dans le sang, suggérant des dommages rénaux intrinsèques. Des taux plasmatiques élevés de créatinine, d'aspartate aminotransférase (AST) et de potassium étaient des prédicteurs forts de l'issue fatale. La manifestation de saignements, de signes neurologiques (sévères ou non) et l'apparition d'œdèmes de la face et du cou étaient significativement plus fréquentes chez les patients décédés.

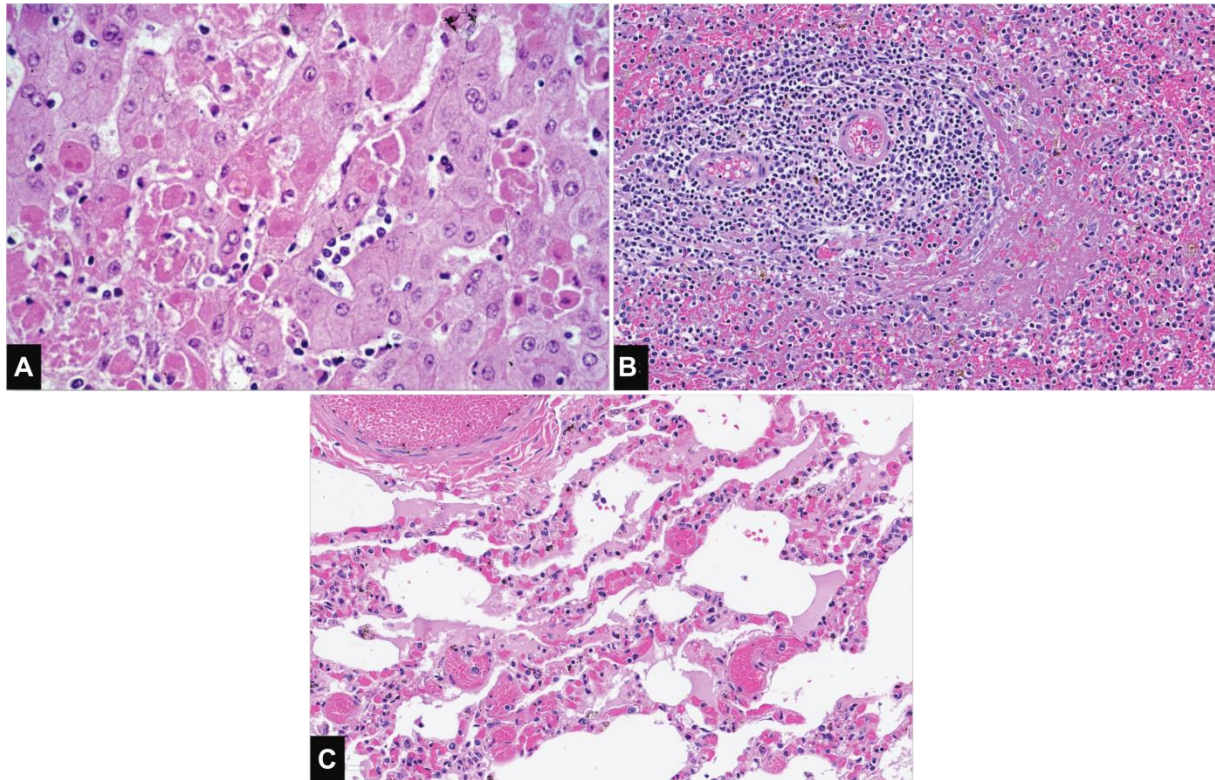
Dans la seconde cohorte <sup>174</sup>, l'âge était également un corrélat fort de la mortalité, la distinction étant faite entre plus ou moins de 45 ans, les patients les plus âgés étant les plus à risque (OR=16,3). Les cliniciens de ce centre ont utilisé des scores cliniques recommandés par l'OMS pour établir la sévérité des symptômes généraux (NEWS 2 : *National Early Warning Score 2*) et l'intensité des symptômes rénaux (KDIGO : *Kidney Disease – Improving Global Outcome*). Les scores supérieurs à 7 et supérieurs à 2, respectivement, étaient très associés à la mortalité, ainsi que le fait d'avoir une concentration plasmatique d'alanine aminotransférase (ALT) au moins trois fois supérieure à la normale, et de présenter une forte virémie (CT<30).

Ces observations montrent que les marqueurs de dysfonction rénale (IRA, KDIGO>2) et hépatique (AST, ALT) ainsi que la forte virémie peuvent être corrélés à une plus forte mortalité des patients. La sévérité des marqueurs rénaux n'a pas été retrouvée dans une étude réalisée au Sierra Leone <sup>168</sup>, ce qui suggère que les symptômes peuvent varier en fonction des régions et donc des souches de LASV.

### *3.A.iii. Analyse pathologique des tissus lors de l'issue fatale*

Les découvertes histopathologiques de la FL chez l'humain se sont longtemps limitées à une poignée d'études réalisées dans les années 1970 – 1980, s'appuyant souvent sur un nombre très limité de cas et ne permettant pas de détecter la localisation du virus dans les tissus <sup>173,175-177</sup>. Mais une nouvelle étude parue en 2022 a permis d'identifier avec des techniques beaucoup plus précises les modifications pathologiques dans les différents tissus ainsi que le tropisme viral chez l'humain <sup>178</sup>. D'une manière générale, les études s'accordent sur le fait que les modifications histopathologiques observées ne suffisent pas à expliquer la dysfonction des organes ni la sévérité de la pathologie observée lors de la FL. Détaillons les résultats obtenus dans les différents organes des patients décédés des suites de l'infection par LASV.

Le foie est l'organe qui apparaît comme étant le plus atteint par des lésions tissulaires, de nombreux foyers d'hépatocytes nécrotiques sont généralement observés, avec l'apparition de corps de Councilman, qui marquent des formes avancées de nécrose hépatocytaire. Des infiltrats inflammatoires ont également été observés et différents stades d'avancement de l'hépatite ont pu être caractérisés <sup>177</sup>. Le foie est notamment responsable de la sécrétion de tous les facteurs de coagulation, et si le niveau de nécrose observé peut entraîner des symptômes hémorragiques, il ne semble pas suffisant pour faire l'hypothèse d'une coagulopathie induite par les lésions hépatiques (cf. [Figure 16](#)).

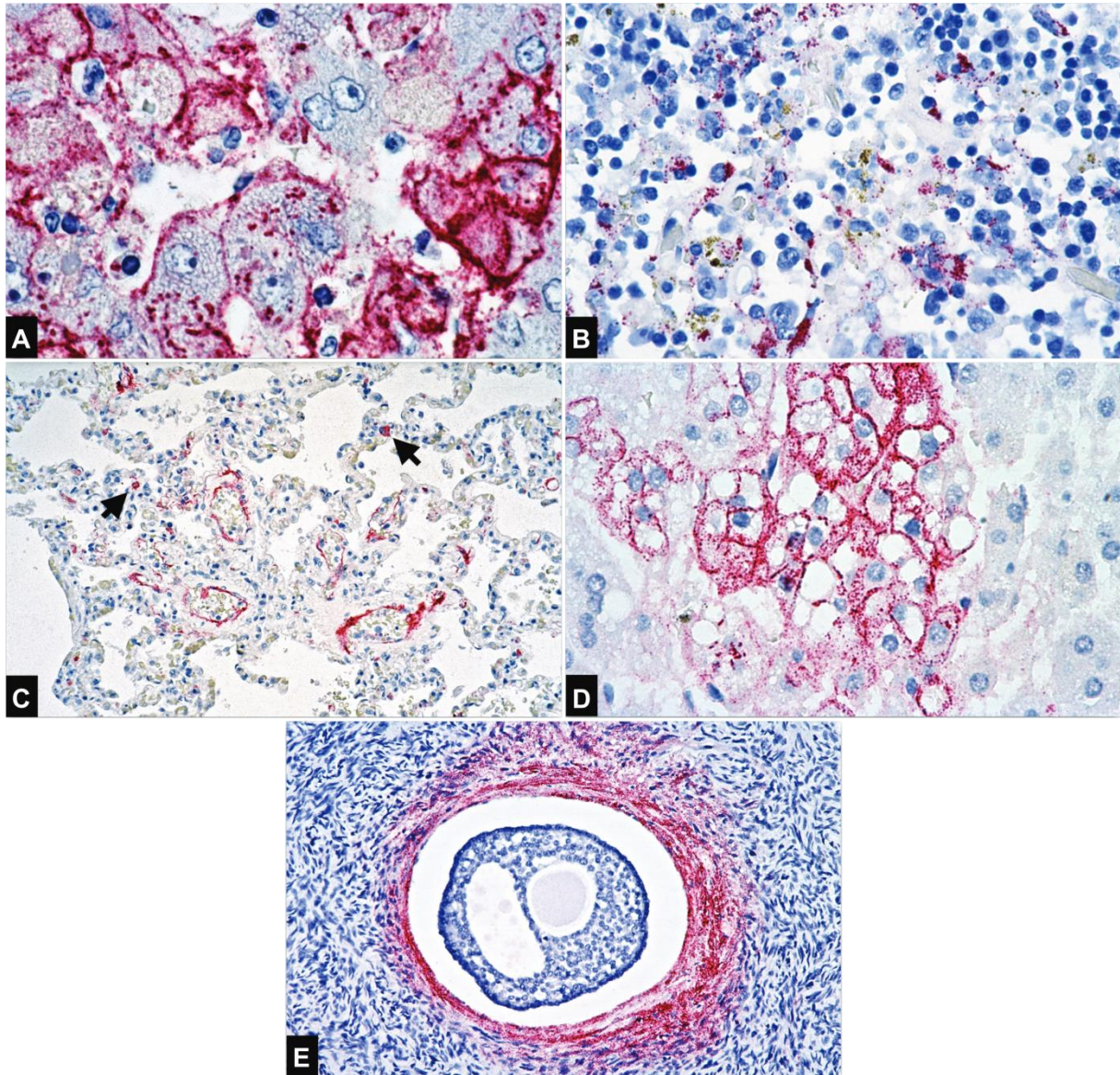


**Figure 16. Histopathologie de la FL dans le foie, la rate et le poumon humain.** Colorations HE. A. Foci d'hépatocytes nécrotiques et corps de Councilman éosinophiles. B. Foci nécrotiques dans la rate et dépôt de fibrine. C. Œdème intra-alvéolaire. Adapté de Shieh *et al*, 2022 <sup>178</sup>.

L'immunomarquage viral montre une forte permissivité des hépatocytes à l'infection par LASV, ainsi que des cellules de Kupffer (macrophages tissulaires du foie) et des cellules endothéliales sinusoidales (cf. [Figure 17](#)).

Les organes lymphoïdes secondaires (OLS), et en particulier la rate, pour laquelle on dispose du plus grand nombre d'observations, ne présentent que des modifications minimales. La structure folliculaire est dans la plupart des cas conservée, bien que l'absence de centres germinatifs ait pu être observée dans les ganglions <sup>177</sup>. Des foyers nécrotiques éosinophiles (cf. [Figure 16](#)), associés à des dépôts de fibrine ont parfois été décrits dans la périphérie des zones lymphoïdes de la rate et dans la zone marginale splénique (ZMS). Ces observations ne permettent toutefois pas de mettre en avant une pathologie avancée dans les OLS. L'identification des cibles cellulaires de

LASV met en évidence la présence des antigènes viraux dans les CPA, à savoir les macrophages/monocytes et les DC (cf. [Figure 17](#)).



**Figure 17. Immunodétection de LASV dans des tissus humains.** Immunohistochimie chromogénique (Fast red), contre-coloration à l'hématoxyline. A. Foie : foci d'hépatocytes infectés autour des zones nécrotiques. B. Rate : macrophages et cellules dendritiques infectées. C. Poumon : cellules endothéliales positives pour les antigènes de LASV. D. Zone corticale des glandes surrénales : foci de cellules infectées dans les zones fasciculée et réticulée. E. Ovaire : cellules des thèques interne et externe infectées. Adapté de Shieh *et al*, 2022 <sup>178</sup>.

**Les poumons** sont légèrement atteints, on identifie une légère pneumonie interstitielle caractérisée par l'infiltration de cellules mononucléées, de polymorphonucléaires (PMN) et de rares mégacaryocytes <sup>176</sup>. La congestion des voies pulmonaires observées chez les patients semble s'expliquer par la présence d'œdème alvéolaire (cf. [Figure 16](#)). Ce dernier apparaît par ailleurs comme une conséquence de

l'infection des cellules endothéliales pulmonaires, très nette en immunomarquage, et qui pourrait causer une hausse de la perméabilité vasculaire (cf. [Figure 17](#)).

**Les glandes surrénales** présentent également des foyers de nécrose dans la zone corticale, et en particulier dans la zone fasciculée, responsable de la sécrétion des glucocorticoïdes (cortisone et cortisol) <sup>173</sup>. Il faut toutefois contraster ce constat en précisant que ces foyers sont rares et ne permettent pas à eux seuls de supposer une insuffisance dans la fonction surrénalienne. Les zones fasciculée et réticulée présentent cependant un fort taux d'infection par LASV (cf. [Figure 17](#)).

**Le rein** ne présente que très peu de changements histopathologiques, et l'étude récente de Shieh *et al.* ne s'y est malheureusement pas consacré. Nous ne disposons donc que de données anciennes, décrivant de rares zones de nécrose dans les tubules rénaux et dans les glomérules, ainsi que des évènements peu fréquents d'infiltration de lymphocytes <sup>175</sup>. Ces observations contrastent cependant fortement avec la hausse significative de la créatinine et les marqueurs d'IRA mesurés récemment chez des patients au Nigéria (cf. [3.A.ii.](#)) <sup>169</sup>.

**Le système reproducteur** ne présente pas de lésions apparentes, mais il est important de signaler que le virus LASV y a été détecté dans plusieurs tissus, suggérant la possibilité de phénomènes de transmission verticale de la mère au fœtus. En effet, le virus a été détecté à la fois dans l'endomètre, dans les trompes de Fallope, dans les cellules stromales ovariennes et dans les thèques internes et externes, sans toutefois être présent dans l'ovule (cf. [Figure 17](#)). En revanche les trophoblastes placentaires, qui entourent l'embryon et forment le futur placenta peuvent être atteint par l'infection <sup>178</sup>. Par ailleurs, les cellulaires épithéliales mammaires, sécrétrices du lait maternel, sont également atteintes par l'infection ce qui suggère une autre voie de transmission verticale de la mère à l'enfant possible : l'allaitement.

Le [Tableau 1](#) récapitule les cibles du tropisme de LASV chez l'humain et prévoit les manifestations cliniques qui pourraient en découler. On notera que dans tous les organes investigués les cellules endothéliales semblent être une cible préférentielle de LASV, et que l'infection au niveau des différentes muqueuses participe probablement à la transmission horizontale entre les individus.

**Tableau 1. Tropisme de LASV chez l'humain et implications pathogéniques.** Adapté de Shieh *et al*, 2022 <sup>178</sup>.

Tropisme tissulaire	Tropisme cellulaire	Implications cliniques	Implications pathologiques
Foie	Hépatocytes, cell. sinusoidales, dont cell. de Kupffer et cell. endothéliales	Transaminite ; une forte nécrose hépatique peut causer des saignements	Domages cytopathiques aux hépatocytes peuvent causer une baisse de la production des facteurs de coagulation
Cellules endothéliales et système phagocytaire	Cell. endothéliales, macrophages tissulaires, cell. dendritiques	Choc systémique, œdème de la face et pulmonaire, dyspnée, thrombocytopenie, transmission verticale de LASV : cell. endothéliales infectées dans le fœtus	Réponses immunes systémiques : sécrétion de cytokines, d'IFN et autres médiateurs inflammatoires, perméabilité vasculaire accrue, modification de la sécrétion de substances
Muqueuses	Cell. endothéliales et macrophages dans les muqueuses nasale, orale et conjonctive	Hémorragie sous-conjonctivale, œdème et douleur pharyngés, transmission de LASV par les écoulements nasaux, la salive et les larmes	Congestion des muqueuses et œdème causé par la pathologie vasculaire
Membranes séreuses	Cell. mésothéliales pleurales, péricardiques et péritonéales	Epanchements pleural et péricardique, ascites	Aggrave la défaillance cardiaque et respiratoire si l'épanchement est conséquent
Organes reproducteurs et endocrines	Cell. épithéliales mammaires, cell. corticosurréaliennes, cell. de la thèque et du stroma ovarien, cell. trophoblastiques dans le placenta	Transmission verticale de LASV par allaitement et voie trans-placentaire, la mortalité accrue des femmes enceintes pourrait être causée par des effets hormonaux (œstrogène)	Une interaction entre l'infection par LASV et les hormones (cortisol, œstrogène, progestérone), qui pourrait faciliter l'entrée virale en agissant sur les récepteurs ou affecter la réponse immune

### 3.B. Les modèles animaux d'études des Arénavirus

Comme la partie précédente vient de le démontrer, l'accès à du matériel biologique humain provenant des pays endémiques est difficile, en plus de se heurter à des problématiques éthiques évidentes. Le recours à des modèles animaux, pour étudier la pathogenèse de l'infection virale dans des conditions contrôlées, ainsi que pour mettre à l'épreuve les différentes pistes vaccinales et curatives, est par conséquent nécessaire. Cela inclut des modèles murins, des modèles cobayes et des modèles de primates non humains (PNH).

### 3.B.i. Les modèles murins

Les souris immunocompétentes ne déclenchent généralement pas de pathologie associée à l'infection par LASV, c'est pourquoi l'utilisation de souches mutantes ou humanisées est nécessaire pour l'étude de la FL en modèle murin. D'une manière générale, les modèles murins sont très utiles pour les expériences qui nécessitent un grand nombre d'individus, comme par exemple les criblages de drogues ou d'antiviraux

179.

#### *Souris IFNAR<sup>-/-</sup>*

L'infection de souris délétères pour le récepteur des IFN  $\alpha$  et  $\beta$  entraîne une pathologie aiguë mais non létale des animaux, caractérisée par une virémie persistante<sup>180</sup>, une perte de poids et la détection de charge virale dans les organes systémiques (poumon, foie, cerveau, rein, cœur)<sup>181</sup>. Un modèle de souris chimère généré à partir d'une souche IFNAR<sup>-/-</sup> qui a été irradiée et dont la moelle osseuse a été transplantée à partir de souris C57BL/6, a quant à lui permis de récapituler la pathologie de la FL, avec une létalité de 100%<sup>182</sup>. Lors de l'infection, ces souris présentent des niveaux élevés d'enzymes hépatiques, de l'infiltration de cellules immunitaires dans les organes systémiques et des signes forts de perméabilité vasculaire. La différence de létalité observée entre la souche IFNAR<sup>-/-</sup> et la souche chimérique montre par ailleurs l'implication forte de la réponse immunitaire dans la pathologie.

#### *Souris STAT1<sup>-/-</sup>*

STAT1 est un facteur de transcription impliqué en aval des voies de signalisation des IFN $\alpha/\beta/\gamma$  et de l'IL6. L'infection de souris déficientes pour ce gène entraîne une pathologie très rapprochée de celle observée chez l'humain<sup>183</sup>. La différence de sévérité induite par les différentes souches de LASV est notamment conservée dans ce modèle, et la perte d'audition neurosensorielle est également un symptôme fréquent chez ces souris après l'infection par LASV<sup>184</sup>. Cela en fait le seul modèle pertinent aujourd'hui pour étudier la surdité induite chez certains patients survivants, et les résultats suggèrent un mécanisme immunopathologique à l'origine de ce symptôme. La dissémination virale dans les organes systémiques est très forte, et les souris présentent des niveaux élevés d'enzymes hépatiques ainsi que des lésions et des dépôts de fibrine dans la rate notamment. Il est important de préciser que le *knockout* de STAT1 n'empêche pas toute la signalisation des voies de l'IFN, à l'inverse du modèle IFNAR<sup>-/-</sup>, c'est pourquoi une réponse lymphocytaire minimale peut avoir lieu et influencer sur la pathologie.

#### *Souris HHD*

Des souris humanisées – exprimant une construction chimérique humain/souris appelée HLA-A2.1 à la place du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe



Le murin classique – ont montré une certaine sensibilité à l'infection par LASV, avec environ 20% de mortalité <sup>185</sup>. La pathologie pulmonaire était sérieuse, avec un épanchement pleural, un épaississement pariétal et un œdème pulmonaire conséquents. La déplétion des LT CD4+ et CD8+ dans ce modèle aboutissait à une disparition presque totale des manifestations pathologiques malgré la virémie, ce qui suggère une participation des LT CD4+ et CD8+ aux mécanismes pathologiques observés lors de la FL.

Si les modèles murins d'infection par LASV peuvent constituer des outils intéressants pour la mise à l'épreuve de prototypes vaccinaux ou de traitements, ils sont généralement trop éloignés de la pathologie humaine pour être satisfaisants pour les études de pathogénèse. Cependant, le modèle de souris STAT1<sup>-/-</sup> présente un intérêt pour l'étude des mécanismes à l'origine de la perte d'audition neurosensorielle.

### *3.B.ii. Les modèles cobayes*

Le cobaye est un autre rongeur qui est utilisé comme modèle d'infection létale par LASV, bien que la pathologie soit très dépendante du fond génétique des animaux. Seules les souches S13 et Hartley sont utilisées pour l'étude de la FL : la souche S13 est issue de croisements internes successifs menant à une forte consanguinité qui la rend vulnérable à l'infection par LASV <sup>186</sup> tandis que le modèle de FL induit chez la souche Hartley nécessite plusieurs passages successifs du virus chez le cobaye avant d'induire une pathologie létale. Les cobayes rencontrent de nombreux symptômes qui atteignent généralement leur pic d'intensité entre 10 et 15 jours post-infection <sup>187</sup>, et qui incluent notamment une dissémination pantropicque du virus associée à l'inflammation des organes : pneumonie interstitielle, hépatite, néphrite et myocardite. L'inflammation du cœur est d'ailleurs un symptôme spécifique du cobaye qu'on ne retrouve pas chez l'humain ni dans les autres modèles, en tous cas pas au même niveau d'intensité <sup>188</sup>. De récentes études chez le cobaye ont permis d'inventorier dans le détail les tissus permissifs à l'infection par LASV <sup>189,190</sup>. Elles ont notamment mis en évidence l'infection des cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques, de l'urothélium rénal, de l'épiderme, de cellules des tubes séminifères, des différentes couches de la thèque ovarienne, de l'uvée et de l'endothélium cornéen. Ces études ont permis d'identifier de nouveaux tissus cibles de LASV et ouvrent la porte à des investigations plus approfondies de ces tissus, chez le cobaye mais surtout dans d'autres modèles plus proches de l'humain.

La pathologie observée chez le cobaye est assez proche de celle observée chez l'humain, il apparaît que les symptômes histopathologiques sont possiblement même plus avancés chez le cobaye (déstructuration forte des follicules spléniques, myocardite). Il est toutefois très compliqué de se procurer des cobayes S13 à des fins de recherche, les élevages en produisant peu, et la souche Hartley nécessite une adaptation du virus

peu pratique et non physiologique pour récapituler la pathologie de la FL, ce qui n'en fait pas un modèle très aisé à utiliser dans des études de grande ampleur.

### *3.B.iii. Les modèles de PNH*

Les PNH possèdent la plus grande proximité phylogénétique avec l'humain, ce qui s'accompagne de similitudes fortes quant à la morphologie, la physiologie et la mise en place des mécanismes de l'immunité. De nombreuses espèces de PNH ont été utilisées depuis plusieurs décennies pour modéliser la pathologie induite par l'infection par LASV : le ouistiti <sup>191</sup>, le singe écureuil <sup>192</sup>, le capucin, le babouin hamadryas <sup>193</sup>, le singe vert <sup>194</sup> et les macaques rhesus <sup>195</sup> et cynomolgus <sup>196</sup>. Si plusieurs de ces espèces développent une pathologie approchante de celle de l'humain, depuis une quarantaine d'années la majorité des études sont réalisées avec des singes rhesus ou cynomolgus. Nous disposons donc d'une meilleure connaissance de ces modèles, en particulier du singe cynomolgus qui constitue aujourd'hui le modèle standard d'étude de la FL.

L'infection par LASV du singe cynomolgus entraîne une batterie de symptômes comparables à ceux observés chez l'humain : fièvre, perte de poids, déshydratation, oedèmes, dépression, troubles neurologiques, dyspnée et epistaxis <sup>196,197</sup>. L'évolution de la formule sanguine des singes au cours de l'infection est également similaire à celle décrite chez l'homme, avec une lymphopénie et une thrombocytopénie transitoires suivies d'une lymphocytose causant une splénomégalie. Le virus est pantropique chez le singe cynomolgus, on le retrouve notamment dans le foie, les OLS, le rein, les poumons, les glandes surrénales, le cerveau et le système reproducteur <sup>196,198</sup>. L'histopathologie se caractérise par des foyers nécrotiques dans le foie et les glandes surrénales, avec des dépôts de fibrine dans les tissus. On détecte aussi des infiltrations de cellules mononucléées dans de nombreux organes systémiques, causant hépatite, néphrite, encéphalite et pneumonie interstitielle. Les cellules cibles de l'infection sont en tous points comparables à celles identifiées chez l'humain, elles incluent les hépatocytes, les CPA, les cellules endothéliales et les cellules surrénaliennes principalement. Par ailleurs, la dose infectieuse, la voie d'infection et la souche de LASV utilisée peuvent avoir un impact fort sur l'issue de la maladie <sup>197,198</sup>. Dans les cas fatals, la mort des animaux survient généralement entre 10 et 15 jours post-infection (jpi) et s'accompagne de marqueurs de dysfonction hépatique (AST, ALT) et rénale (urée, créatinine).

Le singe cynomolgus est également un modèle de choix pour les études précliniques vaccinales, car il présente des réponses immunitaires similaires à celles de l'humain <sup>199,200</sup>. Tous ces critères en font aujourd'hui un modèle très utilisé pour l'étude de la FL, et ce malgré les difficultés pour se procurer ces animaux, leur coût élevé et les problématiques éthiques liées à leur utilisation.

### 3.C. Modèle de physiopathogenèse de la FL

Nos connaissances sur les mécanismes pathogéniques à l'œuvre lors de la FL sont très limitées, et si nous disposons d'indices a priori robustes sur certaines étapes de la mise en place de la pathogenèse, le modèle généralement admis repose sur un certain nombre de suppositions. Nous allons détailler ci-après le modèle qui fait consensus quant à la dynamique des phénomènes pathogéniques lors de la FL.

Les voies naturelles d'infection d'un individu par LASV sont semble-t-il multiples. Si le mécanisme le plus intuitif reste l'inhalation de virus aérosolisé (ou de poussières contaminées) et l'infection via la muqueuse respiratoire, nous ne pouvons pas exclure l'infection par ingestion de nourriture contaminée par LASV. En milieu contrôlé, les deux voies d'infection ont été validées, chez le PNH pour l'infection par aérosol<sup>88,201</sup> et sur des modèles d'épithélium polarisés pour l'infection via le tractus intestinal<sup>202</sup>. La possibilité d'une voie d'infection via les lésions de la peau ou d'autres épithéliums (morsure de rongeur) est à envisager, même si elle semble assez anecdotique. Par ailleurs, plusieurs voies d'infection ont été testées chez le PNH et cela ne semble pas induire de différence dans la pathologie observée. De manière générale, les muqueuses, qui sont des tissus destinés à être au contact du milieu extérieur, sont des zones qui contiennent une grande quantité de CPA pour la prise en charge rapide de potentiels antigènes. Or LASV a démontré un tropisme fort pour les CPA *in vitro*<sup>203,204</sup> et *in vivo*<sup>178,189,196</sup>, ce qui peut laisser supposer que les CPA constituent soit la première population infectée par le virus, soit des cibles très précoces qui s'infecteraient au contact d'autres cellules (épithéliales ou stromales) infectées localement. La réplication virale précoce dans la peau, détectée au site d'injection dans les singes de notre étude, semble plutôt orienter vers la deuxième hypothèse<sup>198</sup>.

Le modèle de pathogenèse suppose ensuite la migration des CPA infectées vers les OLS (ganglions et rate), qui agiraient comme un incubateur fertile pour la réplication virale et faciliteraient l'augmentation de la virémie, ce qui est nécessaire à l'infection systémique. Les processus qui permettent la dissémination sont peu clairs et on évoque généralement une infection systémique des organes causée par la présence de virus dans le sang et la lymphe. Toutefois, chez le PNH, on détecte une virémie même chez les animaux qui ne progressent pas vers une FL sévère, et cette virémie ne s'accompagne pas d'une infection systémique, celle-ci restant cantonnée aux OLS<sup>198</sup>. D'autres mécanismes qui permettent d'expliquer ces différences entrent certainement en jeu lors de la dissémination virale dans les organes non lymphoïdes, mais ils ne sont pas compris à ce jour. Toujours est-il que lors de l'infection fatale, le virus a un comportement pantropique, il est retrouvé dans le foie, les reins, les glandes surrénales, l'encéphale, le poumon, l'intestin, le pancréas, le cœur et l'endothélium. L'infection des cellules n'a a priori pas d'effet cytopathique fort, même si des foyers d'hépatocytes et de cellules surrénaliennes nécrotiques sont détectés chez le PNH et l'humain, ne

remettant cependant pas en cause l'intégrité de ces tissus <sup>178,196</sup>. L'infiltration de monocytes/macrophages infectés dans les tissus atteints par l'infection médiée par des chimiokines pourrait contribuer à l'amplification de l'infection des organes systémiques. Quoiqu'il en soit, les rares atteintes histopathologiques observées ne présentent pas une sévérité suffisante pour expliquer les insuffisances hépatique, rénale et parfois pulmonaire décrites lors des infections fatales. L'atteinte hépatique se caractérise par une forte augmentation des taux d'AST et ALT plasmatiques <sup>191,195-198</sup>. En parallèle et dans de rares cas peuvent survenir des manifestations neurologiques, caractérisées par une encéphalite chez le singe cynomolgus. L'encéphalopathie chez l'humain est associée à une présence du virus dans le liquide cébrospinal où il semble pouvoir perturber après la résolution de l'infection <sup>205</sup>.

La survenue d'hémorragies non bénignes n'a pas été décrite, et les signes hémorragiques détectés ne permettent pas d'expliquer l'issue fatale de l'infection. La mort intervient après un choc terminal hypotensif, comparable à ce qui est observé lors du sepsis. La proximité entre la pathologie de la FL létale et celle du choc septique a d'ailleurs été caractérisée <sup>198</sup>.

Des troubles de la coagulation ont été décrits, avec notamment une légère thrombocytopénie et une diminution de l'agrégation plaquettaire <sup>171,206</sup>. Les marqueurs de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), un phénomène mis en cause dans le choc terminal des Filovirus <sup>207</sup>, n'ont pas été identifiés au cours de la FL.

De même, la tempête cytokinique décrite lors de la phase terminale de l'infection par les Filovirus et d'autres FHV, et qu'on pense jouer un rôle dans la perméabilité vasculaire, est discutée pour la FL. Certaines études chez le singe cynomolgus ont cependant bien mis en évidence une dérégulation forte des cytokines pro- et anti-inflammatoires au moment du stade terminal <sup>197,198</sup>.

En somme, nombre de symptômes et atteintes histopathologiques légères ont été identifiées lors de la FL, mais nous ne comprenons toujours pas aujourd'hui quels sont les facteurs qui provoquent la mort des patients infectés.

### **3.D. Les réponses immunitaires à l'œuvre lors de l'infection**

Lors d'une infection ou plus généralement de l'invasion du milieu intérieur par un antigène extérieur, se mettent en place les mécanismes de l'immunité, qui sont séparés entre immunité innée et immunité adaptative. L'immunité innée est rapide, non spécifique de l'antigène et n'induit généralement pas de réponse mémoire, bien que la notion « d'immunité entraînée », décrite depuis une dizaine d'années mette en avant des phénomènes épigénétiques possibles de mémoire de l'immunité innée <sup>208-210</sup>. L'immunité innée se caractérise par l'action conjointe de multiples acteurs, parmi lesquels les cellules phagocytaires – monocytes/macrophages, cellules dendritiques (DC)

et neutrophiles –, les cellules *Natural Killer* (NK) mais aussi des facteurs solubles comme le complément et nombre de cytokines. L'immunité adaptative met quant à elle en jeu une réponse spécifique – adaptée – à l'antigène responsable de l'invasion du soi, et est par conséquent plus lente à intervenir. Les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB) en sont les acteurs majoritaires, et à la fin de l'infection, une partie de ces populations spécifiques de l'antigène vont perdurer, devenant des populations mémoires prêtes à être réactivées et à proliférer en cas de nouveau contact avec l'agent responsable de l'invasion. La réponse adaptative peut être cellulaire, impliquant essentiellement les LT, ou bien médiée par les Ig (anticorps) qui sont produites par des LB hautement différenciés appelés plasmocytes et relarguées dans le système circulant. Dans tous les cas, des interactions fortes ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) entre les CPA, les LT et les LB pour assurer la mise en place d'une réponse adaptative efficace.

### *3.D.i. La réponse innée*

**Les cellules présentatrice d'antigènes :** Les monocytes, les macrophages et les DC jouent un rôle majeur dans la réponse innée grâce à leur capacité à phagocyter les antigènes reconnus comme du « non soi » et à induire la sécrétion de signaux cytokiniques importants pour la détection systémique de l'infection. En migrant dans les OLS et en présentant des fragments d'antigènes de l'agent invasif à leur surface, complexés aux molécules du CMH de classe II, ils permettent l'initiation de la réponse adaptative spécifique via l'interaction avec les LT qui résulte en leur activation. On distingue les DC immatures, qui ont une forte activité phagocytaire, des DC activées qui perdent leur capacité à phagocyter mais surexpriment le CMH de classe II à leur surface, ainsi que des marqueurs de migration comme CCR7 et des molécules de costimulation comme CD40, CD80 et CD86, qui sont nécessaires à l'activation spécifique des LT. La maturation des DC peut être induite par la phagocytose ou par des signaux cytokiniques paracrines, et elle potentialise la sécrétion de cytokines par les DC, notamment les IFN de type I. L'activation des DC est un prérequis pour leur migration vers les OLS et la présentation antigénique aux LT <sup>211</sup>.

On pense que les CPA sont les cibles primaires de l'infection par LASV dans l'organisme. A 7 jpi, de nombreuses CPA sont infectées chez le singe cynomolgus <sup>196</sup>. Leur permissivité à l'infection par LASV *in vitro* a également été démontrée <sup>203,204,212,213</sup>, et il semble que l'infection résulte en une incapacité des CPA à s'activer et à entrer dans un processus de maturation, malgré une forte réplication virale mesurée dans les surnageants des DC. L'infection n'impacte pas la viabilité des CPA, mais n'induit pas la présence des facteurs de costimulation à leur surface ni la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires <sup>203,214</sup>. Cette infection « silencieuse » des CPA pourrait jouer un rôle important dans l'immunosuppression observée dans les cas fatals de FL. A l'inverse, l'infection des macrophages par le virus Mopeia (MOPV), un Arénavirus très

proche de LASV mais non pathogène, est productive et entraîne la mise en place des marqueurs de costimulation CD40, CD80 et CD86 et le relargage d'IFN de type I et d'IL6<sup>215</sup>. Cette différence nette d'activation des CPA engendrée par la mise en contact avec LASV ou son homologue non pathogène MOPV a également été décrite dans les DC plasmacytoïdes (pDC). Bien que cette population ne se soit pas montrée permissive à l'infection, le contact avec MOPV a induit une plus forte activation de la sécrétion d'IFN de type I par les pDC que celui avec LASV<sup>216</sup>. Il faut toutefois préciser que tous les résultats précédemment décrits – à l'exception de ceux relatifs aux pDC – ont été obtenus à partir d'un modèle de DC artificiellement dérivées de monocytes humains, appelées moDC. Or ce modèle présente des différences avec les DC myéloïdes (mDC) natives. Une étude plus récente a investigué la réponse à l'infection par LASV de mDC isolées à partir de poches de sang humain, et les résultats contrastent ceux décrits précédemment<sup>213</sup>. En effet, si les mDC ont montré une permissivité à l'infection, elles ne répliquent que peu efficacement LASV. Par ailleurs, l'infection a induit leur activation et leur maturation (mesurée par l'expression de CD40, CD80 et CD83), contrairement à ce qui avait été décrit avec les moDC, ainsi que la production effective d'IFN de type I et d'autres facteurs solubles (IL6, IL10, IL15, VEGF, TNF $\alpha$ ). De manière intéressante, la co-culture des mDC infectées par LASV avec des LT naïfs ne résultait pas en l'activation de ces derniers, tandis que les mDC infectées par MOPV induisaient efficacement une réponse cytotoxique des LT co-cultivés. Les auteurs étaient également surpris de constater que la mise en contact des mDC activées par l'infection par LASV avec les LT entraînait une inhibition de l'activation des mDC.

En somme, l'infection des CPA par LASV semble résulter en une incapacité de ces cellules, pourtant centrales dans la mise en place de la réponse adaptative, à présenter efficacement les antigènes viraux aux lymphocytes et à induire une réponse de ces derniers. Il est probable que l'inactivation des CPA participe à l'absence générale de réponse adaptative observée dans les cas de FL sévères.

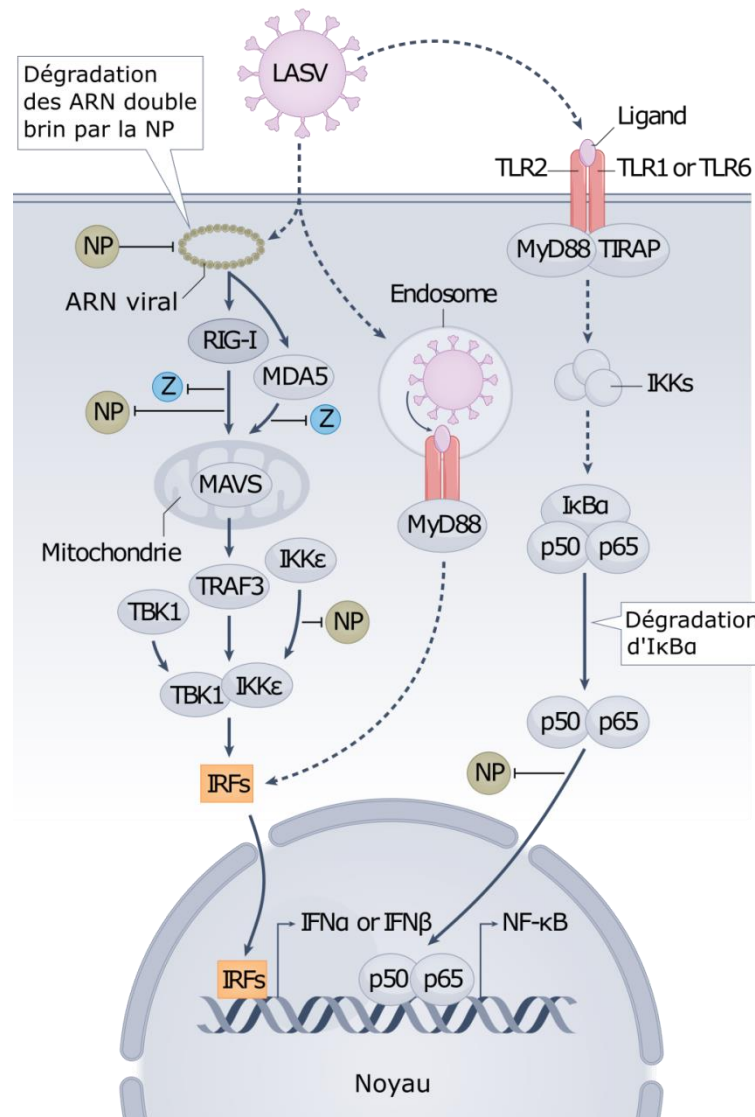
**La réponse inflammatoire cytokinique :** En conséquence de la détection d'antigènes du « non soi » ou de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) via la voie des PRR, les cellules immunitaires sécrètent des facteurs solubles appelés médiateurs de l'inflammation et incluant notamment les interférons, les cytokines et les chimiokines. Ces médiateurs ont des activités signalisantes, auprès de nombreux acteurs systémiques de l'inflammation et de l'immunité adaptative. Les cytokines sont généralement catégorisées en pro- et anti-inflammatoires et orientent la réponse du système immunitaire en fonction du pathogène rencontré. Les chimiokines sont impliquées dans la migration des cellules immunitaires vers les sites d'activation (OLS) ou les zones d'inflammation. Les cellules migratoires sont capables de remonter le gradient de concentration des chimiokines adaptées par un phénomène appelé chimiotactisme, ce qui permet leur adressage vers les tissus qui subissent l'infection.

Les interférons sont de trois types : type I (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$  essentiellement), type II (IFN $\gamma$ ) et type III (IFN $\lambda$ ) et ils sont sécrétés par des types cellulaires différents – tous types de cellules, cellules immunitaires et cellules épithéliales, respectivement – lors des infections virales uniquement. La reconnaissance des motifs viraux à l'intérieur des cellules par les PRR ou les *RIG-I-like receptors* (RLR : RIG-I, MDA5) entraîne la sécrétion des IFN (cf. **Figure 18**). Les IFN ont une action autocrine et paracrine et leur fixation sur le récepteur membranaire entraîne une cascade de signalisation qui aboutit à la transcription et la traduction d'une centaine de gènes spécialisés dans la réponse antivirale, les *IFN-stimulated genes* (ISG) <sup>217</sup>.

Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence que la présence d'IFN de type I – et pas des types II et III – dans le milieu restreignait fortement la réplication de LASV dans les CPA <sup>204</sup>. L'importance de l'IFN dans le contrôle de l'infection par LASV est encore soulignée par le fait que les souris immunocompétentes sont insensibles à l'infection par LASV mais que les souches déficientes pour la voie de l'IFN (IFNAR<sup>-/-</sup>, STAT1<sup>-/-</sup>) présentent une pathologie plus ou moins sévère <sup>180</sup>. *In vivo*, on a pu constater qu'une expression précoce et transitoire d'IFN $\alpha$  était corrélée à la survie des singes cynomolgus, tandis qu'il n'était détectable que très tardivement chez les singes décédés <sup>197</sup>. Ces éléments abondent tous dans le sens d'un rôle crucial de l'IFN, et notamment des IFN de type I, dans le contrôle de l'infection par LASV via l'expression des ISG. Certaines protéines issues de l'expression des ISG, comme la *tetherin*, ont par ailleurs montré des activités de restriction de la prolifération de LASV <sup>218</sup>.

La réponse inflammatoire cytokinique, bien que nécessaire à la prise en charge efficace de l'infection, peut s'avérer délétère lorsqu'elle est dérégulée. Il a été décrit lors des FHV un phénomène de tempête cytokinique (*cytokine storm*) précédant le choc terminal et caractérisé par de fortes doses plasmatiques de nombreuses cytokines dont certaines constituent des signaux antagonistes pro- et anti-inflammatoires <sup>219</sup>. Si ce syndrome a été nettement décrit chez les patients infectés par le virus Ebola, il semble moins évident chez les patients atteints de la FL <sup>220</sup>. En effet, les profils peuvent être inconsistants d'un cas à l'autre, comme cela a été décrit dans une étude sur deux patients tous les deux décédés de l'infection par LASV mais dont l'un présentait un syndrome de choc hémorragique et l'autre non <sup>221</sup>. Le patient qui était atteint d'hémorragies avait des niveaux élevés de TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$  au moment du choc terminal, ce qui n'était pas le cas pour l'autre patient. Ces cytokines n'ont pas nécessairement été détectées lors d'autres études, comme celle de Mahanty *et al*, qui ne fait pas état d'une hausse des taux de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  précédant la mort <sup>222</sup>. Cette étude montre d'autre part que les patients fatalement infectés ne présentent pas de niveau détectable d'IL8 et de CXCL10 dans leur plasma comparé aux patients survivants. Une augmentation des niveaux d'IL12, IL6 et RANTES a été détectée quelle que soit l'issue de l'infection. Une étude de transcriptomique réalisée sur PBMC de PNH infectés par LASV a mis en évidence un déficit d'expression des gènes de cytokines pro-

inflammatoires en général, et d'IL1 $\beta$  et IL23 $\alpha$  en particulier <sup>201</sup>. En revanche, les auteurs ont noté une surexpression des cytokines immunosuppressives IL27 et IL6 par les singes infectés, un résultat confirmé par Baillet *et al.* <sup>198</sup>. Par ailleurs, cette dernière étude a montré une hausse dérégulée de nombreuses cytokines pro- (TNF $\alpha$ , IL6, IL12, IL15) et anti-inflammatoires (IL1RA, IL10, CCL2) au moment de la mort des singes cynomolgus infectés par LASV Josiah, concourant à l'idée d'une tempête cytokinique lors du choc terminal causé par LASV chez le PNH. Les études sont multiples et tous les résultats ne sont pas concordants, et il semble que la nature de la réponse cytokinique observée soit très dépendante des individus, des souches virales et des voies d'infection, ce qui ne facilite pas sa caractérisation.



**Figure 18. Réponse immunitaire innée et mécanismes d'évasion de LASV.** Les ARN double brin de LASV sont reconnus par les senseurs RIG-I et MDA5, tandis que l'activité exonucléase de la NP de LASV digère ces ARN et inhibe le processus de détection. La protéine de matrice Z se lie aux domaines CARD de RIG-I et MDA5 et empêche leur interaction avec MAVS, ce qui inhibe la cascade de signalisation des IRF menant à la sécrétion d'IFN de type I. La NP inhibe l'activation des IRF en se



liant à IKK $\epsilon$ . La NP interagit également avec la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B et inhibe l'activation de la voie. Adapté de Garry et al, 2022 <sup>68</sup>.

**La réponse des cellules NK :** Les cellules NK sont à l'interface entre les réponses immunes innée et adaptative, elles ont une activité cytolytique constitutive et participent à la régulation de la réponse adaptative via la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Leur activation dépend également d'un certain nombre de signaux, dont certains sont sécrétés par les CPA. Les données sur la réponse des NK lors de l'infection par LASV sont peu nombreuses. Un modèle *in vitro* de co-culture entre des CPA et des cellules NK a été mis au point dans notre laboratoire il y a une dizaine d'années. Ce modèle a permis de montrer que la présence du virus seul au contact des cellules NK n'engendre ni l'infection ni l'activation de ces cellules <sup>223</sup>. En revanche, la mise en contact de CPA infectées avec des cellules NK induit une forte activation de ces dernières mais ne provoque ni la sécrétion d'IFN $\gamma$  ni la lyse des CPA infectées. L'infection de DC et de macrophages par un virus LASV muté dans la région exonucléase et induisant par conséquent une forte sécrétion d'IFN de type I a causé l'activation des cellules NK, résultant en leur dégranulation ainsi qu'en la sécrétion d'IFN $\gamma$  <sup>224</sup>. Ces données suggèrent que l'activité exonucléase de la NP est impliquée dans l'inhibition de l'activation des cellules NK médiée par les CPA. *In vivo*, une lymphopénie transitoire des cellules NK a été brièvement décrite chez le singe cynomolgus <sup>197</sup> et confirmée par les résultats obtenus dans le même modèle par Baillet *et al.* <sup>198</sup>, discutés dans les résultats de cette thèse. Il a récemment été montré que pendant les 3 premiers jours de l'infection aiguë par LCMV, les cellules NK suppriment les LT antiviraux dans la rate, d'une manière dépendant de CXCR3 et des IFN de type I, causant une immunosuppression très précoce <sup>225</sup>.

### 3.D.ii. La réponse adaptative

La réponse adaptative est dépendante de la présentation antigénique, assurée par les CPA dans les OLS et qui permet la sélection et l'expansion de clones de LT et de LB capables de reconnaître de manière spécifique l'antigène présenté. Les LT et les LB constituent les deux leviers de la réponse adaptative. Si les premiers sont responsables d'une immunité cellulaire via leurs activités cytotoxique (LT CD8+) et régulatrice (LT CD4+), les seconds sont les acteurs de la réponse humorale caractérisée par la sécrétion d'Ig dans le plasma. Ces Ig sont capables de se fixer de manière spécifique à l'antigène qu'elles reconnaissent pour former des complexes immuns, qui sont ensuite pris en charge et éliminés. Certaines Ig ont des propriétés neutralisantes, c'est-à-dire qu'elles empêchent stériquement la fixation des antigènes viraux sur leurs récepteurs et préviennent ainsi la réplication virale. Les LT CD8+ mettent à profit leur activité cytotoxique pour supprimer les cellules infectées présentant des antigènes viraux à leur surface, tandis que les LT CD4+ auxiliaires assistent et régulent les interactions entre les LT et les LB.

### *La réponse cellulaire T*

L'infection létale par LASV chez le PNH et chez l'humain se caractérise par une lymphopénie intervenant dans la première semaine suivant l'infection<sup>171,191,196,206</sup>, ainsi que par une baisse de la prolifération des LT<sup>197</sup>. Tous les indices sont aujourd'hui concordants pour mettre en évidence le rôle primordial de la réponse spécifique des LT dans le contrôle de l'infection par LASV. D'abord, l'activation des LT CD4+ et CD8+ mémoires intervient tôt lors de l'infection, et on détecte une immunité mémoire persistante chez les patients ayant survécu à l'infection<sup>226</sup>. La reconnaissance spécifique d'épitopes de LASV par les LT CD4+ a également été démontrée dans les PBMC de personnes séropositives pour LASV<sup>227-229</sup>. Certains clones de ces cellules ont pu être stimulés par de la GP et de la NP recombinante de LASV, mettant en évidence la présence d'épitopes ciblés par les LT CD4+ sur ces deux protéines virales. L'activation de la cytotoxicité de LT CD8+ induite par une présentation antigénique via HLA.A2 de peptides issus de la GP de LASV et désignés *in silico* a également été décrite en modèle murin<sup>230</sup>.

Nous avons récemment montré dans notre équipe que l'activation des LT CD4+ dans les PBMC (mesurée par l'expression de CD69) est forte chez les singes cynomolgus survivants à l'infection par LASV tandis qu'elle est indétectable chez les singes décédés de l'infection<sup>198</sup>. Le nombre de LT en prolifération (Ki67+) et présentant des marqueurs de cytotoxicité (perforine/granzyme B) augmentait considérablement dans le sang au cours de l'infection non fatale mais pas chez les singes mourant de l'infection. De plus, des analyses réalisées dans les splénocytes (cellules de la rate) et les cellules des ganglions mésentériques ont permis de mettre en évidence la forte augmentation de LT CD4+ et CD8+ prolifératifs et cytotoxiques dans les ganglions des singes survivants, ainsi que l'apparition d'une population de LT CD8+ exprimant CD95, un marqueur d'apoptose. Ces signaux étaient soit absents soit significativement moins intenses chez les animaux fatalement infectés. La combinaison des signaux de prolifération et d'apoptose dans les OLS met en évidence des processus actifs de sélection et d'expansion clonales des LT intervenant spécifiquement chez les singes survivants à l'infection par LASV. Lors d'une précédente étude de notre équipe, il avait été montré que la stimulation de splénocytes avec des antigènes de LASV induisait une forte prolifération des LT CD4+ et CD8+ chez les animaux survivants à l'infection uniquement<sup>197</sup>.

Les résultats des études vaccinales corroborent également l'importance centrale de la réponse cellulaire T dans la protection contre l'infection. En effet, un vaccin élicitant une réponse T spécifique des GP1 et GP2 de LASV s'est montré très efficace pour protéger des PNH, même en l'absence de réponse anticorps significative<sup>231</sup>. A l'inverse, une forte induction d'anticorps dirigés contre la NP par une autre forme vaccinale échouait à protéger les singes contre LASV. Un autre candidat vaccinal porté par notre

équipe a efficacement protégé des singes cynomolgus en élicitant une réponse cellulaire T dirigé contre les GP et NP de LASV <sup>200</sup>.

Des études en modèles cellulaires ont également mis en évidence que des DC infectées par MOPV étaient capables d'induire une réponse cellulaire des LT CD4+ et CD8+ caractérisée par l'activation, la prolifération, la cytotoxicité et l'établissement de marqueurs mémoires chez ces LT. En contraste, les DC infectées par LASV n'induisait aucune activation des LT <sup>232</sup>, ce qui met en relation l'absence d'activation des LT avec la forte pathogénicité de LASV.

#### *La réponse humorale*

La sécrétion d'IgM et d'IgG dirigées contre la NP, la Z, la GP1 et la GP2 de LASV <sup>233,234</sup> intervient assez rapidement au cours de l'infection mais ne corrèle pas avec une baisse de la virémie, qui peut coexister à des taux élevés avec la mise en place de la réponse humorale <sup>231,235</sup>. Il semble que les IgM et les IgG apparaissent légèrement plus tôt chez les singes cynomolgus décédés que chez les survivants <sup>197,198</sup>. L'apparition d'anticorps neutralisants est très tardive et intervient après la fin de la convalescence <sup>236,237</sup>, mettant en évidence le fait que la séroneutralisation n'est pas un phénomène actif lors de la protection contre LASV. Des essais de traitement par injection de sérum de patients convalescents ont eu lieu sans réel succès <sup>238,239</sup>. En revanche, l'injection de sérums contenant des anticorps neutralisants est susceptible de protéger contre l'infection létale, comme cela a été montré chez le cobaye <sup>240</sup> et le singe cynomolgus <sup>241</sup>. Un traitement très précoce était cependant nécessaire pour espérer la survie des animaux, ce qui est parfaitement incompatible avec une utilisation efficace sur le terrain. Ces techniques ont d'ailleurs été abandonnées depuis plusieurs décennies. La réponse humorale semble avoir un rôle très limité dans le contrôle de l'infection par LASV, si tant est qu'elle y participe.

#### *3.D.iii. L'évasion du système immunitaire par LASV*

Les mécanismes d'évasion immunitaire à l'œuvre lors de l'infection par LASV sont multiples, parfois à l'échelle cellulaire et parfois à l'échelle de la réponse systémique.

#### *L'évasion du système immunitaire inné*

De nombreux mécanismes d'inhibition de la réponse innée, médiés par les protéines virales NP et Z, ont été mis en lumière lors du cycle de réplication viral. Nombre de ces mécanismes passent par les interactions directes de ces protéines virales avec des protéines cellulaires impliquées dans la détection de matériel étranger et dans la signalisation de la réponse IFN (cf. **Figure 18**).

Nous avons déjà évoqué l'activité exonucléase de la NP qui dégrade spécifiquement les ARN double brin et empêche ainsi leur reconnaissance par les RLR, limitant drastiquement la réponse IFN de type I dans les cellules infectées et notamment dans les CPA <sup>242</sup>. La NP est également capable de se lier à IKK $\epsilon$ , bloquant ainsi l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- $\kappa$ B <sup>243,244</sup>.

Il a été montré que les protéines de matrice Z de plusieurs Arénavirus pathogènes interagissent de manière directe avec RIG-I et MDA5 et inhibent conséquemment la production d'IFN de type I induite par l'activation de la voie des RLR <sup>245</sup>. De manière intéressante, les protéines Z des Arénavirus non pathogènes ne présentent pas cette caractéristique, ce qui laisse supposer un rôle important de la suppression de la réponse innée dans la pathogénicité virale. En accord avec cette idée, il a récemment été montré que les protéines Z des différentes souches de LASV ne possédaient pas toutes les mêmes capacités d'inhibition de la sécrétion d'IFN médiée par la signalisation des RLR <sup>246</sup>, ce qui peut suggérer un lien avec les différences de pathogénicité observées entre les différentes souches.

#### *L'évasion du système immunitaire adaptatif*

Le bouclier de glycanes à la surface de la *spike* de LASV constitue un mécanisme assez spectaculaire d'évasion à la réponse immunitaire adaptative. En effet, l'inaccessibilité des épitopes par les anticorps est probablement la cause de l'inefficacité de la neutralisation induite par ces derniers, ce qui joue un rôle fort dans l'absence de réponse robuste à l'encontre des particules virales <sup>130</sup>. L'implication du bouclier de glycanes sur l'absence de neutralisation par les anticorps a toutefois été récemment contrastée, lors d'une étude mettant en évidence la pauvreté de la neutralisation des anticorps lors de l'infection avec une *spike* mutée sur tous ses sites de glycosylation <sup>247</sup>. Cette étude a cependant mis en évidence que l'absence de certains glycanes à la surface de la GPC, libérant sélectivement certains épitopes, permettait d'observer une prolifération des LT CD4+ et CD8+ effecteurs, bien que ces deux types cellulaires ne soient apparemment pas sensibles aux mêmes épitopes.

## 4. Prophylaxie et thérapies curatives pour lutter contre la FL

Le diagnostic de la FL se fait systématiquement par prélèvement sanguin suivi d'un test de détection spécifique. Le test le plus fiable est la RT-PCR consécutive à une extraction d'ARN, qui permet de détecter avec une spécificité et une sensibilité très élevées les ARN viraux de LASV dans le plasma des patients <sup>248</sup>. Cependant, des techniques d'ELISA permettant d'évaluer le statut sérologique des patients sont également utilisées <sup>249</sup>, malgré la possibilité d'une réaction croisée avec des IgG dirigées contre un autre Arénavirus proche de LASV <sup>250</sup> et le risque d'une immunité préexistante des patients. Il n'est par essence pas possible de corrélérer la présence d'IgG spécifiques de LASV dans le plasma avec la cause du syndrome aigu du patient sans connaître son statut sérologique avant la maladie. Les ELISA ne sont par conséquent par les outils de détection les plus fiables de la FL. Des tests rapides de détection antigénique dirigés contre la NP existent aussi, ils ont l'avantage d'être bon marché, rapides et dotés d'une sensibilité assez élevée (85%) <sup>251</sup>.

### 4.A. Traitements

La seule molécule autorisée aujourd'hui en usage clinique lors d'une infection avérée par LASV est la ribavirine dispensée par voie intraveineuse, il s'agit d'un analogue de la guanosine aux propriétés antivirales non spécifiques de LASV <sup>252</sup>. Du paracétamol peut être prescrit pour atténuer les douleurs peu intenses et de la morphine peut être administrée en cas de douleurs sévères. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont à éviter sous peine d'aggraver les saignements. Des transfusions de plaquettes, de plasma ou de sang total peuvent être préconisées pour pallier à la thrombocytopénie, à la coagulopathie ou à l'anémie, respectivement <sup>253</sup>. Le monitoring de la volémie des patients par voie intraveineuse est parfois mis en place pour contrebalancer les pertes de fluides causées par la perméabilité vasculaire.

#### 4.A.i. Ribavirine

Bien que dispensée par voie intraveineuse de manière systématique (lorsqu'elle est disponible) chez les patients hospitalisés à cause d'une FL, les effets bénéfiques de la ribavirine sur l'issue de l'infection sont aujourd'hui contestés. Si la ribavirine a montré des effets encourageants lors des études précliniques et lorsqu'elle était administrée avant le 7<sup>ème</sup> jpi <sup>235,254,255</sup>, une étude plus récente chez le singe cynomolgus a démontré un retard de la mort chez les singes traités mais la ribavirine n'a pas permis de sauver les animaux <sup>256</sup>. L'efficacité présumée de la ribavirine chez l'humain atteint de la LF provient d'une seule étude datant de 1986 <sup>257</sup>, mettant en évidence une baisse drastique de la mortalité des patients ayant un niveau d'AST élevé lorsqu'ils étaient traités avec de la ribavirine dans les 6 jours suivant l'apparition de fièvre. Ces données ont récemment été méta-analysées par d'autres équipes et confirment que le taux de mortalité des patients à taux d'AST élevé est diminué lorsque de la ribavirine est

dispensée : 28,7% contre 44,6% dans le groupe contrôle <sup>258</sup>. En revanche, cette nouvelle analyse montre que chez les patients ayant un taux d'AST normal, le traitement à la ribavirine a un effet inverse et augmente le taux de mortalité de la FL : 9,1% contre 4,1%. Par ailleurs, cette méta-analyse met en évidence un potentiel biais dû aux patients se présentant tardivement avec un FL sévère et qui résulterait en une surestimation du potentiel protecteur de la ribavirine.

En conclusion, bien que la ribavirine soit utilisée depuis plus de trois décennies pour traiter la FL, nous ne sommes toujours pas capables d'évaluer précisément son effet bénéfique, si toutefois il existe. Une étude randomisée avec un placebo serait nécessaire pour établir la vraie mesure de son utilité. De plus, ces récents résultats mettent en lumière le fait que les patients peu sévèrement atteints ne devraient pas recevoir de ribavirine, dont la toxicité et les effets indésirables sont nombreux et qui semble aggraver le pronostic vital de ces malades.

#### *4.A.ii. Favipiravir*

Le favipiravir est un analogue de purine (nucléotide) qui s'insère dans la structure des ARN viraux et inhibe l'activité des polymérases d'ARN dépendantes de l'ARN en causant l'arrêt de la transcription, ce qui lui confère des propriétés antivirales contre une grande partie des virus à ARN <sup>259</sup>, notamment contre Ebola <sup>260,261</sup>. Une étude réalisée chez le singe cynomolgus a permis de montrer que l'administration quotidienne d'une dose de 300 mg/kg de favipiravir à partir du 4<sup>ème</sup> jpi et pendant 13 jours protégeait 100% des singes contre la FL létale <sup>262</sup>. En revanche, un protocole identique prodiguant une dose de 50 mg/kg de favipiravir toutes les 8 heures à partir du 4<sup>ème</sup> jpi n'a montré aucun effet sur la survie des singes infectés par LASV Josiah <sup>256</sup>. La seule utilisation de favipiravir chez l'humain lors d'une infection par LASV a consisté en un co-traitement favipiravir/ribavirine chez deux patients porteurs de la même souche importée en Allemagne par un patient décédé de l'infection <sup>263</sup>. Les deux patients ont survécu.

Aucune étude clinique évaluant l'efficacité du favipiravir n'a encore été réalisée dans le cas de la FL, mais le favipiravir a jusqu'ici montré une efficacité significativement plus élevée que la ribavirine lors de tous les tests précliniques. Une étude comparative et synergique de ces deux antiviraux chez l'humain est nécessaire pour établir des protocoles de traitement plus efficaces que ceux dont nous disposons aujourd'hui.

#### *4.A.iii. Transfert de plasma de convalescents et anticorps monoclonaux*

Le transfert de plasma de patients de convalescents, s'il a fait ses preuves pour d'autres infections virales, et est notamment préconisé dans le cas de l'infection par JUNV <sup>38</sup>, n'est pas une solution efficace pour LASV, comme nous l'avons déjà détaillé

en partie *3.D.ii.* La seule étude clinique réalisée à ce jour n'a montré aucune efficacité du traitement sur la survie des patients <sup>257</sup>.

Les traitements par injection d'anticorps monoclonaux (mAb) sont de plus en plus investigués depuis une dizaine d'années. Après sélection des LB sécrétant les clones d'intérêt, il est possible d'induire une forte production de mAb par les souches isolées. Dans une étude datant de 2016, 16 clones de LB sécrétant des anticorps neutralisants ont été isolés à partir de PBMC de patients guéris de LASV <sup>264</sup>. La protection induite par l'injection des différents mAb produits par ces clones a été testée chez le cobaye et chez le singe cynomolgus, montrant dans les deux cas des résultats assez spectaculaires <sup>265,266</sup>. Plusieurs clones de mAb ont permis de protéger 100% des animaux infectés par LASV. Des études cliniques devraient être réalisées pour confirmer ces résultats encourageants chez l'humain. Cependant, la charge économique associée aux techniques de production de ces mAb ne laisse pas imaginer les meilleurs augures quant à l'utilisation prochaine de ces traitements dans les zones d'endémicité.

#### **4.B. Approches vaccinales contre LASV**

Bien qu'aucun vaccin ne soit validé à ce jour pour l'utilisation routinière chez l'humain en zone d'endémicité, de nombreux candidats vaccins contre LASV ont été proposés et bon nombre d'entre eux ont démontré une protection de 100% des animaux lors des études précliniques chez le PNH <sup>267</sup>. Nous n'allons pas détailler chacun d'entre eux mais nous allons donner des précisions sur les deux candidats qui ont progressé vers une étude clinique de phase I, le VSV-LASV <sup>268</sup> et le MeV-LASV <sup>269</sup>, qui a été développé par notre équipe.

Le vaccin VSV-LASV est composé du vecteur VSV (Virus de la Stomatite Vésiculeuse) déplété de sa GP de surface, qui est remplacée par la GP de LASV Josiah <sup>270,271</sup>. Ce vaccin fonctionne en élicitant la production d'anticorps neutralisants contre la GP de LASV, et s'il confère une protection rapide (100% de protection avec une immunisation 3 jours avant infection) <sup>199</sup>, le taux de protection un an après immunisation chute à 70% <sup>272</sup> chez le cobaye. Cela met en évidence la nécessité d'injections de rappel pour renouveler l'immunité induite par le vaccin VSV-LASV. Par ailleurs, l'injection d'un vaccin quadrivalent baptisé VesiculoVax à base de VSV-LASV, VSV-EBOV, VSV-SUDV et VSV-MARV a induit une protection contre ces quatre virus responsables de FHV de manière simultanée <sup>273</sup>.

En parallèle, le vaccin MeV-LASV, construit à partir du virus de la rougeole utilisé comme vecteur pour exprimer la NP et la GP de LASV, protège en induisant une réponse cellulaire T robuste <sup>200</sup>. Après une simple immunisation, une réponse mémoire a permis de protéger 100% des singes contre l'infection par LASV Josiah un an après vaccination <sup>274</sup>. L'efficacité de ce vaccin lors d'une immunisation 6 jours avant infection a été validée récemment (article en review).

Une des considérations principales concernant les approches vaccinales contre LASV est de réussir à protéger de l'infection par l'intégralité des clades du virus, dont certains sont très divergents. La majorité des constructions vaccinales à ce jour mettent à profit des protéines virales appartenant à la souche LASV Josiah, qui appartient au clade IV. Le choix d'une souche issue d'un clade « central » dans la phylogénie de l'espèce virale n'est pas anodin et permet de limiter au maximum les divergences entre les clades les plus éloignés et les protéines vaccinales. Les étapes de validation des candidats vaccins de LASV incluent donc naturellement la vérification de la protection croisée entre les clades. Celle-ci a notamment été démontrée pour le candidat VSV-LASV <sup>271</sup> et pour le candidat vaccinal de notre équipe, MeV-LASV <sup>274</sup>. Il a par ailleurs été montré que la réponse T mémoire des rescapés de la FL permettait dans la plupart des cas une protection croisée efficace vers d'autres clades de LASV <sup>275</sup> ce qui est un signe encourageant pour la protection inter-clades induite par la vaccination.

Une autre plateforme vaccinale a été développée au cours des dernières années dans notre laboratoire, à partir de l'Arénavirus non pathogène MOPV atténué par mutation du domaine exonucléasique de la NP et auquel on a substitué la GP endogène par celle de LASV <sup>276</sup>. Ce vaccin a permis la protection de 100% des PNH infectés par LASV en élicitant une réponse cellulaire T dirigée contre le virus. En parallèle, nous avons utilisé cette plateforme pour vacciner des PNH contre des ANM, dont MACV, et le vaccin a montré la même efficacité, bien que la réponse humorale ait été majoritaire contre les ANM. Nous avons ensuite élaboré un vaccin pentavalent protégeant contre cinq des six FHV causées par les ANM : MACV, JUNV, GTOV, SABV et CHAPV. Ce vaccin a induit une immunité humorale forte et a permis de protéger des singes cynomolgus contre l'infection par MACV et GTOV. Ces résultats ont fait l'objet d'un article récemment accepté pour publication chez *Nature Microbiology*.



# Problématique et objectifs

---

La FL constitue un problème de santé publique majeur, pour lequel plus de 80 millions de personnes sont à risque dans sa zone d'endémicité, un chiffre qui pourrait être amené à fortement augmenter dans les décennies à venir. Des avancées considérables ont été réalisées sur la prophylaxie depuis le classement de LASV parmi les pathogènes prioritaires de l'OMS, et la création d'organismes comme la Coalition pour les Innovations en matière de Préparation aux Epidémies (CEPI) fondée en 2016, s'attellant sérieusement à la question des vaccins contre LASV et d'autres infections virales prioritaires. Malgré cela, la compréhension des mécanismes immunitaires et physiologiques sous-jacents à l'infection par LASV et qui orientent l'évolution de la pathologie et l'issue de la FL est balbutiante. Etonnament, un consensus existe autour du fait que les lésions observées dans les organes ne suffisent pas à expliquer le syndrome de défaillance multiviscérale (SDMV) caractérisé lors de l'infection, ce qui amène à s'interroger sur les causes précises de ces dysfonctionnements.

L'impact de l'infection sur la viabilité et la fonction des cellules cibles a souvent été investigué grâce à des modèles cellulaires, qui donnent des premiers indices quant aux conséquences de l'infection sur des types cellulaires isolés mais ne peuvent en aucun cas être suffisants pour permettre de caractériser le fonctionnement global d'un organe. Grâce à nos modèles de PNH retraçant le cours d'infections létales et non létales par LASV, nous disposons d'un matériel biologique de choix pour étudier la dynamique des événements immunologiques à l'œuvre lors de l'infection, ainsi que les déterminants de la pathologie de la FL, à savoir la nature de toutes les cellules cibles du virus *in vivo*, la mise en place de la dissémination virale et le suivi de la fonction propre de chaque organe impacté par l'infection.

En mettant à profit des méthodes innovantes, nous avons cherché à caractériser plus en détails les phénomènes à l'œuvre dans les PBMC, les OLS et les organes non lymphoïdes marquant des dysfonctionnements majeurs lors de l'infection, de manière dynamique, dans le but d'identifier des mécanismes centraux dans la pathogenèse qui pourraient éventuellement être ciblés par des traitements existants ou à venir.

## Préambule

Cette étude s'inscrit dans la continuité d'un autre projet de recherche et de doctorat, réalisé par Nicolas Baillet entre 2015 et 2018, et visant à identifier les mécanismes clés des phases précoce, d'incubation, aiguë et de convalescence de la pathogenèse de la fièvre de Lassa chez le singe cynomolgus <sup>277</sup>. C'est pourquoi aucune phase d'expérimentation animale supplémentaire n'a été nécessaire pour la réalisation de ce projet de thèse, le matériel biologique étant déjà disponible.

L'étude a été réfléchi pour disposer de matériel biologique à toutes les phases de la pathogenèse du virus Lassa : la phase précoce (2 jpi), la phase d'incubation (5 jpi), la phase aiguë (11 jpi) et la phase de convalescence (28 jpi). Ainsi, des groupes de singes ont été infectés par LASV en laboratoire P4, et euthanasiés de manière séquentielle aux temps critiques de la pathogenèse pour réaliser une investigation complète (voir **Tableau 2**). Un autre aspect majeur de cette étude est le choix de comparer l'infection par deux souches distinctes de LASV ayant des sévérités établies très différentes. En effet, dans nos conditions d'expérimentation, la souche Lassa AV, bien que responsable d'une pathologie avancée chez les macaques infectés, n'a pas causé de symptômes mortels (0% de mortalité, n=4) <sup>198</sup>. En revanche, la souche Lassa Josiah – qui est la souche de référence de nombreux laboratoires – a entraîné systématiquement la mort des animaux pendant la phase aiguë, entre 11 et 15 jpi (100% de mortalité, n=6). Nous avons également suivi un groupe contrôle ayant subi une injection de milieu de culture sans virus (groupe Mock) pour disposer des constantes attendues chez le singe cynomolgus hors contexte d'infection. Tous les singes survivants (groupe LASV AV et groupe Mock) ont été euthanasiés entre 28 et 32 jpi, à la date prévue de fin d'expérimentation.

**Tableau 2.** Composition des groupes de singes cynomolgus dans le schéma expérimental.

Jours post-infection	Mock	LASV AV	LASV Josiah
2	—	n=3	n=3
5	—	n=3	n=3
11	—	n=3	n=6
28	n=3	n=4	—

Pour chaque groupe, des prélèvements de sang réguliers ont été réalisés et du plasma et des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolés et congelés pour usage ultérieur. A l'autopsie, le sang, la moelle osseuse et les organes des macaques ont été prélevés et ont subi différents traitements avant d'être congelés.

#### *Les organes lymphoïdes secondaires*

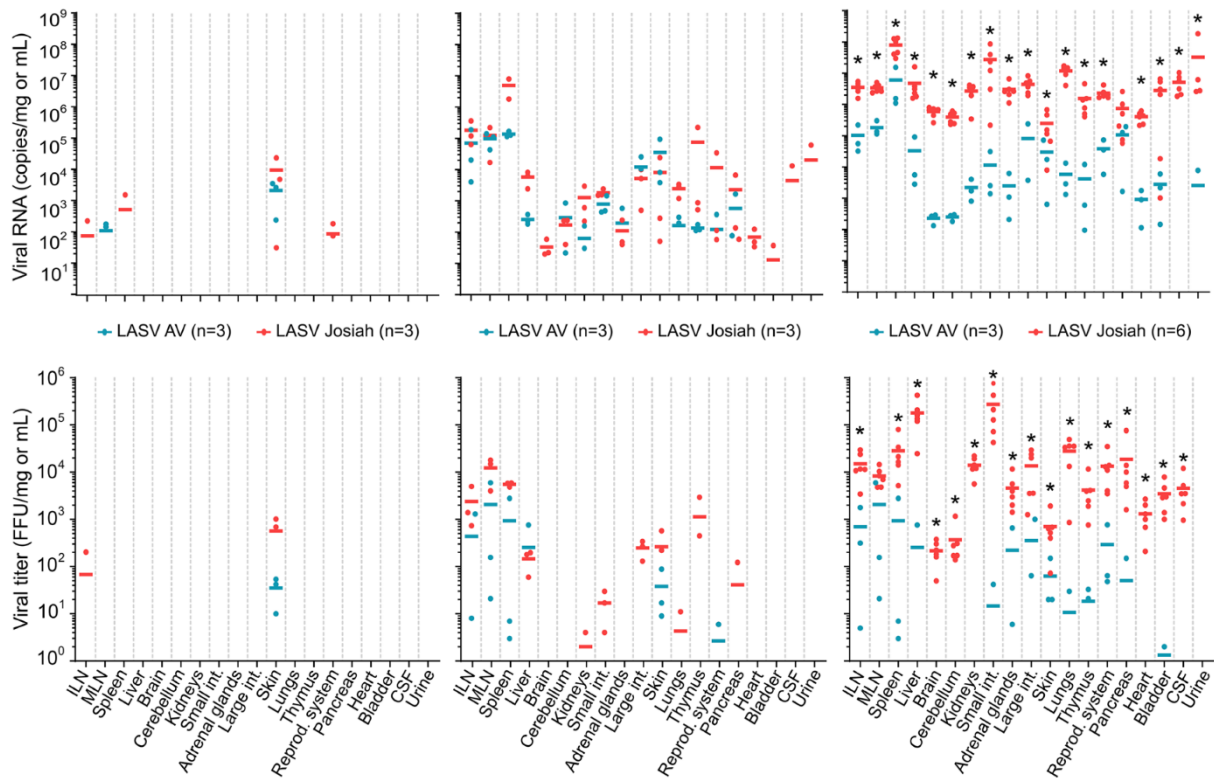
A l'autopsie, une partie des ganglions mésentériques (GGM) et inguinaux (GGI), ainsi que de la rate, a été broyée, déplétée des globules rouges et les cellules obtenues ont été conservées à -150°C jusqu'à utilisation. Ces cellules ont été utilisées pour réaliser des extractions d'ARN et établir le transcriptome des OLS d'une part, et pour effectuer des expériences de remise en culture dans différentes conditions suivies d'analyses de cytométrie en flux d'autre part. L'autre partie des GGM, GGI et de la rate a subi un protocole d'inactivation (immersion pendant 14 jours dans de la formaline à 10%) puis a été sortie du laboratoire P4, incluse en paraffine et utilisée pour réaliser des coupes histologiques.

#### *Les organes non lymphoïdes*

A l'autopsie, une grande variété d'organes non lymphoïdes a été prélevée : foie, rein, cerveau, cervelet, intestin, glandes surrénales, pancréas, poumon, testicules/ovaires, vessie, peau et cœur. Après broyage, les ARN de ces organes ont été extraits, pour mesurer la charge virale (cf. [Figure 19](#)) et pour établir le transcriptome de certains organes sélectionnés : foie, rein, poumon, glandes surrénales. Suivant le protocole d'inactivation décrit pour les OLS, des morceaux de ces organes ont également été sortis du laboratoire P4 puis inclus en paraffine pour analyse histologique.

Les mesures de charges et de titres viraux présentées par Baillet *et al*<sup>198</sup> mettent en évidence un processus de réplication virale précoce (2 jpi) au site d'injection (sous-cutanée dans la cuisse droite) ainsi qu'une migration rapide du virus vers les GGI, qui sont les organes lymphoïdes les plus proches de la zone d'injection (voir [Figure 19](#)). A partir de 5 jpi, on observe un tropisme élargi de LASV, notamment pour la souche Josiah, où on détecte du matériel viral infectieux dans tous les compartiments observés au pic de la maladie (11 jpi). On parle alors de pantropisme viral.

Si ces données nous permettent de conclure sur la présence du virus LASV dans tous les organes lors de l'infection aiguë, elles ne nous renseignent pas sur la nature des tissus infectés dans chaque organe ni sur la permissivité des différents types cellulaires à l'infection virale. Nous avons souhaité identifier clairement les types cellulaires permissifs à l'infection ainsi que la nature des premières cellules infectées dans le déroulement de la maladie.



**Figure 19. Dynamique de la charge virale et du titre viral dans les organes au cours de l'infection par LASV AV ou LASV Josiah.** Quantification des copies d'ARN viral (en haut) et des particules virales infectieuses (en bas) à 2 jpi (gauche), 5 jpi (centre) et 11 jpi (droite) par mg de tissu, dans les GGI (ILN), les GGM (MLN), la rate (spleen), le foie (liver), le cerveau (brain), le cervelet (cerebellum), les reins (kidneys), l'intestin grêle (small intestine), les glandes surrénales (adrenal glands), le gros intestin (large intestine), la peau (skin), les poumons (lungs), le thymus, le système reproducteur (reproductive system), le pancréas, le cœur (heart), la vessie (bladder), le liquide cérébro-spinal (CSF) et l'urine. Les différences entre les deux conditions d'infection sont évaluées grâce au test t de Student. \* :  $p < 0,05$ . Extrait de Baillet *et al.* <sup>198</sup>

## 1. Dynamique comparative des infections par AV et Josiah, caractérisation des cellules cibles de l'infection et nature de l'inflammation systémique

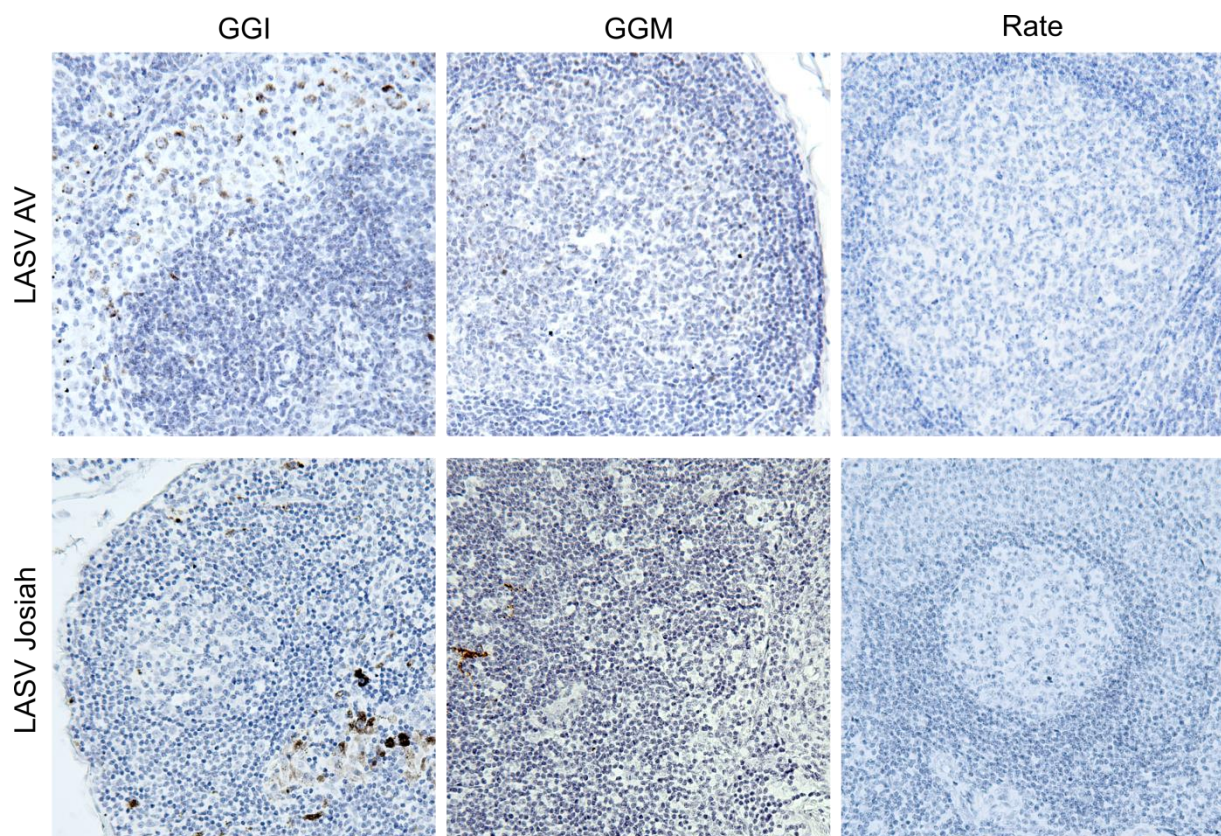
### 1.A. Dynamique d'infection lors de l'infection par AV et Josiah

#### 1.A.i. Détection précoce de l'infection dans les OLS

Nous avons réalisé des marquages en hybridation *in situ* (HIS) qui nous ont permis de détecter le génome viral de LASV dans les OLS à 2 jpi (voir **Figure 20**). Nous avons identifié une toute petite minorité de cellules infectées dans les GGI des singes survivants et décédés, qui sont des cellules à gros noyaux situées dans la zone sinusoidale des GGI. Ces cellules ont l'aspect morphologique (gros noyau et cytoplasme) et la localisation (zone sinusoidale d'afférence des ganglions) de CPA en migration vers le GGI : DC et macrophages/monocytes. Un petit groupe de cellules de même nature apparaît comme infecté dans le GGM des singes décédés uniquement.

Nous n'avons détecté aucune cellule infectée dans le GGM des singes survivants, ni dans la rate des singes infectés, quelle que soit l'issue de la maladie.

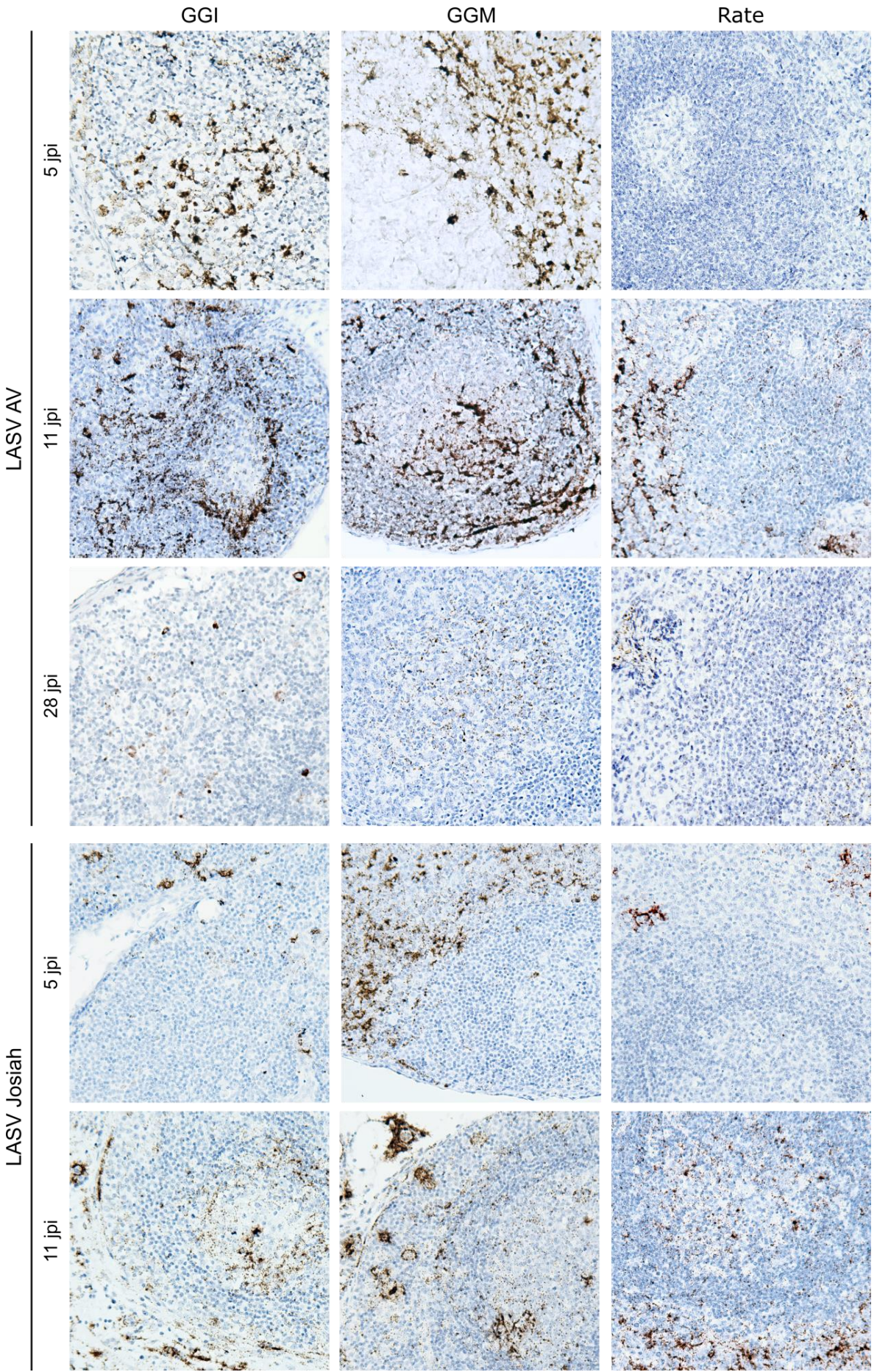
Des marquages similaires dans la peau nous ont permis de confirmer la présence de foyers d'infection dans le tissu conjonctif hypodermique témoignant de la réplication virale dans ce tissu (non présenté). Malheureusement, la mauvaise qualité de nos échantillons ne nous a pas permis d'obtenir des coupes montrant fidèlement l'organisation du tissu hypodermique, et nous n'avons pas pu identifier la nature des cellules formant ces foyers d'infection.



**Figure 20.** Détection *in situ* de l'ARN viral dans les OLS à 2 jpi. Hybridation *in situ* des ARN viraux de LASV grâce à l'utilisation de sondes spécifiques des séquences des NP de LASV AV et LASV Josiah. Le DAB (marron) est utilisé comme chromogène et une contre-coloration à l'hématoxyline (bleu) a été appliquée.

*1.A.ii. Progression et dissémination virale au cours de la phase aiguë et pathologique*

Nous avons ensuite réalisé les mêmes expériences d'HIS dans tous les organes à notre disposition et au cours du temps, pour établir un tableau exhaustif du tropisme viral de LASV (cf. **Figures 21 à 25**).



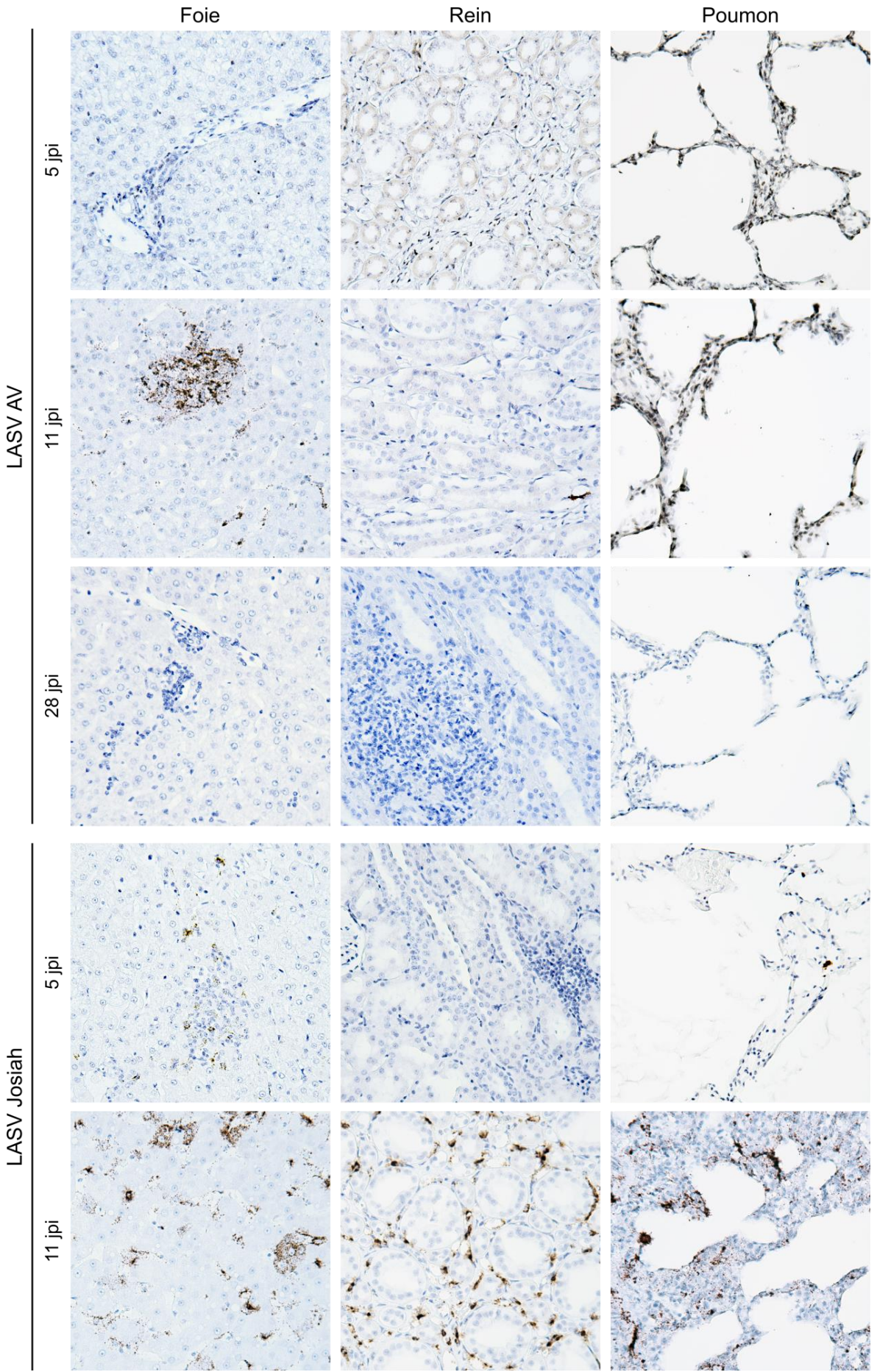
**Figure 21. Détection *in situ* de l'ARN viral au cours du temps dans les OLS.** Hybridation *in situ* des ARN viraux de LASV grâce à l'utilisation de sondes spécifiques des séquences des NP de LASV AV et LASV Josiah. Le DAB (marron) est utilisé comme chromogène et une contre-coloration à l'hématoxyline (bleu) a été appliquée.

Dans les OLS, la dynamique d'infection entre AV et Josiah est très similaire, on observe une invasion des sinus ganglionnaires et de la pulpe rouge dès 5 jpi, interprétable comme un afflux de CPA infectées dans les tissus lymphoïdes (cf. **Figure 21**). A 11 jpi, le virus est toujours fortement présent dans les zones sinusoidales et la pulpe rouge mais a également atteint les centres germinatifs sans pour autant infecter les lymphocytes qui y sont présents, ce qui témoigne d'une présentation antigénique active pour les deux souches de LASV. En phase de convalescence, on détecte du signal viral résiduel localisé dans les centres germinatifs essentiellement.

On identifie des infiltrats de cellules immunitaires dont certaines sont infectées à 5 jpi dans le foie des singes infectés par LASV Josiah (cf. **Figure 22**). Ces cellules sont les premières du tissu hépatique où l'on détecte le matériel génétique du virus. On observe également ce genre d'infiltrats constituant des clusters de la réplication virale dans le foie chez les singes survivants à 11 jpi. On localise d'autres cellules positives pour l'infection par LASV AV dans les sinus hépatiques, qui regroupent l'endothélium vasculaire et les macrophages hépatiques. Cette cible cellulaire virale semble être aussi atteinte par LASV Josiah, puisque les sinus apparaissent comme des zones contenant de l'ARN viral chez les singes décédés également. Cependant, dans le cas de l'infection létale, de nombreux clusters d'hépatocytes sont également atteints par l'infection, ce qui n'est pas du tout le cas chez les survivants.

Le tissu rénal des singes décédés à 11 jpi, qui en apparence semble assez peu atteint d'après les coupes histologiques réalisées en hématoxyline-éosine (HE), recèle cependant un grand nombre de cellules endothéliales infectées par LASV Josiah. Ces cellules ne sont en revanche pas du tout infectées dans le tissu rénal des singes survivants. On détecte de rares infiltrats inflammatoires dans le rein des singes décédés et chez les survivants lors de la phase convalescente (28 jpi).

Les parois des poumons des singes survivants subissent un léger épaissement, toutefois incomparable avec celui observé chez les singes décédés au pic de la phase aiguë. On ne détecte pas d'infection dans le poumon des singes survivants, quelle que soit la phase de la maladie. En revanche, de nombreuses infiltrations de cellules mononucléées interviennent à 11 jpi dans les poumons des singes infectés par LASV Josiah, et de grosses cellules proches morphologiquement de macrophages y sont infectées. Des cellules de même nature sont déjà détectables chez les mêmes singes à 5 jpi, bien qu'elles soient très éparpillées elles constituent les premières cellules positives pour l'ARN viral dans le poumon des singes décédés. A 11 jpi, on identifie également





**Figure 22. Détection *in situ* de l'ARN viral au cours du temps dans les organes clés de la pathologie.** Hybridation *in situ* des ARN viraux de LASV grâce à l'utilisation de sondes spécifiques des séquences des NP de LASV AV et LASV Josiah. Le DAB (marron) est utilisé comme chromogène et une contre-coloration à l'hématoxyline (bleu) a été appliquée.

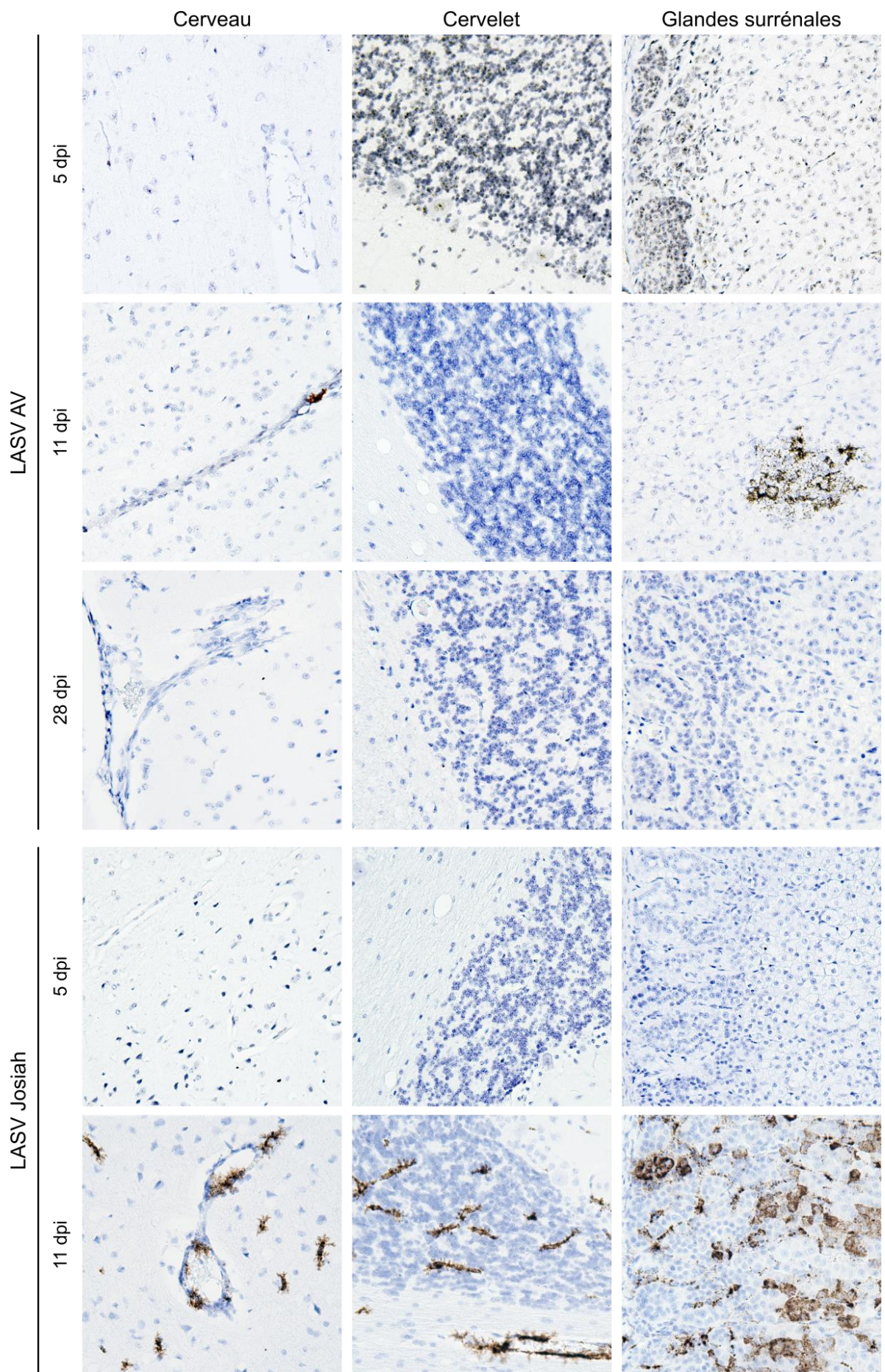
des cellules pulmonaires de nature épithéliale (pneumocytes) infectées par LASV Josiah.

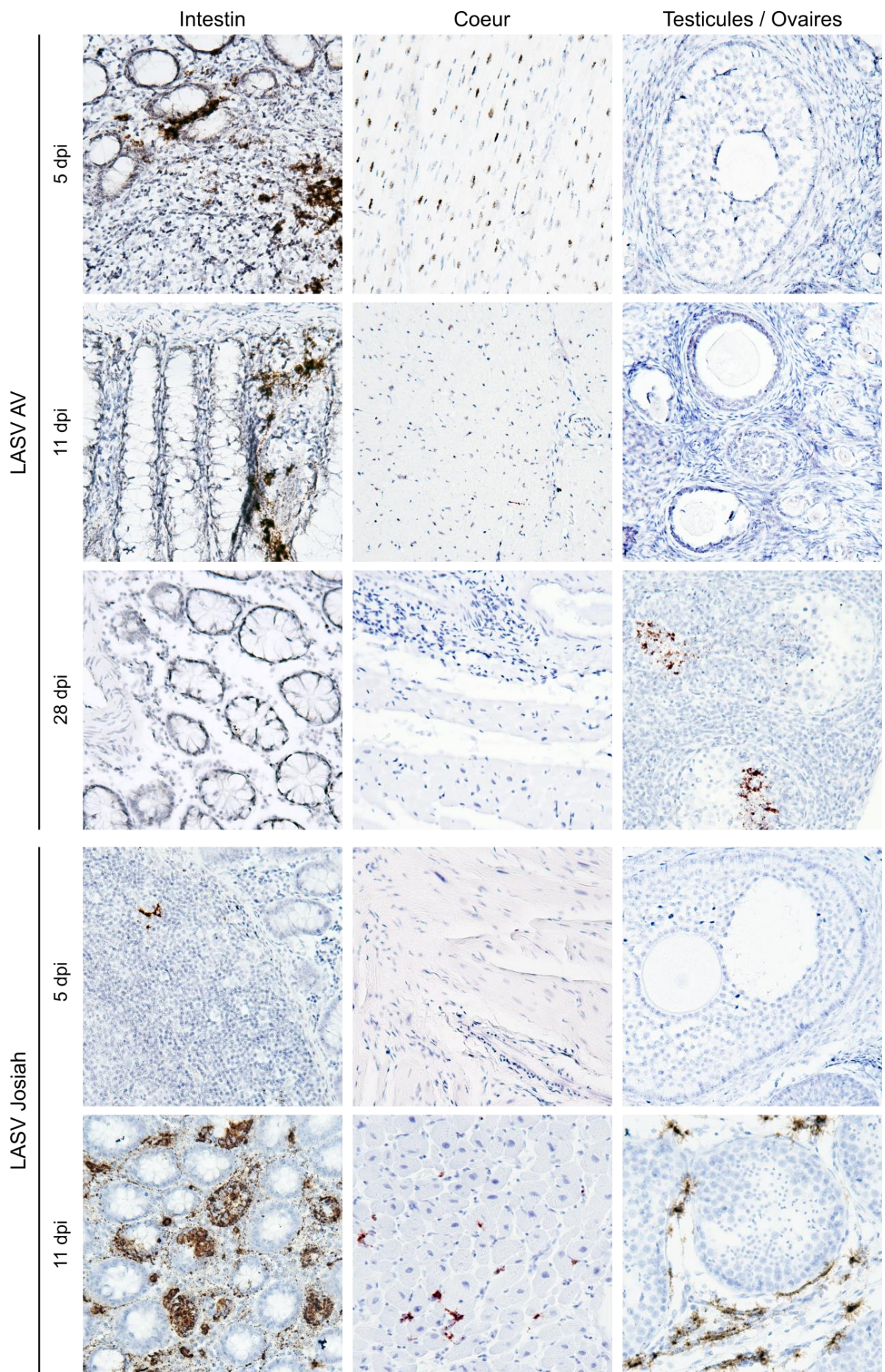
Dans le cerveau des singes survivants, on n'observe que de très rares cellules positives pour l'ARN viral, et elles sont toujours localisées dans des capillaires sanguins, tandis que les cellules endothéliales du réseau vasculaire sont largement atteintes par l'infection par LASV Josiah à 11 jpi (cf. **Figure 23**). D'autres cellules qui semblent situées dans le tissu cérébral des singes décédés sont infectées, il s'agit possiblement de cellules microgliales. Le cervelet des animaux infectés par LASV présente, sans surprise, un schéma d'infection comparable avec celui du cerveau. Si on ne détecte pas de cellules infectées chez les singes survivants, les cellules endothéliales des singes décédés y sont massivement positives pour l'ARN viral à 11 jpi, et ce dans les couches moléculaire et granulaire (matière grise) ainsi que dans la matière blanche.

Les glandes surrénales sont un organe particulièrement permissif à l'infection par LASV Josiah, où on observe de très nombreux clusters d'infection à 11 jpi, qui atteignent à la fois les cellules de la zone glomérulée, de la zone fasciculée et de la zone réticulée (cortex surrénalien). On trouve également des cellules infectées dans la zone médullaire des glandes surrénales, mais celles-ci sont beaucoup plus éparses. Chez les singes survivants, de très rares clusters d'infection ont pu être identifiés, et il s'agit toujours d'infiltrats de cellules immunitaires. L'infection par LASV AV n'atteint pas les cellules surrénales.

Nous nous sommes également intéressés à d'autres organes, a priori moins centraux dans la pathologie de la FL mais au sein desquels le tropisme viral n'a pas toujours été décrit.

L'intestin grêle constitue un autre organe très permissif à l'infection par LASV (cf. **Figure 24**). En effet, dès 5 jpi, on constate la présence de cellules infectées dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) à la fois chez les singes survivants et les singes décédés. En revanche, de manière surprenante, on observe lors de l'infection par LASV AV à 5 jpi des cellules infectées au contact des cellules épithéliales des microvillosités de l'intestin grêle, ce qui intervient plus tard avec LASV Josiah. A 11 jpi, on note un tropisme avancé de LASV pour les cellules épithéliales des microvillosités intestinales, bien plus intense pour la souche Josiah que pour la souche AV toutefois.





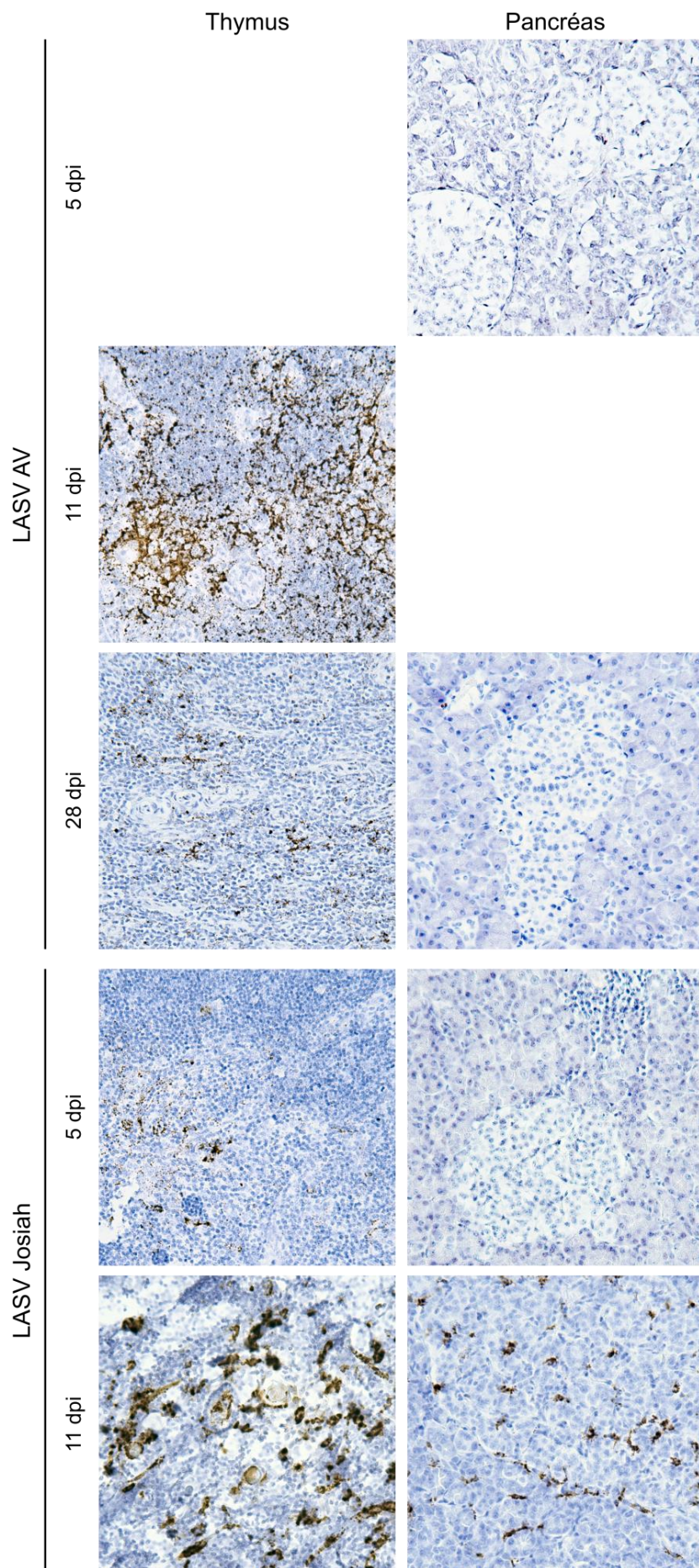
**Figure 23. Détection *in situ* de l'ARN viral au cours du temps dans le système nerveux central et dans les glandes surrénales.** Hybridation *in situ* des ARN viraux de LASV grâce à l'utilisation de sondes spécifiques des séquences des NP de LASV AV et LASV Josiah. Le DAB (marron) est utilisé comme chromogène et une contre-coloration à l'hématoxyline (bleu) a été appliquée.

**Figure 24. Détection *in situ* de l'ARN viral au cours du temps dans l'intestin, le cœur et l'appareil reproducteur.** Hybridation *in situ* des ARN viraux de LASV grâce à l'utilisation de sondes spécifiques des séquences des NP de LASV AV et LASV Josiah. Le DAB (marron) est utilisé comme chromogène et une contre-coloration à l'hématoxyline (bleu) a été appliquée.

Au sein du tissu musculaire strié cardiaque, on ne détecte l'infection que chez les singes décédés à 11 jpi, et celle-ci ne concerne qu'une minorité de cellules, toujours localisées entre les fibres musculaires, et appartenant probablement à l'endothélium vasculaire.

Malgré une disparité de sexe entre les différents groupes de singes (femelles à 5 jpi pour LASV AV et Josiah et à 11 jpi pour LASV AV, mâles pour les groupes LASV Josiah à 11 jpi et LASV AV à 28 jpi), nous avons décidé de présenter ces données étant donné le message important qui en ressort. Nous n'avons pas détecté de virus dans les ovaires des femelles infectées, en revanche la présence de LASV dans les testicules a été attestée. Chez les singes infectés par LASV Josiah à 11 jpi, on voit nettement que les cellules endothéliales des testicules sont très infectées, mais nous n'avons pas décelé d'infection dans les tubes séminifères, qui sont à l'origine de la spermatogenèse. Lors de la phase convalescente des singes survivants cependant, et alors que la présence virale a disparu des tous les autres organes non lymphoïdes, on détecte des clusters nets de cellules infectés dont certains sont localisés dans les tubes séminifères. Cela laisse envisager une persistance dans les testicules et potentiellement dans le sperme du virus LASV chez les individus convalescents voire complètement guéris.

Dans le thymus, qui est un organe lymphoïde primaire (OLP) qui involue à l'âge adulte, on constate un fort taux d'infection par LASV (AV et Josiah), comparable à celui observé dans les OLS, ce qui confirme le fort tropisme viral pour des cellules d'origine immunitaire (cf. [Figure 25](#)). On peut constater la présence du virus dans le thymus dès 5 jpi (données manquantes pour LASV AV), ce qui montre une dynamique d'infection des OLP comparable avec celle des OLS. La zone médullaire, qui contient de nombreuses cellules épithéliales (cellules nourricières), semble avoir une densité de cellules infectées plus forte que la zone corticale, composée essentiellement de thymocytes (lymphocytes immatures). Il est toutefois difficile de conclure sur la permissivité de ces cellules nourricières à l'infection par LASV avec ces simples marquages. Comme dans les OLS, on observe du signal résiduel d'ARN viral dans le thymus des singes survivants convalescents (28 jpi).



**Figure 25. Détection *in situ* de l'ARN viral au cours du temps dans le thymus et le pancréas.** Hybridation *in situ* des ARN viraux de LASV grâce à l'utilisation de sondes spécifiques des séquences des NP de LASV AV et LASV Josiah. Le DAB (marron) est utilisé comme chromogène et une contre-coloration à l'hématoxyline (bleu) a été appliquée.

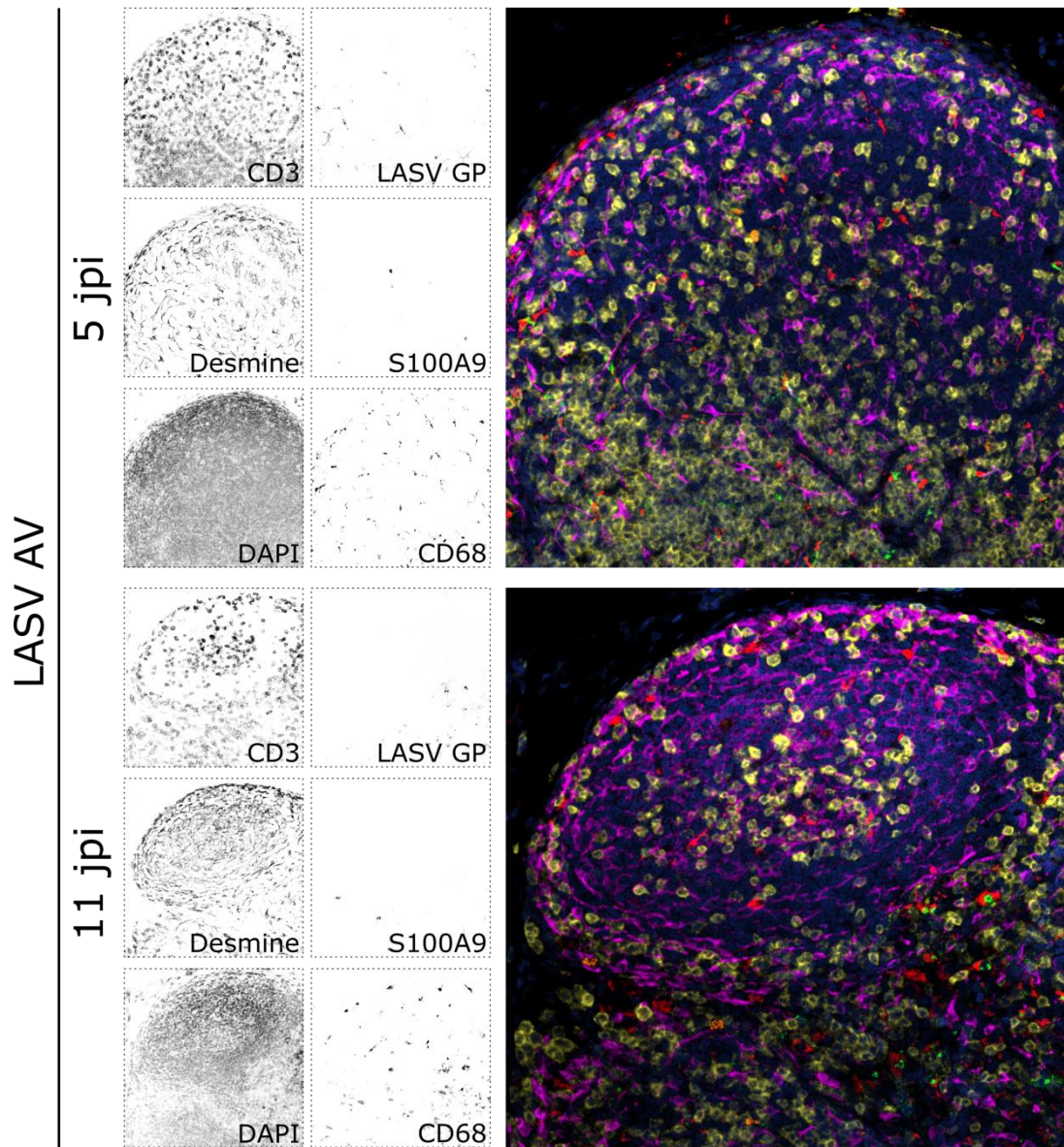
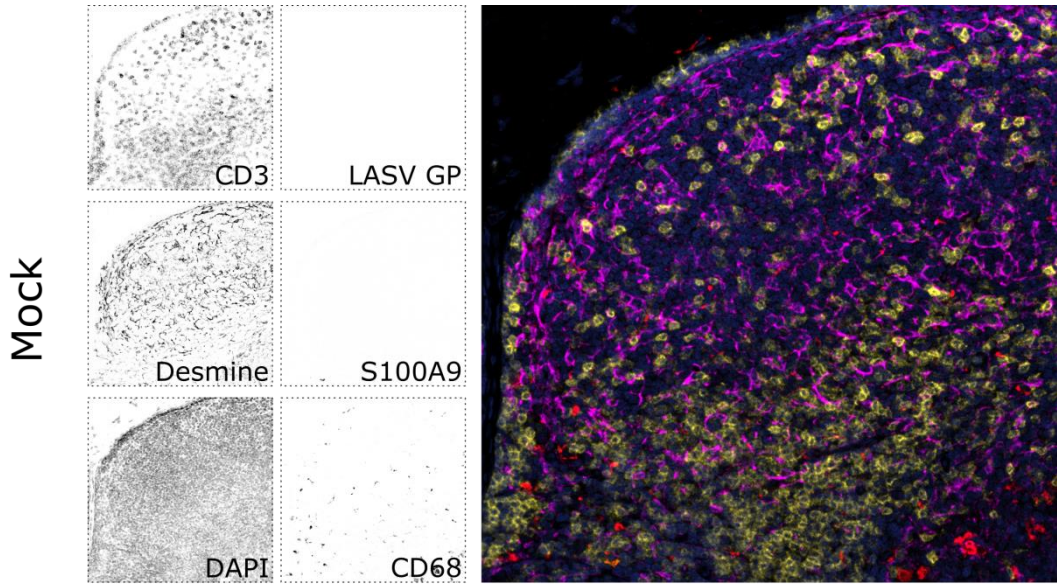
On détecte de nombreuses cellules infectées, non regroupées en clusters, dans le pancréas des singes décédés à 11 jpi (données manquantes pour LASV AV). De par leur disposition, ces cellules pourraient être des cellules endothéliales, qui perforent tous les tissus de manière homogène. En effet, on observe ces cellules positives à l'ARN viral à la fois dans la zone acineuse pancréatique, toujours entre les acini, et dans les îlots de Langerhans, ensembles fonctionnels consacrés à la régulation endocrine de la glycémie.

### **1.B. Caractérisation des premières populations cellulaires cibles dans les OLS**

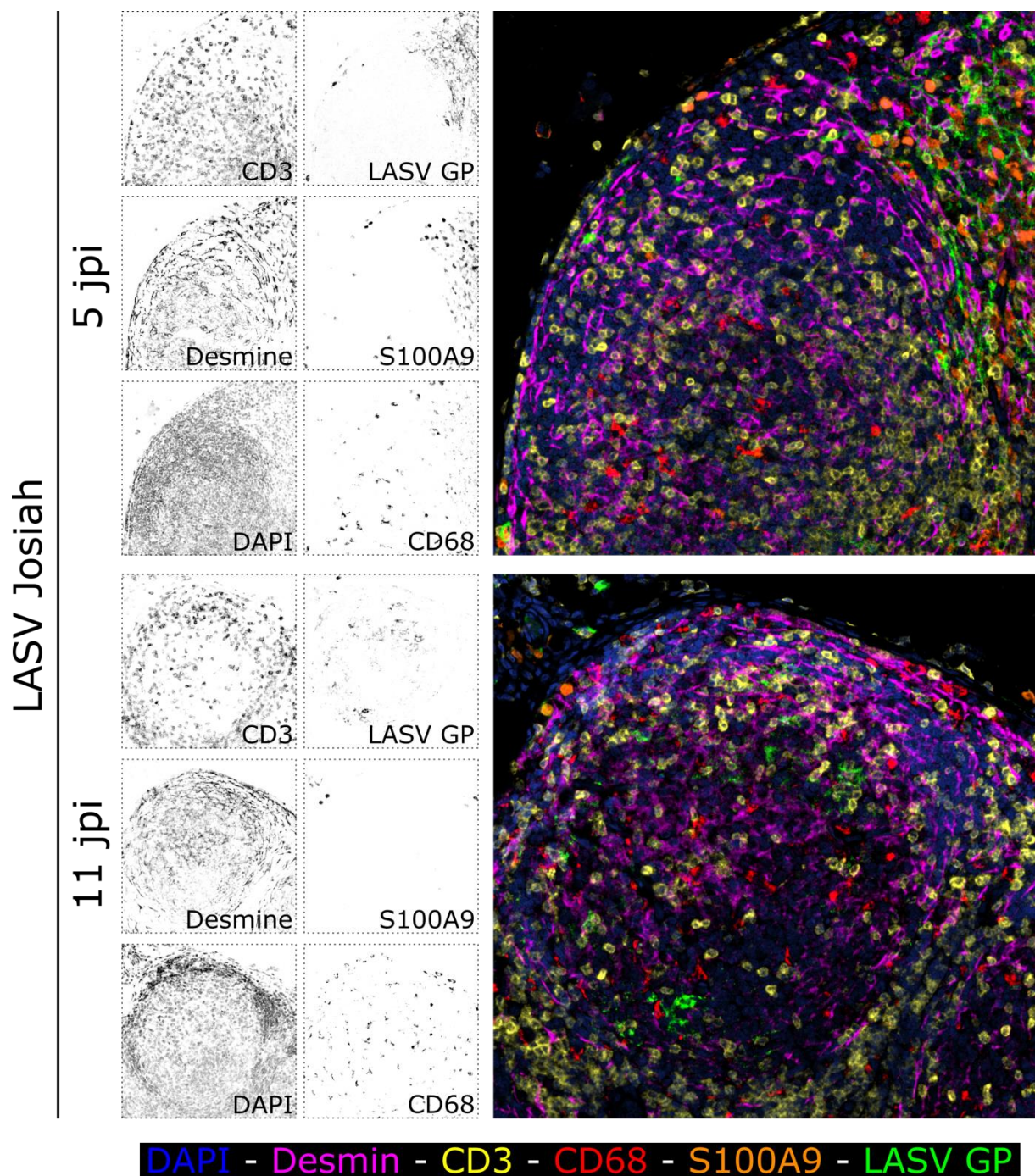
Nous avons réalisé des immunomarquages en multiplex pour permettre l'identification précise et fine des types cellulaires infectés dans les OLS. Les populations majeures de cellules présentes dans les GGM et la rate ont été marquées grâce à des anticorps phénotypiques : LT (CD3), macrophages/monocytes (CD68), neutrophiles (S100A9) et FRC (Desmine). En parallèle, le virus a été détecté grâce à un anticorps dirigé contre la GP de LASV (cf. [Figure 26 et 27](#)).

Ces résultats indiquent clairement que les premières cellules infectées en masse expriment CD68 et appartiennent donc à la lignée monocyttaire (monocytes, macrophages, cellules dendritiques). Pour le cas des cellules dendritiques, aucun marquage phénotypique n'a pu être mis au point dans nos conditions d'expérience à ce jour, ne nous permettant pas de confirmer leur statut vis-à-vis de l'infection. Certains neutrophiles présentent également à leur surface des protéines virales, ce qui suggère qu'ils sont permissifs à l'infection *in vivo*, bien qu'ils n'y soient pas massivement sensibles. De plus, on note que dès 5 jpi, et de manière beaucoup plus avancée à 11 jpi, le réseau fibroblastique (FRC) des OLS est infecté par LASV. Sans surprise et conformément à la littérature, les LT ne sont pas permissifs à l'infection par LASV, quelle que soit l'issue de la maladie.

Il convient de préciser qu'aucune différence notable n'apparaît dans la nature des cibles de LASV AV et LASV Josiah dans les organes lymphoïdes. Cependant le réseau de FRC semble être nettement plus permissif à l'infection par LASV Josiah. Cette sensibilité des FRC à l'infection par LASV ne semble pas entraîner, selon nos observations, de déstructuration majeure du tissu lymphoïde, phénomène qui est connu pour être associé à une dérégulation de la réponse adaptative.

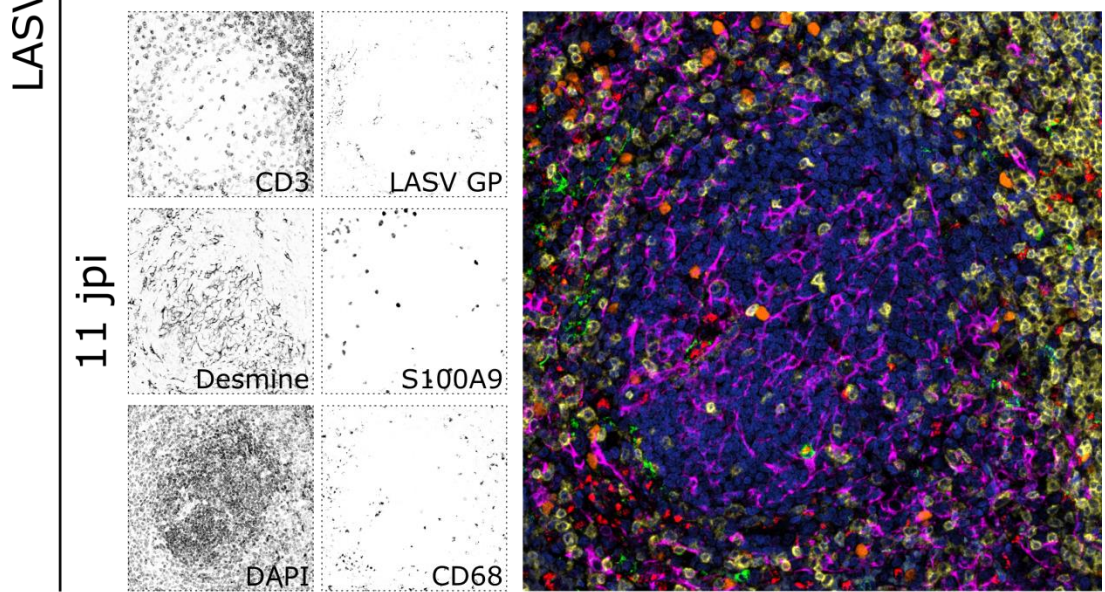
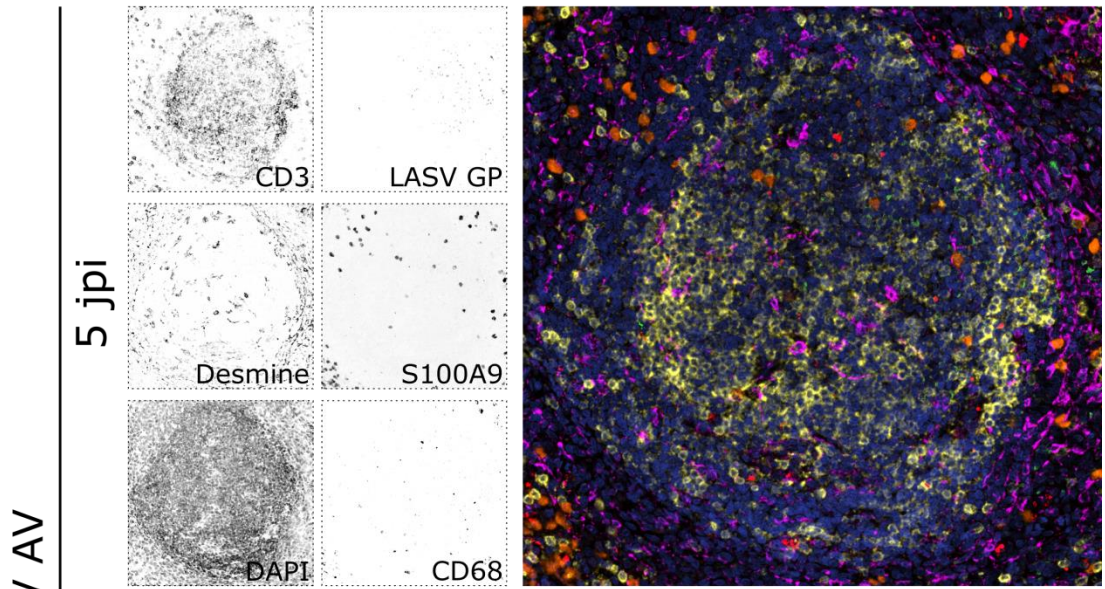
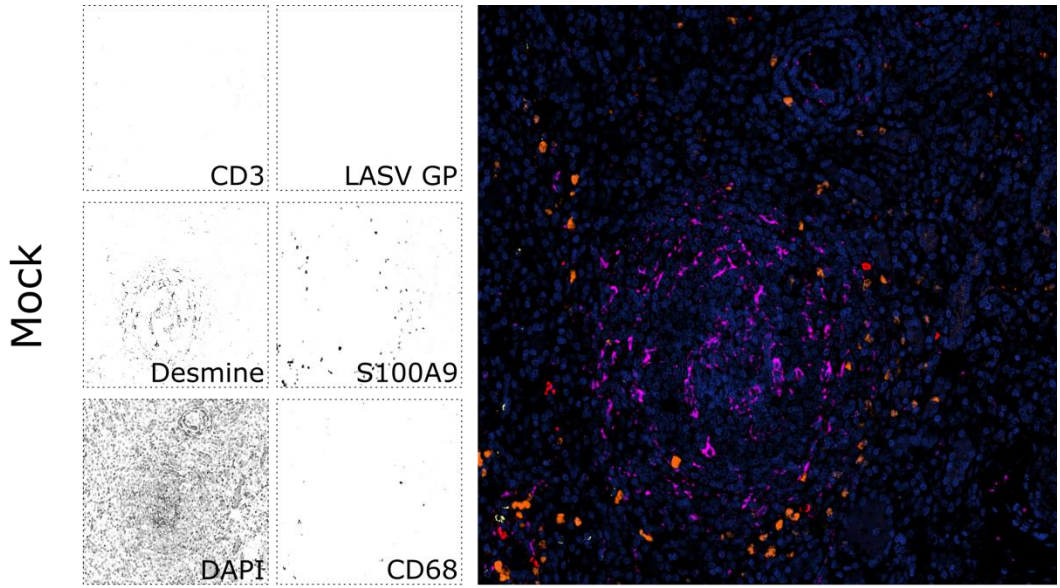


**DAPI - Desmin - CD3 - CD68 - S100A9 - LASV GP**

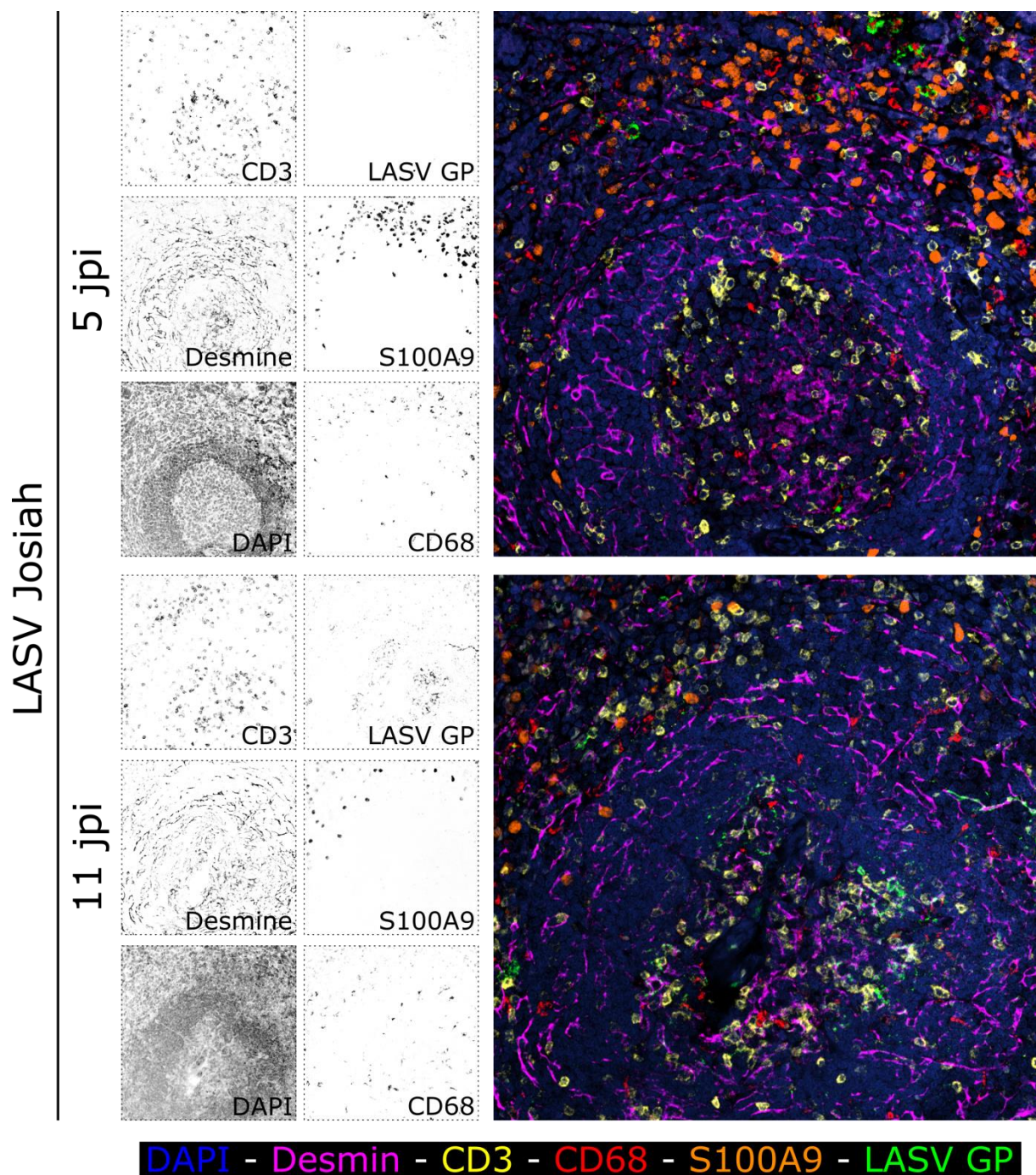


**Figure 26. Identification des cellules cibles de LASV dans les GGM au cours du temps.** Immunomarquages en multiplex des FRC (Desmine, magenta), des LT (CD3, jaune), des macrophages/monocytes (CD68, rouge), des neutrophiles (S100A9, orange), des cellules infectées par LASV (GP LASV, vert) et des noyaux cellulaires (DAPI, bleu nuit) dans les GGM. Les marquages individuels sont présentés au-dessus de chaque image polychrome, en nuance de gris inversées.





DAPI - Desmin - CD3 - CD68 - S100A9 - LASV GP



**Figure 27. Identification des cellules cibles de LASV dans la rate au cours du temps.** Immunomarquages en multiplex des FRC (Desmine, magenta), des LT (CD3, jaune), des macrophages/monocytes (CD68, rouge), des neutrophiles (S100A9, orange), des cellules infectées par LASV (GP LASV, vert) et des noyaux cellulaires (DAPI, bleu nuit) dans la rate. Les marquages individuels sont présentés au-dessus de chaque image polychrome, en nuance de gris inversées.

On note aussi que l'infection par LASV Josiah s'accompagne d'un afflux conséquent de neutrophiles dans la zone sinusoidale et dans la pulpe rouge lors de la phase d'incubation (5 jpi).

### 1.C. Confirmation des cibles cellulaires non lymphoïdes

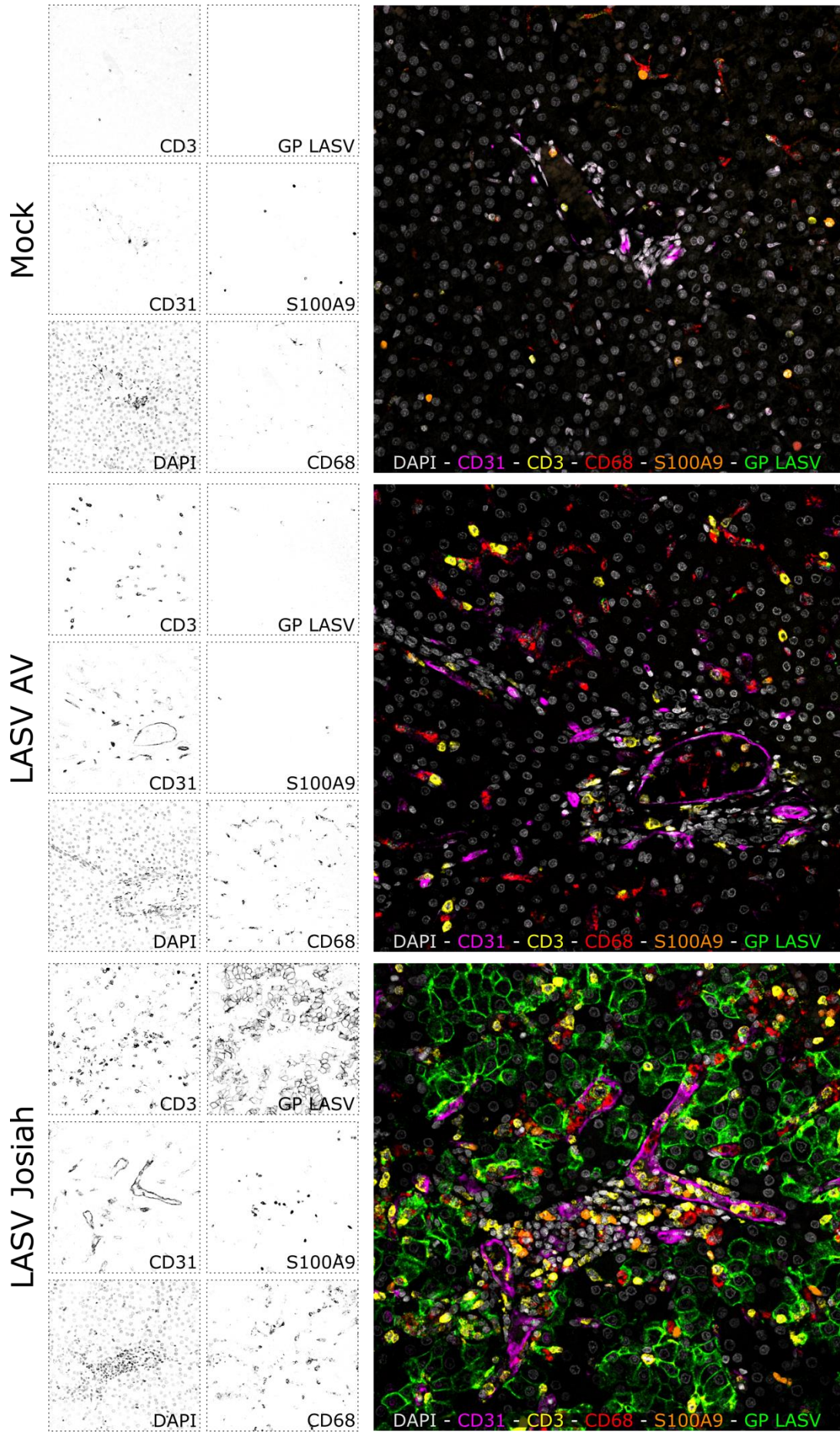
Nous nous sommes également intéressés aux cibles cellulaires virales dans quatre organes clés de la pathologie systémique de la fièvre de Lassa : le foie, le poumon, le rein et le cerveau. On sait que la défaillance combinée de ces organes est généralement ce qui cause la mort des individus infectés par LASV. Pour ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur les résultats obtenus dans les tissus au pic des symptômes (11 jpi), car c'est la phase où l'on observe le plus de cellules infectées.

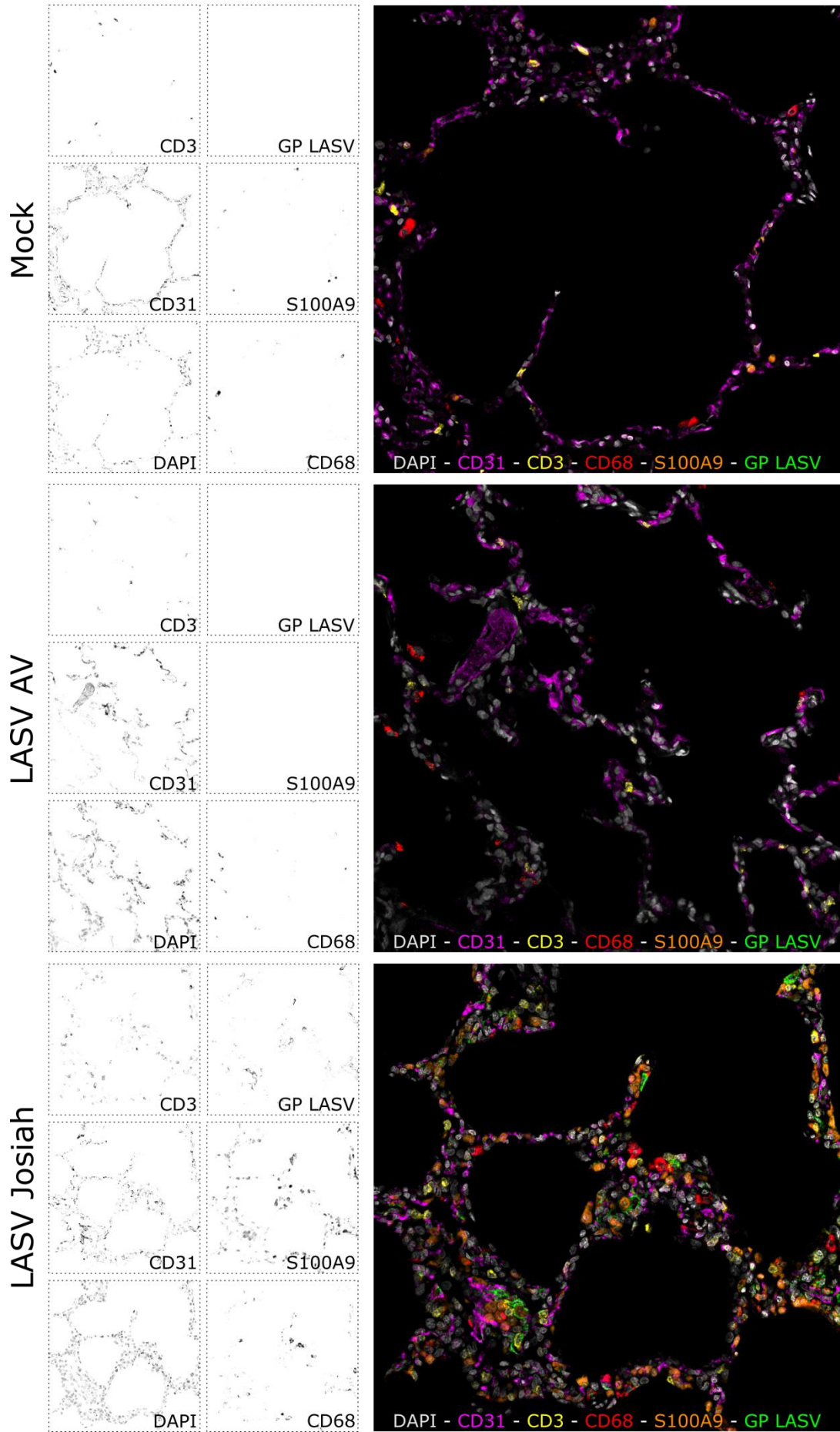
Nous avons adopté la même technique d'immunomarquages en multiplex, pour identifier les potentielles cibles discrètes de l'infection dans ces organes. Cela nous a également permis de répondre à une autre question importante, à savoir déterminer la nature des infiltrations de cellules mononucléées immunitaires dans les organes systémiques.

#### *1.C.i. Les cibles hépatiques de LASV et l'inflammation du foie*

On observe dans le foie une différence radicale entre l'infection létale et l'infection non létale (cf. **Figure 28**). Si de nombreux foyers hépatocytaires répliquent la souche Josiah, les seules cellules infectées par la souche AV sont des macrophages/monocytes. En effet, toutes les cellules infectées que l'on observe dans les tissus des singes infectés par LASV AV colocalisent avec le marqueur CD68, et quand on regarde plus en détail, on remarque que ces cellules sont toujours localisées dans des capillaires sinusoides hépatiques. Il s'agit donc probablement de monocytes (macrophages circulants) infectés, mais il semble que jamais l'infection ne traverse la barrière vasculaire, contrairement au cas de l'infection par LASV Josiah qui se répand dans l'organe. On identifie aussi des cellules CD68+ infectées par Josiah, certaines sont localisées dans des capillaires sinusoides mais d'autres sont infiltrées au cœur du tissu hépatique, il s'agit donc probablement de macrophages.

Du point de vue de l'inflammation, on identifie une hausse de la densité des LT et des macrophages, mais pas des neutrophiles, dans le foie des singes infectés par LASV AV comparativement aux singes contrôles. Chez les singes décédés, ces infiltrations sont encore plus intenses, notamment pour les LT, on identifie également de nombreux neutrophiles dans leur tissu hépatique. Sur l'image du foie du singe infecté par LASV Josiah, on peut très nettement observer un infiltrat de cellules immunitaires entre les deux gros vaisseaux (magenta). On remarque que certaines des cellules de cet infiltrat n'expriment aucun des marqueurs phénotypiques utilisés ici, il ne s'agit donc ni de LT, ni de macrophages ni de neutrophiles. Il faudrait refaire des expériences avec des marqueurs phénotypiques de LB, de DC et de cellules NK pour identifier s'il y a une correspondance avec certaines de ces cellules.





**Figure 28. Identification des cellules cibles de LASV dans le foie à 11 jpi.** Immunomarquages en multiplex des cellules endothéliales (CD31, magenta), des LT (CD3, jaune), des macrophages/monocytes (CD68, rouge), des neutrophiles (S100A9, orange), des cellules infectées par LASV (GP LASV, vert) et des noyaux cellulaires (DAPI, gris) dans le tissu hépatique. Les marquages individuels sont présentés au-dessus de chaque image polychrome, en nuances de gris inversées.

**Figure 29. Identification des cellules cibles de LASV dans le poumon à 11 jpi.** Immunomarquages en multiplex des cellules endothéliales (CD31, magenta), des LT (CD3, jaune), des macrophages/monocytes (CD68, rouge), des neutrophiles (S100A9, orange), des cellules infectées par LASV (GP LASV, vert) et des noyaux cellulaires (DAPI, gris) dans le tissu pulmonaire. Les marquages individuels sont présentés au-dessus de chaque image polychrome, en nuances de gris inversées.

### *1.C.ii. Les cibles pulmonaires de LASV et l'inflammation du poumon*

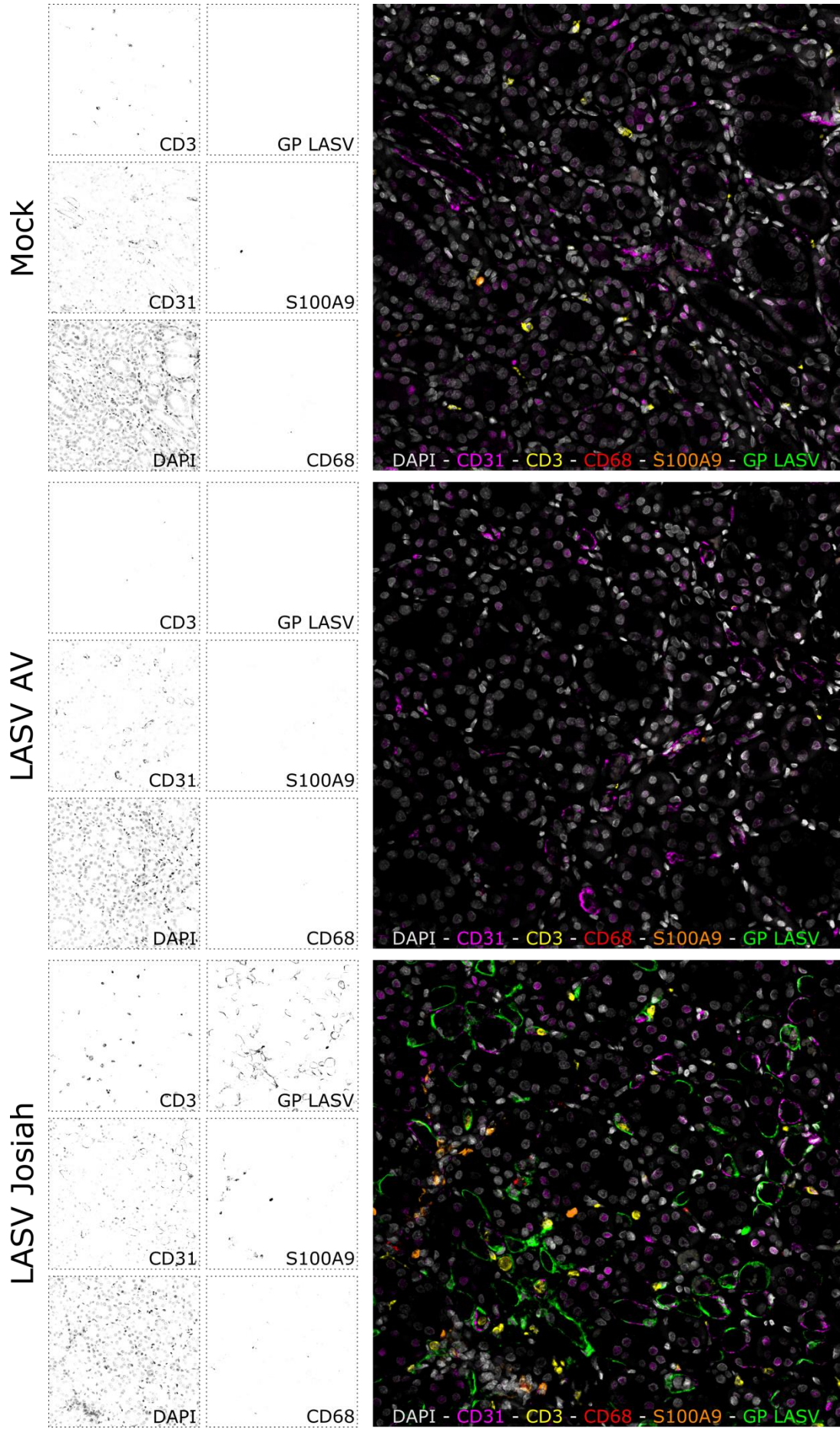
Le tissu pulmonaire est un des organes qui subit le plus de modifications morphologiques lors de l'infection par LASV. En effet, celle-ci peut s'accompagner d'un ensemble de symptômes respiratoires sévères qualifiés cliniquement de syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA). Sur la **Figure 29**, on remarque très nettement l'épaississement des parois alvéolaires lors de l'infection létale, ce qui est un des symptômes caractéristiques du SDRA.

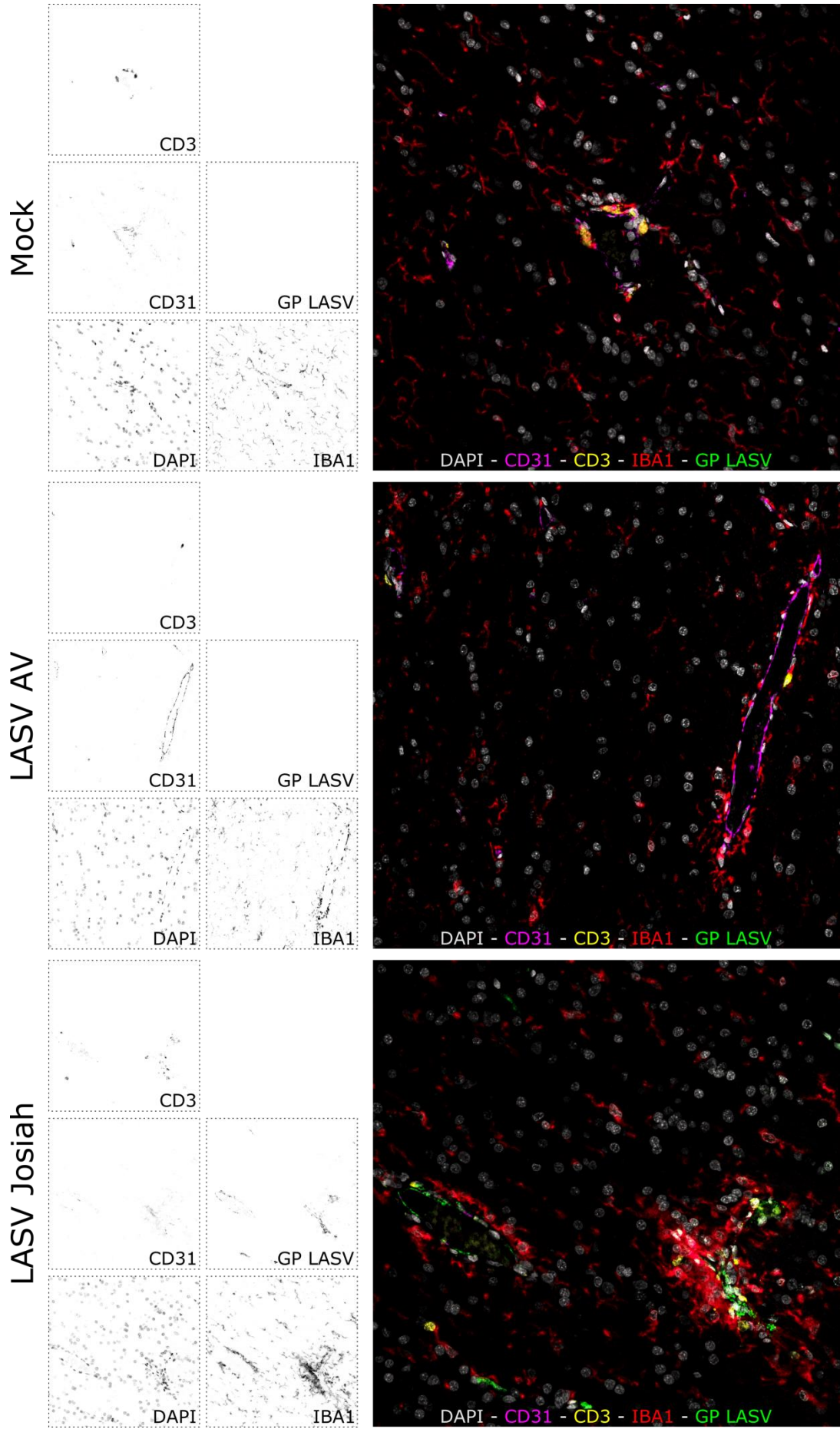
Le poumon des singes décédés n'apparaît pas massivement infecté malgré une anatomie montrant une pathologie avancée, seuls quelques clusters de cellules sont positifs pour LASV Josiah. Il s'agit majoritairement de neutrophiles (S100A9+) et de macrophages (CD68+) infectés, ainsi que de quelques cellules endothéliales (CD31+) et épithéliales (pneumocytes, identifiés par leur localisation). Comme évoqué précédemment, on n'observe pas de cellules infectées dans le poumon des singes survivants.

On constate un afflux modéré de macrophages et un afflux massif de LT et de neutrophiles dans les poumons des singes décédés. Ces cellules sont réparties de manière diffuse dans les parois alvéolaires et ne semblent pas former de clusters, l'intégralité du tissu pulmonaire est sujet à l'inflammation. Comme dans le foie, on remarque que certains types cellulaires infiltrés dans le tissu ne sont pas identifiés avec les marquages phénotypiques appliqués. On n'observe pas d'afflux de cellules immunitaires dans le poumon des singes survivants.

### *1.C.iii. Les cibles rénales de LASV et l'inflammation du rein*

Si nous n'avons pas détecté de cellules infectées dans le tissu rénal des singes survivants, nous pouvons clairement identifier que les cellules endothéliales du rein des singes décédés sont massivement infectées (cf. **Figure 30**). En effet le marquage viral colocalise précisément avec le marquage phénotypique CD31 (ils entrent même en compétition à la surface de certaines cellules), et aucun autre type cellulaire n'a été identifié comme permissif à l'infection dans le rein.







**Figure 30. Identification des cellules cibles de LASV dans le rein à 11 jpi.** Immunomarquages en multiplex des cellules endothéliales (CD31, magenta), des LT (CD3, jaune), des macrophages/monocytes (CD68, rouge), des neutrophiles (S100A9, orange), des cellules infectées par LASV (GP LASV, vert) et des noyaux cellulaires (DAPI, gris) dans le tissu rénal. Les marquages individuels sont présentés au-dessus de chaque image polychrome, en nuances de gris inversées.

**Figure 31. Identification des cellules cibles de LASV dans le cerveau à 11 jpi.** Immunomarquages en multiplex des cellules endothéliales (CD31, magenta), des LT (CD3, jaune), des cellules microgliales (IBA1, rouge), des cellules infectées par LASV (GP LASV, vert) et des noyaux cellulaires (DAPI, gris) dans l'encéphale. Les marquages individuels sont présentés au-dessus de chaque image polychrome, en nuances de gris inversées.

Contrairement à ce qu'on observe dans d'autres organes très atteints par l'infection, le rein des singes infectés par Josiah ne présente pas une inflammation très forte, bien qu'on note une légère augmentation de la densité de LT et de petits infiltrats de neutrophiles assez localisés. A nouveau, aucune différence n'est observée entre les singes survivants et les singes contrôles.

#### *1.C.iv. Les cibles encéphaliques de LASV et l'inflammation du cerveau*

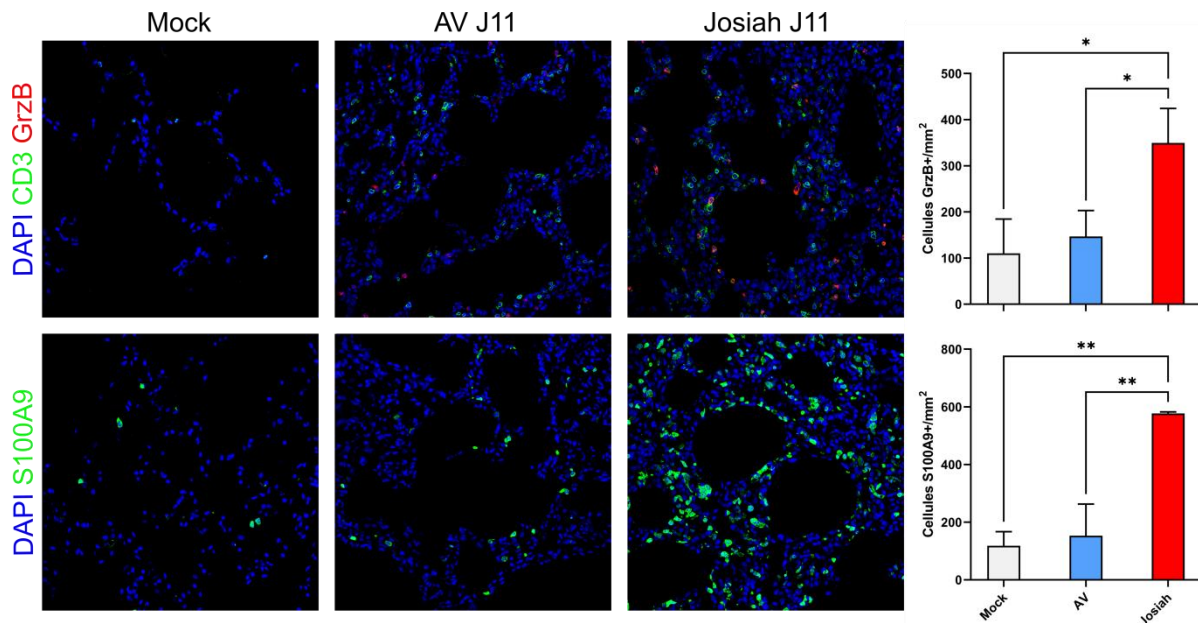
Pour finir, nous avons effectué des marquages viraux et phénotypiques dans le cerveau, en nous intéressant aux cellules endothéliales (CD31+), aux LT (CD3+) et à la microglie (IBA1+).

Les cellules porteuses de l'infection par la souche Josiah dans le cerveau sont exclusivement des cellules endothéliales (cf. **Figure 31**). Bien que l'immunomarquage viral entre en compétition avec celui dirigé contre CD31, la juxtaposition des immunomarquages et la structure des cellules positives pour l'infection ne laissent aucun doute quant à leur identification. L'encéphale des singes survivants n'est pas atteint par l'infection.

L'immunité du cerveau est bien particulière, en effet, s'agissant d'un organe immunoprivilégié, il est habituellement imperméable à l'infiltration des cellules circulantes du système immunitaire. La microglie, possédant des capacités phagocytaires et comparable à un réseau de macrophages, y assure la protection contre les antigènes extérieurs. On observe chez les singes décédés une activation de la microglie – identifiable par l'intensité du marquage IBA1 – et une relocalisation des cellules microgliales autour des cellules endothéliales infectées pour former des structures appelées nodules microgliaux. Ces nodules sont souvent associés à la manifestation clinique d'une encéphalite, chronique ou aiguë. De manière intéressante, on observe une accumulation de LT à l'intérieur des vaisseaux sanguins entourés par des nodules microgliaux, ce qui peut laisser imaginer une réponse immunitaire en dyade LT-microglie autour de ces cellules endothéliales porteuses de l'infection par la souche Josiah.

## 1.D. Quantification et dynamique des infiltrations de cellules immunitaires dans les organes

Nous avons quantifié les neutrophiles (S100A9+) et les cellules cytotoxiques (GrzB+) dans le poumon, le foie, le rein, le cerveau, les glandes surrénales et le thymus des singes contrôles et des singes infectés par LASV AV ou LASV Josiah aux différentes phases de l'infection. Les cellules marquées ont été dénombrées sur cinq champs aléatoirement choisis dans chaque organe de chaque individu, et les valeurs moyennes ont été retenues et sont présentées dans les représentations graphiques (cf. **Figures 32 à 34**). Chaque groupe comporte trois individus.

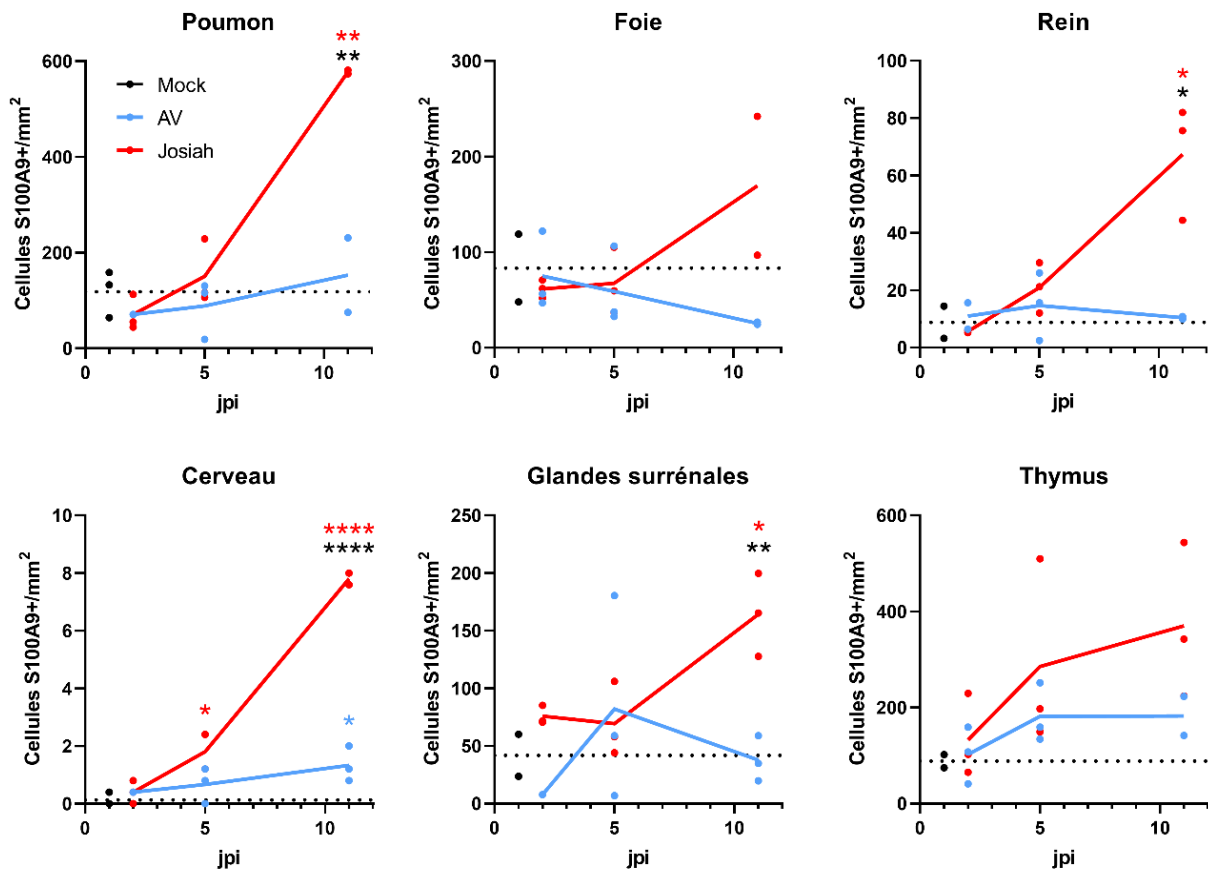


**Figure 32. Numération de marqueurs phénotypiques d'inflammation dans le poumon.** Images d'immunofluorescence de marqueurs de LT (CD3), de cellules cytotoxiques (GrzB) et de neutrophiles (S100A9) dans les poumons de macaques sains (Mock), survivants (AV) et décédés (Josiah) de l'infection par LASV. Les graphiques à droite représentent les numérations surfaciques de cellules positives pour Granzyme B (en haut) et pour S100A9 (en bas) réalisées sur des lames minces de poumons au pic des symptômes (11 jpi). Les conditions d'infection ont été comparées par ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Tukey. \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ .

La **Figure 32** montre un exemple des marquages utilisés pour effectuer la numération des cellules inflammatoires dans le poumon, et les histogrammes qui en découlent. On y observe une nette augmentation du nombre de cellules GrzB+ et S100A9+ par unité de surface chez les singes infectés par LASV Josiah à 11 jpi. On montre également, grâce au double marquage CD3/GrzB, que les cellules cytotoxiques ne sont pas des LT. Nous pouvons raisonnablement supposer qu'il s'agit de cellules NK, bien que nous n'ayons pas pu le vérifier formellement.

On assiste à une infiltration significative de neutrophiles dans le poumon, le rein et les glandes surrénales des singes infectés par LASV Josiah à 11 jpi, qui n'intervient

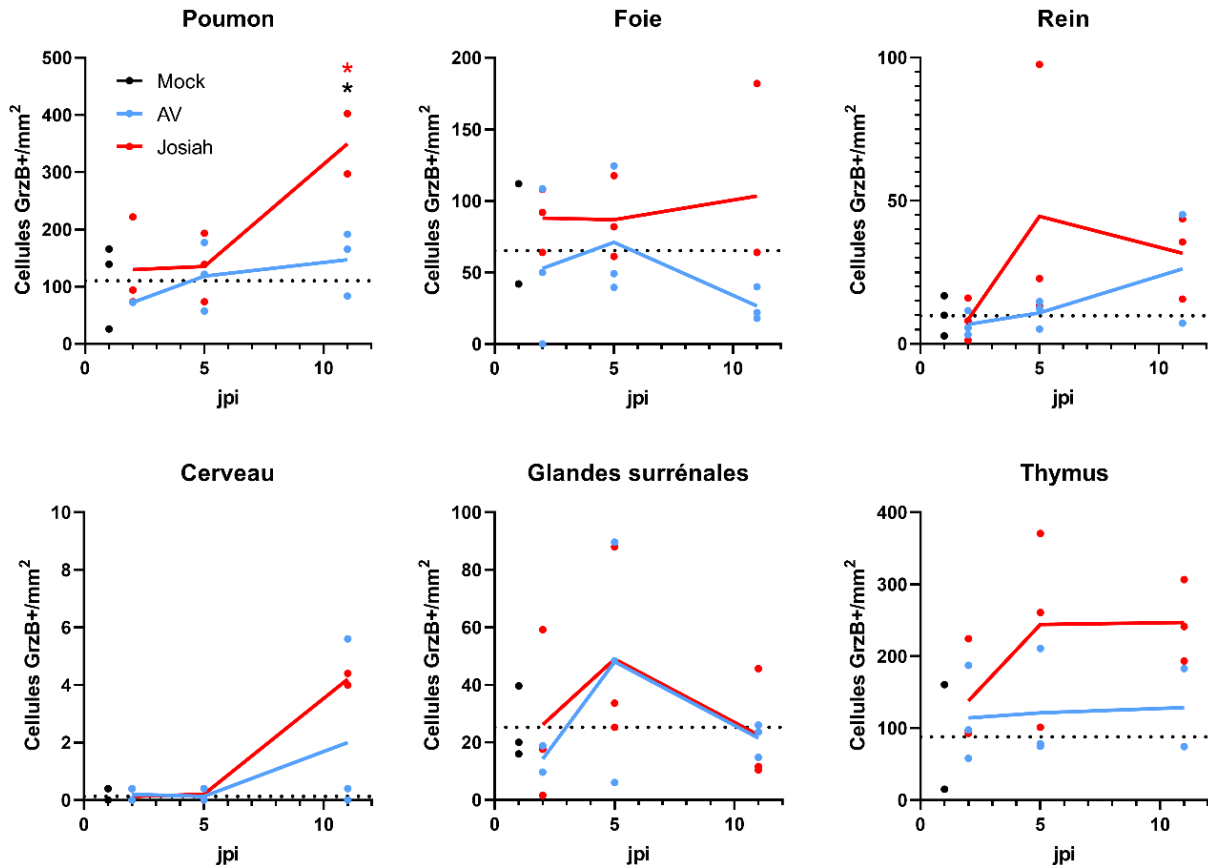
pas chez les singes infectés par LASV AV (cf. [Figure 33](#)). On note également une présence plus forte de neutrophiles dans le cerveau des singes décédés dès 5 jpi et surtout lors de la phase aiguë où le phénomène est décelable dans des proportions bien moindres chez les singes survivants. Toutefois, cette observation est à relativiser dans cet organe, étant donné le très faible nombre absolu de cellules positives dénombrées dans le tissu encéphalique. Dans le thymus, qui n'est pas comparable aux autres organes présentés du fait de sa nature lymphoïde, on détecte une augmentation nette mais non significative du nombre de neutrophiles chez tous les singes infectés, bien qu'elle soit plus marquée chez les décédés.



**Figure 33. Mise en évidence d'infiltration neutrophilique dans les organes lors de l'infection létale.** Numérations surfaciques des neutrophiles exprimant S100A9 réalisées sur des lames minces de cinq organes non lymphoïdes et d'un OLP (thymus) au cours des phases précoce (2 jpi), d'incubation (5 jpi) et aiguë (11 jpi). Les lignes en pointillés et les points noirs représentent les valeurs moyennes et individuelles obtenues chez les singes Mock (n=3). A chaque point de temps, les conditions d'infection ont été comparées par ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Tukey. Les astérisques colorés montrent les différences entre les conditions d'infection par LASV (AV en bleu, Josiah en rouge) et la condition contrôle. Les astérisques noirs matérialisent les différences entre les conditions AV et Josiah. \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ .

On identifie une accumulation de cellules cytotoxiques dans le poumon des singes mortellement infectés uniquement (cf. [Figure 34](#)). Cette augmentation est probablement en partie due au fait que l'épaississement pariétal cause une hausse nette

de la surface pulmonaire occupée par du tissu et non par l'espace alvéolaire. On ne détecte pas de différences significatives dans les autres organes, mais une augmentation notable du nombre de cellules GrzB+ a lieu dans le thymus des singes infectés par LASV Josiah, à partir de 5 jpi.



**Figure 34. Quantification de l'infiltration de cellules cytotoxiques dans les organes lors de l'infection par LASV.** Numérations surfaciques des cellules cytotoxiques exprimant Granzyme B réalisées sur des lames minces de cinq organes non lymphoïdes et d'un organe lymphoïde primaire (thymus) au cours des phases précoce (2 jpi), d'incubation (5 jpi) et aiguë (11 jpi). Les lignes en pointillés et les points noirs représentent les valeurs moyennes et individuelles obtenues chez les singes Mock (n=3). A chaque point de temps, les conditions d'infection ont été comparées par ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Tukey. Les astérisques colorés montrent les différences entre les conditions d'infection par LASV (AV en bleu, Josiah en rouge) et la condition contrôle. Les astérisques noirs matérialisent les différences entre les conditions AV et Josiah. \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ .

## 2. Evaluation comparative des réponses cellulaires spécifiques lors des infections létales et non létales, dans le sang et les organes lymphoïdes

Le premier axe de notre étude nous a permis de mettre en avant l'importance radicale des OLS dans le contrôle de l'infection par AV et la survie des animaux. En effet la différence entre l'infection létale et non létale semble essentiellement résider dans les phénomènes immunitaires qui prennent place dans les OLS et entraînent le contrôle de l'infection et une issue favorable dans un cas, ou une réplication non régulée et une dissémination virale systémique qui entraîne la mort dans l'autre.

Dans ce deuxième axe, nous avons cherché à caractériser ces différences de réponses immunitaires en nous focalisant sur le comportement des différents types cellulaires à l'œuvre lors des réponses innée et adaptative. C'est pourquoi nous avons investigué ces réponses grâce à des techniques variées et au cœur des compartiments qui semblent avoir une activité centrale dans l'issue de l'infection : le sang (PBMC) et les OLS (GGI, GGM et rate).

### 2.A. Etude comparative et dynamique de la composition cellulaire des PBMC et des OLS au cours de l'infection, grâce à la technique de déconvolution du transcriptome

Nous souhaitons développer une approche non biaisée pour estimer la composition et l'abondance de chaque type cellulaire immunitaire dans les PBMC et les OLS, au cours de l'infection par LASV. C'est pourquoi nous avons eu recours à une méthode bio-informatique appelée déconvolution du transcriptome, qui utilise comme données d'entrée des données de transcriptomique obtenues à partir d'un mélange de cellules ou d'un organe total. En utilisant une signature matricielle de référence et une méthode bio-informatique choisie, cette analyse permet d'inférer les proportions des différents types cellulaires présents dans un mélange de cellules dont on a au préalable établi le transcriptome. En fonction des paramètres de l'étude, il existe de nombreuses signatures matricielles et méthodes informatiques de déconvolution qui peuvent être sélectionnées. Ne pouvant présumer quelle combinaison signature-méthode serait la plus adaptée au cadre de notre analyse, nous en avons testé un grand nombre et sélectionné l'association la plus pertinente. Expliquons d'abord comment nous avons choisi ces paramètres.

#### 2.A.i. *Choix de la signature et de la méthode de déconvolution*

La signature est une matrice qui contient une liste des types cellulaires attendus dans l'organe ou le mélange cellulaire d'intérêt et qui énumère les gènes spécifiques – ainsi que leurs niveaux d'expression attendus – de chaque type cellulaire. Le plus souvent, ces signatures sont générées à partir de données de transcriptomique sur

cellules uniques (technologie du *single-cell RNAseq*, scRNAseq), provenant d'une ou plusieurs études et compilées sous la forme d'une matrice d'expression génique. La méthode bio-informatique, quant à elle, permet de calculer un coefficient de corrélation entre le transcriptome de l'organe total et l'expression individuelle de référence de chaque population cellulaire présente dans la signature, permettant ainsi d'inférer la proportion relative de chaque type cellulaire dans l'échantillon de départ.

### ***Choix de la signature d'expression génique***

Pour chaque organe d'intérêt, il existe généralement plusieurs atlas réalisés grâce au *single-cell RNAseq*, mais tous n'ont pas la même profondeur et certains ne sont pas exhaustifs quant à la caractérisation des différents types cellulaires présents. Techniquement, on construit un atlas en dilacérant l'organe d'intérêt, en séparant les différents types cellulaires grâce à des réseaux microfluidiques, puis en identifiant la nature des cellules grâce à des marqueurs phénotypiques pour enfin générer les transcriptomes de chacune de ces cellules indépendamment. Nous avons choisi les matrices signatures en tenant compte de deux critères :

- **L'exhaustivité de la liste des types cellulaires qu'elles comprennent :** il est très important de choisir une matrice signature qui prenne en compte un maximum de types cellulaires effectivement présents dans l'organe d'intérêt, sans quoi les valeurs des proportions inférées se trouveraient surestimées. En effet, les proportions cellulaires calculées sont des proportions relatives, ainsi la somme des proportions de tous les types cellulaires présents dans la signature sera égale à 1, et ce même si certains types cellulaires prépondérants n'y figurent pas.
- **La diversité des cellules immunitaires représentée dans la signature :** lorsqu'on s'intéresse à des organes non lymphoïdes, les cellules immunitaires sont généralement très minoritaires bien que de petites populations résidentes de LB, LT, macrophages et cellules NK existent en condition basale. Or, dans le cadre de l'infection par LASV, nous avons démontré l'infiltration de nombreux types de cellules immunitaires dans les organes systémiques, il est donc nécessaire de disposer d'une signature qui contienne la plus grande diversité possible de ces cellules, pour déterminer lesquelles d'entre elles sont actrices de l'inflammation tissulaire. La déconvolution permet aussi d'évaluer l'état d'activation de certaines populations immunitaires, puisque cela modifie la signature d'expression des gènes. On essaye donc de sélectionner la matrice qui nous permet d'avoir la plus grande finesse d'analyse des sous-populations immunitaires et de leur activation.

Dans le cas des PBMC, plusieurs signatures matricielles existent et ont été réalisées à partir d'échantillonnages assez différents. La signature de référence pour les PBMC dans la littérature est la matrice LM22 <sup>278</sup>. Elle comprend 22 conditions

distinctes (types cellulaires ou états d'activation/maturation) et elle a été générée lors d'une étude de scRNAseq sur des cellules immunitaires prélevées en environnement tumoral. C'est également le cas de la signature ImmSig<sup>279</sup>, qui a permis d'identifier 7 types cellulaires majeurs présents dans une tumeur. Aujourd'hui, la signature ImmunoStates (comprenant 20 conditions distinctes) est décrite comme étant la plus conforme à la réalité biologique des échantillons, car elle a l'avantage d'avoir été élaborée à partir d'un échantillon hétérogène de PBMC de patients sains et de patients atteints par diverses maladies<sup>280</sup>. Cependant, la signature LM22 reste la plus complète en nombre de conditions évaluées et également la plus utilisée dans la littérature, notamment dans les études de virologie, c'est donc dans un objectif de cohérence que nous avons décidé de l'utiliser pour nos analyses sur les PBMC<sup>199,281</sup>.

Par extension et au prix d'une légère approximation, nous avons décidé de conserver la même signature pour effectuer l'analyse sur les OLS (GGM et rate). En effet, les transcriptomes d'OLS ont été obtenus à partir de broyats et filtrations des cellules de ces organes, ce qui permet de considérer que les FRC, les fibroblastes et autres cellules à rôle structural dans les OLS sont très minoritaires dans le mélange cellulaire. La complétude de la signature LM22 quant aux profils de cellules immunitaires nous a incités à nous affranchir de la présence a priori négligeable de cellules non lymphoïdes dans nos échantillons. Il convient de rappeler que les valeurs inférées par la déconvolution sont des proportions relatives et donc possiblement surestimées dans les OLS par rapport à la réalité.

### ***Choix de la méthode de déconvolution***

Bien que Vallania *et al.* aient montré que le choix de la méthode n'avait qu'un effet minime sur les résultats obtenus (à signature égale)<sup>280</sup>, il existe un grand nombre de méthodes bio-informatiques pour faire de la déconvolution : CIBERSORT/CIBERSORTx (*cell-type identification by estimating relative subsets of RNA transcripts*), ElasticNet, OLS, Ridge, LASSO, NNLS et FARDEEP. Nous avons traité nos données de transcriptome avec chacune d'entre elles dans le but de déterminer la plus pertinente pour notre modèle d'étude. Les paramètres définis dans chacune des méthodes ne varient que légèrement, mais elles se différencient notamment par la présence de seuils dans les coefficients de corrélation calculés pour la prépondérance de chacune des populations cellulaires d'intérêt. Par exemple, Lasso et ElasticNet présentent des profils peu nuancés, car ces méthodes établissent à zéro la proportion des types cellulaires qui sont en dessous d'un certain seuil, ce qui gomme la représentation, même minime, de certains types cellulaires d'intérêt. Etant donné les objectifs de notre étude, nous souhaitons être capables d'identifier des variations même infimes de composition cellulaire des tissus, c'est pourquoi nous nous sommes orientés vers les méthodes les moins stringentes. D'autre part, nous voulions sélectionner une même méthode pour l'intégralité de notre étude sur les différents organes, dans un

souci de cohérence statistique. Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode CIBERSORT/CIBERSORT<sub>x</sub><sup>278,282,283</sup>, qui est la plus utilisée par les bio-informaticiens dans la littérature et notamment dans différentes études menées chez le singe<sup>199,281</sup> et l'humain.

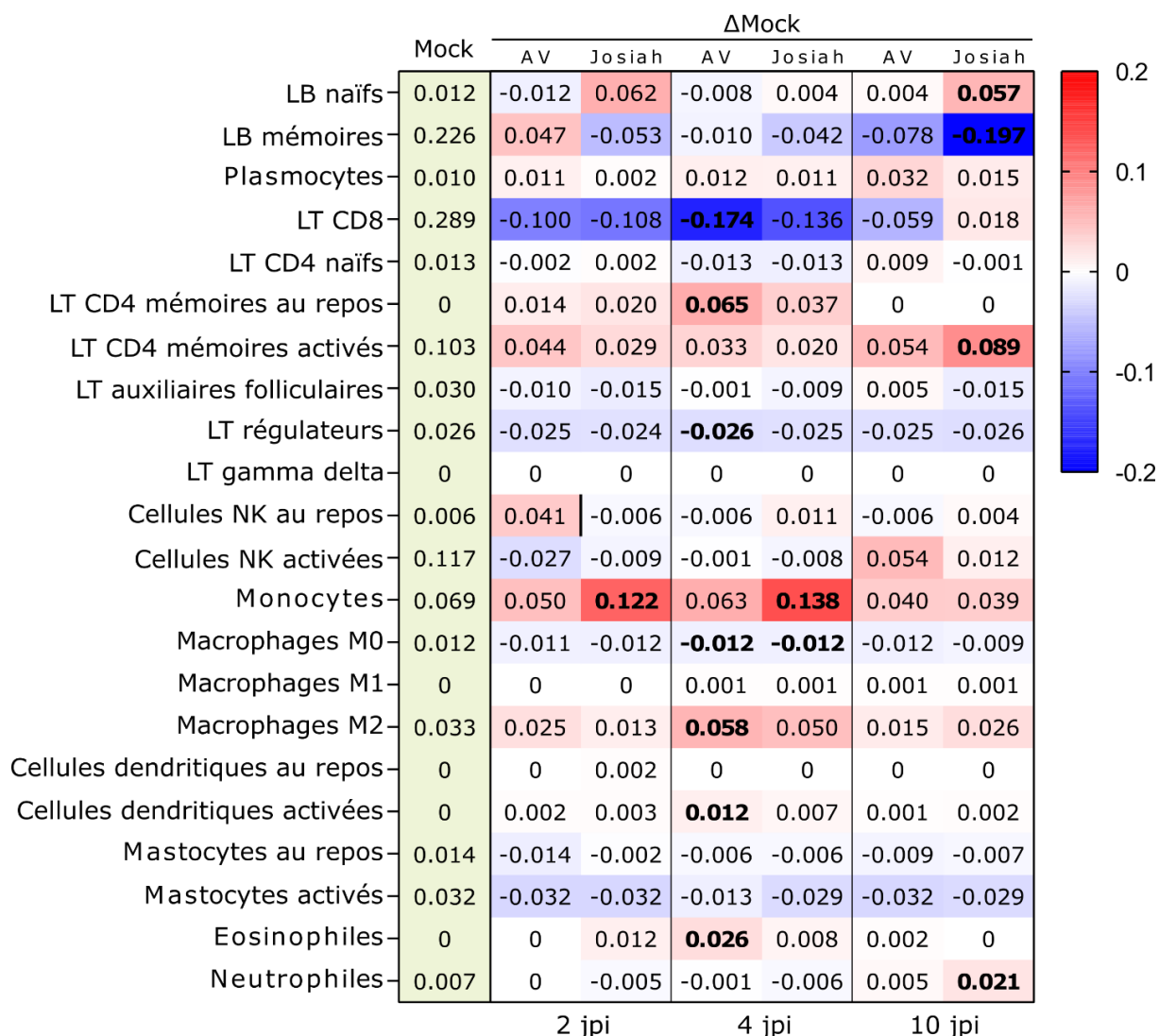
*2.A.ii. Evaluation de la dynamique de la réponse immunitaire des PBMC grâce à la méthode de déconvolution du transcriptome*

Nous avons réalisé le transcriptome des PBMC lors de l'infection par LASV AV et LASV Josiah à partir des prélèvements de sang de trois singes suivis lors de la phase précoce (2 jpi), de la phase d'incubation (4 jpi) et de la phase aiguë (11 jpi) de la maladie (cf. **Figure 35**).

Si on s'intéresse d'abord à la lignée lymphoïde, on note une baisse significative des LB<sub>mém</sub> circulants chez Josiah à 11 jpi. Celle-ci s'accompagne d'une hausse des LB naïfs et des plasmocytes, mais on peut imaginer qu'une partie des LB<sub>mém</sub> a été dirigée vers les OLS ou a subi la lymphopénie. On remarque que la proportion de plasmocytes est plus élevée chez AV que chez Josiah, ce qui peut laisser supposer une réponse anticorps plus efficace. Les LT CD8+ semblent, quant à eux, subir une forte lymphopénie à 2 et 4 jpi, quelle que soit l'issue de l'infection et qui se prolonge à 11 jpi avec LASV AV, tandis que les LT CD4+ s'accumulent dans les PBMC, et s'activent très significativement lors de la phase aiguë. En revanche, il semble que les proportions des LT<sub>rég</sub> diminuent au cours de l'infection par LASV. On note une augmentation d'environ 50% des NK activés à 11 jpi avec AV (par rapport au niveau basal), tandis qu'elle n'est que d'environ 10% pour Josiah. L'activation des NK semble contribuer à la protection des singes infectés par LASV.

Si on se concentre sur la lignée myéloïde, on note qu'une forte augmentation des monocytes intervient précocement lors de l'infection létale. On assiste en parallèle à la différenciation des macrophages M0, qui se polarisent majoritairement en macrophages M2. Les macrophages M1 sont activés par la voie classique de l'IFN $\gamma$ , ils acquièrent une activité phagocytaire et produisent des cytokines pro-inflammatoires et du monoxyde d'azote (NO) pour initier une réponse immunitaire antivirale ou antibactérienne. Les macrophages M2 sont quant à eux activés par plusieurs cytokines (IL-4, IL-10, IL-13) et sont impliqués dans les voies de régulation de la réponse immune et de réparation des dommages tissulaires (induction de la production de collagène, induction de l'angiogenèse). Ils ne participent pas à la présentation antigénique, et leur profil d'activation est parfois rapproché de celui des *Myeloid-derived Suppressor Cells* (MDSC). On observe aussi une hausse d'activation des DC à 4 jpi, plus importante chez les singes survivants que chez les décédés. On assiste également à une augmentation transitoire de la proportion de granulocytes éosinophiles à 4 jpi avec AV, et à une hausse de 200% de la proportion de neutrophiles chez Josiah lors de la phase aiguë.





**Figure 35. Composition cellulaire des PBMC des singes cynomolgus au cours de l'infection par LASV.** Les valeurs présentées ont été obtenues par déconvolution du transcriptome des PBMC, en utilisant la méthode CIBERSORT et la matrice signature LM22. La colonne Mock présente les proportions moyennes de chaque type cellulaire mesurées dans les PBMC des singes contrôles (n=3). Les autres colonnes montrent la différence entre la valeur moyenne de chaque condition et la valeur moyenne des singes Mock. L'échelle de couleur montre l'intensité des variations observées entre chaque condition et la condition contrôle, les augmentations en rouge et les diminutions en bleu. Les valeurs apparaissent en gras lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) avec la valeur contrôle a été mise en évidence par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples. Un trait vertical noir sépare les conditions LASV AV et Josiah (au même point de temps) lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) a été établie entre elles par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples.

### *2.A.iii. Evaluation de la dynamique de la réponse immunitaire des OLS grâce à la méthode de déconvolution du transcriptome*

Le transcriptome des OLS a été obtenu à partir du mélange cellulaire issu du broyat des GGM et de la rate, lors des autopsies programmées ou causées par l'infection. Nous disposons donc des transcriptomes de la rate et des GGM lors de toutes les phases de la maladie, y compris la phase convalescente (28 jpi). Il convient

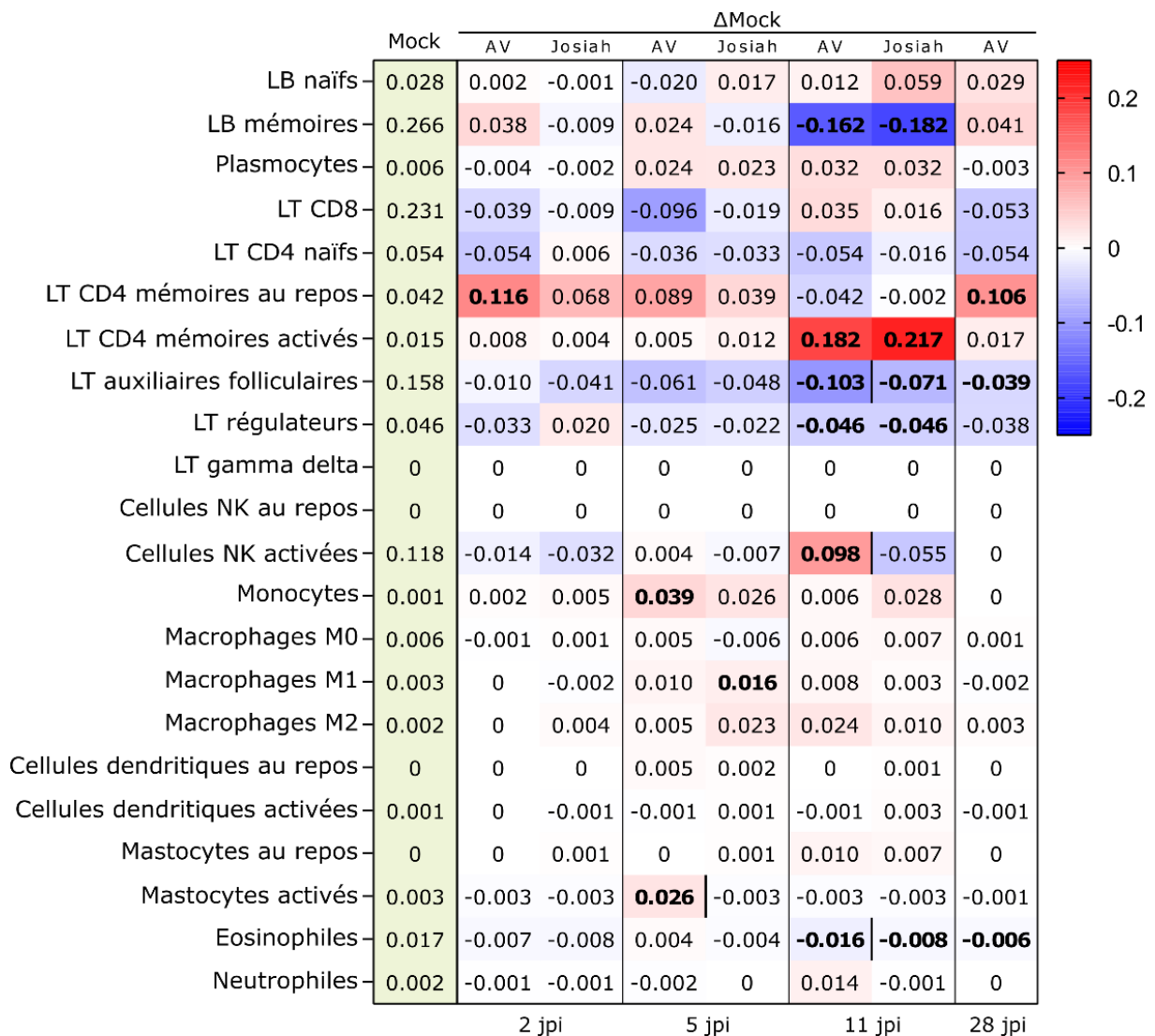
toutefois de préciser qu'ici, et contrairement au cas des PBMC présenté ci-dessus, les transcriptomes aux différents jours ont été obtenus à partir d'individus différents (n=3 pour chaque jour et chaque condition).

Les variations observées dans les GGM (cf. **Figure 36**) et dans la rate (cf. **Figure 37**) sont fortement comparables, notamment pour la réponse des LB, où on assiste à une forte diminution de la proportion des LB<sub>mém</sub> à 11 jpi dans les deux compartiments, accompagnée d'une sensible augmentation des plasmocytes, significativement plus élevée dans la rate pour Josiah que pour AV. La présence des LB<sub>mém</sub> augmente à nouveau sensiblement lors de la phase de convalescence des singes survivants. Les proportions des différentes populations de LT sont quant à elles assez différentes entre la rate et les GGM en condition basale, et on assiste notamment à une très forte augmentation du nombre de LT CD8+ dans la rate tout au long de l'infection (mais moins marquée à 5 jpi), mais principalement lors de la phase aiguë chez les singes survivants. On note un amorçage précoce de la différenciation des LT CD4+ naïfs en LT CD4+ mémoires au repos dans les GGM, suivi par une forte activation de cette population mémoire à 11 jpi, et un retour à l'état de repos lors de la convalescence, dans les deux organes observés. On note une forte baisse des LT auxiliaires folliculaires et des LT régulateurs durant la phase aiguë. Dans les deux types d'organes, on remarque une activation des NK à 11 jpi associée à la survie, et complètement absente chez les singes décédés.

Quant aux cellules d'origine myéloïde, on observe une augmentation transitoire du nombre de monocytes à 5 jpi (sauf dans la rate avec LASV AV), quelle que soit l'issue de l'infection ainsi qu'une hausse modérée du nombre de macrophages M1 et M2 chez les singes infectés par LASV Josiah, tandis qu'elle est plus tardive et intervient à 11 jpi avec LASV AV. On identifie une activation des mastocytes à 5 jpi lors de l'infection non létale dans les GGM tandis qu'elle est plus tardive lors de l'infection létale et apparaît seulement dans la rate (11 jpi). Enfin, le nombre d'éosinophiles chute dans les deux conditions tout au long de l'infection, à l'inverse du nombre de neutrophiles qui croît sensiblement à 5 et 11 jpi dans la rate, et dans les GGM des singes survivants à 11 jpi.

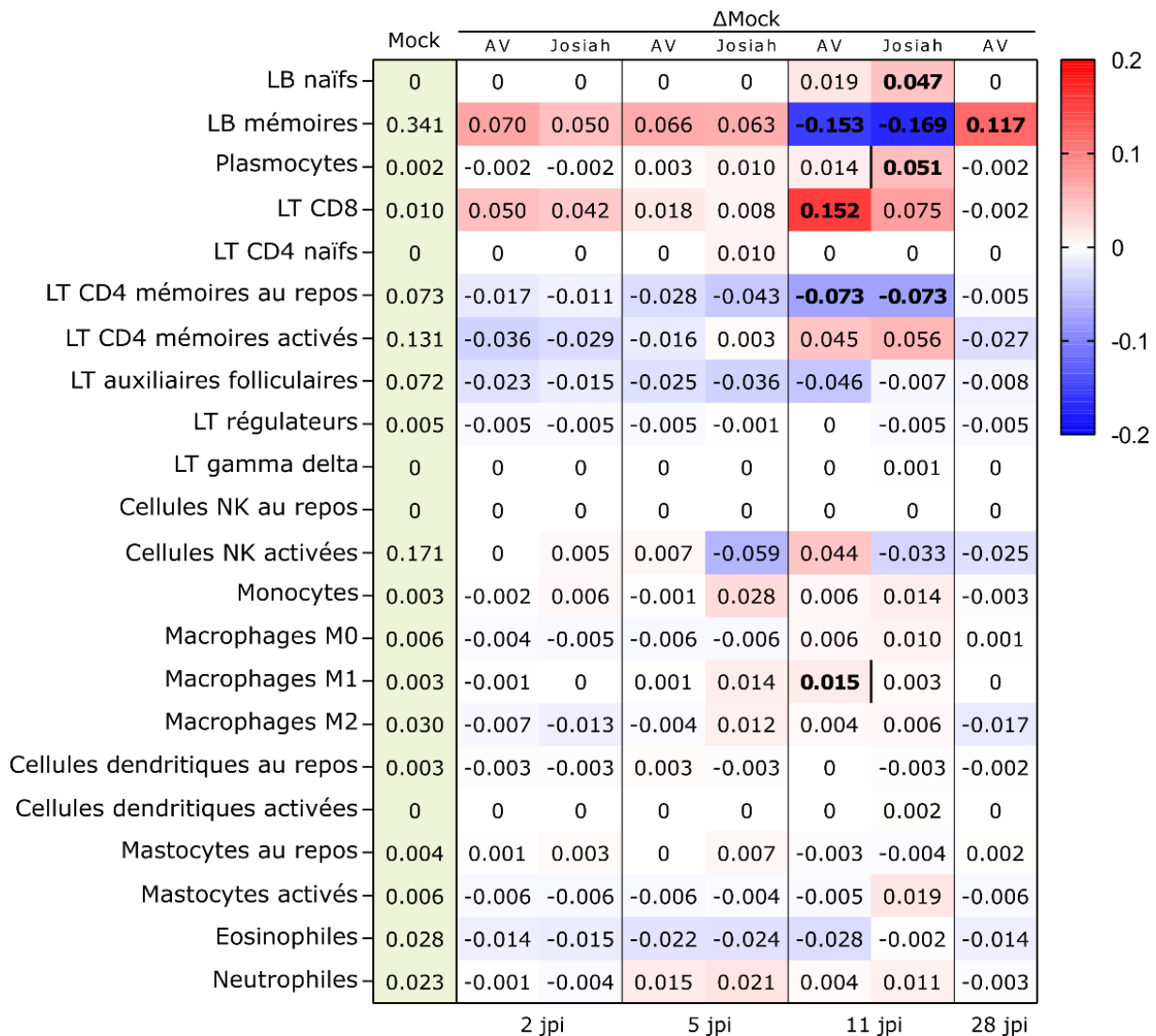
Si on essaie de tirer un bilan global des dynamiques cellulaires observées dans trois compartiments différents (les PBMC, les GGM et la rate), on note une forte diminution de la proportion des LB<sub>mém</sub> dans chacun d'entre eux à 11 jpi, toujours accompagnée d'une augmentation du nombre de plasmocytes, quelle que soit l'issue de l'infection, ainsi que du nombre de LB naïfs, plus fortement caractérisée lors de l'infection létale. On peut imaginer que les LB<sub>mém</sub> sont très affectés par la lymphopénie connue et décrite lors de l'infection par LASV, et qui intervient généralement entre 4 et 8 jpi. Le rebond du nombre de LB naïfs peut s'expliquer par la lymphocytose consécutive à la lymphopénie, attendue entre 9 et 12 jpi, et qui pourrait orienter les

nouveaux LB vers une différenciation en plasmocytes. Durant la phase de convalescence des singes survivants, on observe une recrudescence forte des LB<sub>mém</sub> dans les OLS. On peut toutefois mettre ces résultats en perspective avec le fait que la réponse B ne semble que secondaire dans la survie des individus lors de l'infection par LASV, les anticorps produits échouant très majoritairement à neutraliser le virus.



**Figure 36. Composition cellulaire des GGM des singes cynomolgus au cours de l'infection par LASV.** Les valeurs présentées ont été obtenues par déconvolution du transcriptome des ganglions mésentériques, en utilisant la méthode CIBERSORT et la matrice signature LM22. La colonne Mock présente les proportions moyennes de chaque type cellulaire mesurées dans les GGM des singes contrôles (n=3). Les autres colonnes montrent la différence entre la valeur moyenne de chaque condition et la valeur moyenne des singes Mock. L'échelle de couleur montre l'intensité des variations observées entre chaque condition et la condition contrôle, les augmentations en rouge et les diminutions en bleu. Les valeurs apparaissent en gras lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) avec la valeur contrôle a été mise en évidence par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples. Un trait vertical noir sépare les conditions LASV AV et Josiah (au même point de temps) lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) a été établie entre elles par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples.

Les LT CD8+ semblent être à la fois fortement impactés par la lymphopénie à 5 jpi et par un changement de compartiment avec un possible adressage de cette population vers la rate, où la proportion de LT CD8+ augmente sensiblement dès 2 jpi et surtout à 11 jpi. On assiste à un phénomène très net d'activation des LT CD4+ mémoires dans les trois compartiments observés, qui met en évidence la mise en place d'une réaction cellulaire des LT induite par l'infection. En revanche, on n'observe peu ou pas de différence d'intensité entre les réponses apparentes des LT induites par LASV AV et Josiah, ce qui ne permet pas de corréliser directement ces observations à la survie. Par ailleurs, les LT auxiliaires folliculaires et régulateurs diminuent fortement à 11 jpi dans les GGM, bien que les OLS soient leur zone d'action quasi exclusive. Une absence de ces types cellulaires dans les OLS peut entraîner une déstructuration des centres germinatifs et un contrôle non efficace de la réponse effectrice des LT, ce qui contribue à une dérégulation généralisée de la réponse adaptative.



**Figure 37. Composition cellulaire de la rate des singes cynomolgus au cours de l'infection par LASV.** Les valeurs présentées ont été obtenues par déconvolution du transcriptome de la rate, en utilisant la méthode CIBERSORT et la matrice signature LM22. La colonne Mock présente les

proportions moyennes de chaque type cellulaire mesurées dans la rate des singes contrôles (n=3). Les autres colonnes montrent la différence entre la valeur moyenne de chaque condition et la valeur moyenne des singes Mock. L'échelle de couleur montre l'intensité des variations observées entre chaque condition et la condition contrôle, les augmentations en rouge et les diminutions en bleu. Les valeurs apparaissent en gras lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) avec la valeur contrôle a été mise en évidence par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples. Un trait vertical noir sépare les conditions LASV AV et Josiah (au même point de temps) lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) a été établie entre elles par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples.

Enfin, il semble que l'activation des NK soit un facteur très associé à la survie, dans tous les compartiments, ce qui laisse envisager une action protectrice de ces cellules de l'immunité innée. A l'inverse, l'issue fatale corrèle avec un afflux fort et précoce de monocytes dans le sang.

Essayons maintenant de caractériser plus finement les différentes tendances observées grâce à la déconvolution du transcriptome, à commencer par la réponse cellulaire des LT.

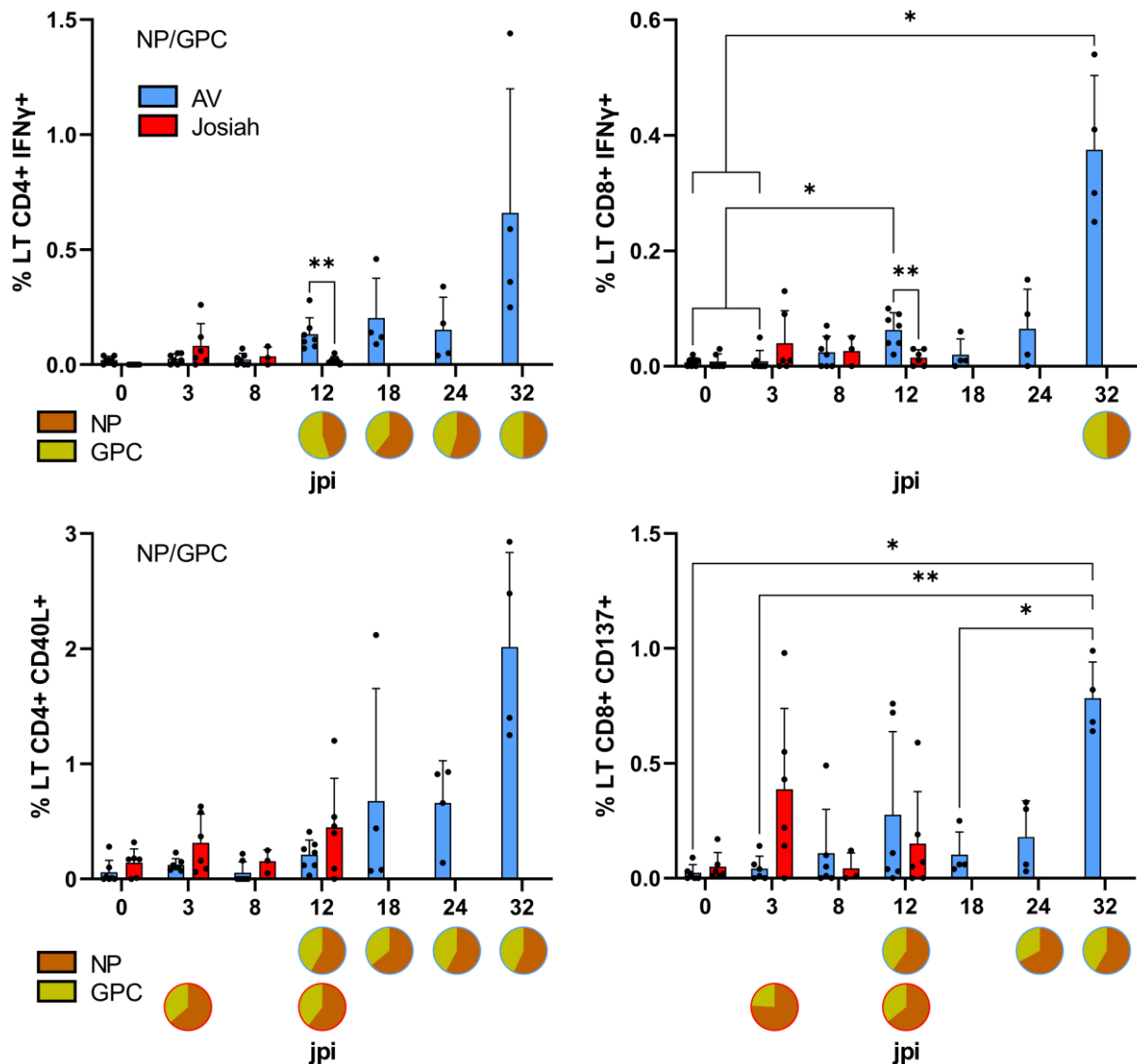
## **2.B. Mise en évidence d'une réponse T effectrice protectrice dans les PBMC et les OLS des singes survivants**

Dans l'objectif d'évaluer la réponse cellulaire des lymphocytes T circulants dans le sang ou résidents dans les OLS, nous avons incubé des cellules isolées de ces compartiments en présence d'un mélange de peptides de synthèse recouvrant l'intégralité de la séquence protéique de la NP ou de la GPC virale. Nous précisons que des mélanges peptidiques homologues des souches d'infection ont été utilisés pour la stimulation – NP<sub>AV</sub> et GPC<sub>AV</sub> pour les singes survivants et NP<sub>Josiah</sub> et GPC<sub>Josiah</sub> pour les singes décédés – et que nous n'avons pas cherché à mettre en évidence une quelconque réponse croisée. Nous avons ensuite quantifié la réponse T auxiliaire 1 (Th1) ainsi que l'état général d'activation des LT par cytométrie en flux, en nous intéressant à la sécrétion d'IFN $\gamma$  d'une part, et à la présence de marqueurs de surface d'activation d'autre part : CD40L (spécifique des LT CD4+) et CD137 (plutôt spécifique des LT CD8+ chez le macaque). Précisons que nous n'observons ici que la réponse spécifique induite par la reconnaissance des motifs protéiques viraux, le niveau basal d'expression des différents marqueurs ayant été soustrait grâce à la condition contrôle (absence de peptides). Enfin, bien que correspondant à deux conditions expérimentales distinctes, les réponses spécifiques de la NP et celles spécifiques de la GPC ont été cumulées sur les représentations graphiques, une même cellule ne pouvant pas répondre spécifiquement à deux antigènes différents. Nous n'avons pas mesuré la réponse induite par la Z ni par la L, car la dernière est produite en quantité bien moindre que les autres protéines virales, et la Z n'a pas été décrite comme très immunogène<sup>200</sup>.

### *2.B.i. Mise en évidence d'une réponse T spécifique protectrice dans les PBMC*

Au sein des populations de LT CD4+ et CD8+, nous observons chez les survivants une présence croissante de cellules sécrétant de l'IFN $\gamma$  en réponse à la stimulation peptidique, à partir de 12 jpi et jusqu'au point terminal de l'expérience, à 32 jpi (cf. **Figure 38**). Cette augmentation est significative entre le niveau basal et le temps précoce (0 et 3 jpi) et les phases aiguë et convalescente (12 et 32 jpi) dans les LT CD8+ des singes survivants. Au moment du pic de la maladie (12 jpi), on mesure également une différence statistiquement significative entre la réponse des singes infectés par Josiah et ceux infectés par AV, la sécrétion d'IFN $\gamma$  n'étant induite que chez les survivants. On note aussi que le niveau d'activation des LT en réponse à la mise en contact avec les peptides viraux augmente sensiblement au cours de l'infection chez les survivants, bien que cette augmentation intervienne assez tardivement (premiers signes à 12 jpi, tendance plus claire à partir de 24 jpi). L'activation des LT CD8+ – évaluée grâce à l'expression de CD137 – est notamment significative lorsqu'on compare les temps 0, 3 et 18 jpi au temps final (32 jpi). L'augmentation de l'expression du marqueur CD40L chez les LT CD4+ des singes survivants est très nette à 32 jpi, bien que le test de comparaison multiple employé n'ait pas renvoyé une p-value inférieure au seuil des 5% de risque (analyse à effets mixtes :  $p < 0.01^{**}$  ; 0 jpi vs 32 jpi :  $p = 0,0519$ ). On note une tendance très précoce (3 jpi) à l'activation des LT CD8+ par la NP lors de l'infection par LASV Josiah, qui est sans doute artificielle, étant donné qu'elle intervient trop rapidement par rapport à ce qui est attendu pour la mise en place d'une réponse cellulaire spécifique, et qu'elle ne se vérifie pas aux temps ultérieurs. On n'observe pas de différence significative entre les singes infectés par LASV AV et ceux infectés par LASV Josiah pour l'expression des marqueurs d'activation CD40L et CD137 à la surface des LT.

A travers les cytokines ciblées, on s'intéresse ici à la réponse des lymphocytes Th1, un sous-type de LT CD4+ qui sécrète des cytokines (IFN $\gamma$ , IL-2) visant à activer les macrophages, les cellules NK et les LT CD8+, après avoir reconnu l'antigène spécifique de leur récepteur. Pour évaluer de manière exhaustive la réponse Th1, nous avons cherché à établir des résultats équivalents avec l'IL-2, malheureusement nous n'avons trouvé aucun anticorps apportant des résultats satisfaisants pour ce marqueur, nous avons donc dû nous contenter des données sur l'IFN $\gamma$ . En conclusion, on peut affirmer qu'une présentation antigénique efficiente aboutissant à une activation spécifique des LT contre les protéines virales participe à l'issue favorable des macaques infectés par LASV.



**Figure 38. Activation d'une réponse T spécifique dans les PBMC lors de l'infection non létale par LASV.** Des PBMC de singes cynomolgus ont été stimulées pendant 6 heures en présence de brefeldine A et d'anticorps de costimulation (CD28 et CD49d), par des mélanges peptidiques reconstituant les NP et GPC de LASV. La réponse cellulaire des LT a ensuite été quantifiée en mesurant l'induction de la sécrétion d'IFN $\gamma$  et la présence de marqueurs d'activation membranaires (CD40L pour les LT CD4+ et CD137 pour les LT CD8+) par cytométrie en flux. Le temps 0 jpi correspond à un prélèvement sanguin réalisé le jour de l'injection du virus mais antérieur à celle-ci, il constitue donc un contrôle interne et montre le niveau basal d'expression des marqueurs. Les diagrammes circulaires (cerclés en bleu pour LASV AV et en rouge pour LASV Josiah) montrent les proportions relatives des réponses induites par la NP et par la GPC, lorsque la moyenne d'expression du marqueur dépasse un seuil défini pour la condition observée. Les conditions LASV AV et Josiah ont été comparées grâce à un test t de Student non apparié, avec une correction de Welch lorsque nécessaire. Les évolutions temporelles des conditions AV et Josiah ont été comparées indépendamment par analyse à effets mixtes. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ .

### 2.B.ii. Mise en évidence d'une réponse T spécifique tardive dans les OLS

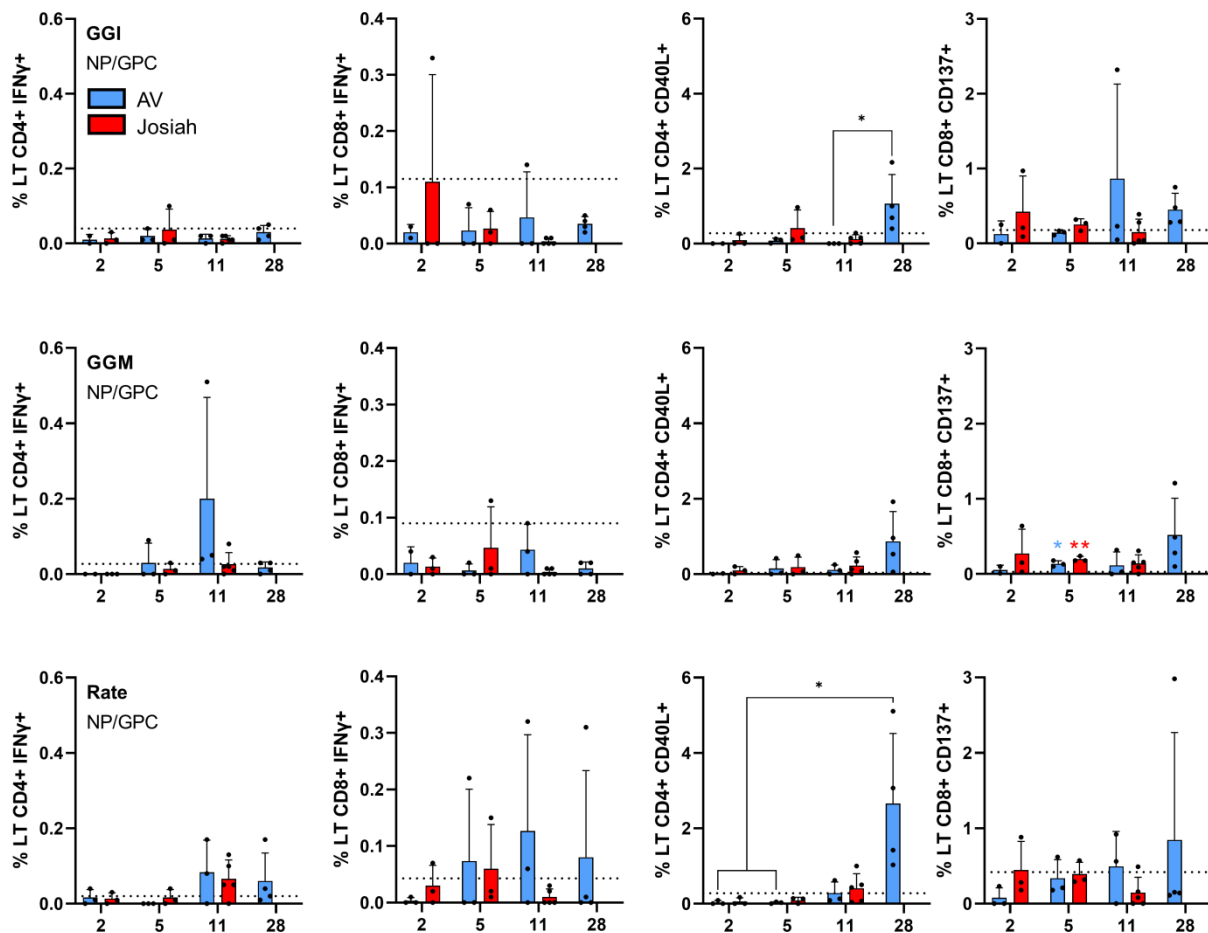
On sait grâce aux résultats obtenus dans le premier axe de cette thèse que dans le cas de l'infection non létale, l'infection par LASV reste majoritairement cantonnée aux OLS, et on a fait l'hypothèse que le contrôle de l'infection dépend de phénomènes immunitaires localisés dans ces organes. Nous avons donc réalisé les mêmes expériences de cytométrie en utilisant comme matériel biologique le mélange de cellules issu des broyats des OLS, à savoir les GGI, les GGM et la rate. L'objectif était de vérifier la mise en place *in situ* de la réponse Th1 et l'activation spécifique des LT en général, dans les compartiments où la présentation antigénique a lieu.

Dans la **Figure 39**, on remarque une absence de réponse spécifique des LT CD4+ et CD8+ associée à l'induction de la sécrétion d'IFN $\gamma$  dans les trois OLS d'intérêt. En effet, aucune condition ne montre une variation significative par rapport au niveau basal d'expression de l'IFN $\gamma$  dans ces organes mesuré dans le groupe contrôle non infecté. Ces résultats ne nous permettent cependant pas de conclure de manière définitive sur l'absence de mise en place de la réponse Th1 dans les OLS, puisqu'on peut imaginer qu'une telle population de LT s'y différencierait et serait immédiatement adressée vers d'autres compartiments (sang ou organes non lymphoïdes). Cette hypothèse pourrait expliquer que ces LT spécialisés ne s'accumulent pas dans les OLS et soient ainsi indétectables avec notre schéma expérimental.

En revanche, on observe une activation spécifique des LT CD4+ dans les GGI et la rate, mais cette maturité des LT pour les antigènes de LASV n'intervient que tardivement et bien après la période critique des symptômes. L'absence de point intermédiaire entre 11 jpi et 28 jpi ne nous permet pas de déterminer précisément quand cette réponse cellulaire devient effective, mais on ne peut pas l'associer à la survie avec ces seuls résultats, étant donné qu'on ne la détecte pas chez les survivants au moment de la mort des singes infectés par Josiah. On observe une hausse statistiquement significative de l'expression de CD137 à la surface des LT CD8+ des GGM à 5 jpi dans les deux conditions d'infection, cependant cette augmentation est qualitativement très faible et probablement artefactuelle étant donné la précocité du phénomène.

En somme, les résultats obtenus dans les OLS ne nous ont pas permis d'identifier une réponse cellulaire précoce des LT pouvant être mise en relation avec la survie des animaux. Il reste pourtant possible qu'une telle réponse existe et que les cellules activées quittent les OLS pour se retrouver dans le sang ou d'autres organes périphériques impactés par l'infection. Cela pourrait être l'origine des LT CD4+ et CD8+ activés par les protéines virales et sécrétant de l'IFN $\gamma$  que nous avons identifiés dans les PBMC.





**Figure 39. Dynamique de la réponse T spécifique dans les OLS lors de l'infection par LASV.** Des cellules issues de broyats d'OLS (de haut en bas : GGI, GGM et rate) de singes cynomolgus ont été stimulées pendant 6 heures en présence de bréfeldine A et d'anticorps de costimulation (CD28 et CD49d), par des mélanges peptidiques reconstituant les NP et GPC de LASV. La réponse cellulaire des LT a ensuite été quantifiée en mesurant l'induction de la sécrétion d'IFN $\gamma$  et la présence de marqueurs d'activation membranaires (CD40L pour les LT CD4+ et CD137 pour les LT CD8+) par cytométrie en flux. Les lignes noires en pointillés représentent les valeurs moyennes de chaque marqueur mesurées chez les singes Mock (n=3). A chaque point de temps, les conditions LASV AV, Josiah et Mock ont été comparées par ANOVA suivi d'une comparaison multiple de Tukey, et les différences significatives entre les conditions d'infection et la condition contrôle sont représentées par des astérisques colorées (bleu pour AV et rouge pour Josiah). Les évolutions temporelles des conditions LASV AV et Josiah ont été comparées indépendamment grâce à un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ .

Nous allons maintenant essayer de quantifier la maturation des LB<sub>mém</sub> au cours de l'infection pour mieux caractériser leur rôle dans la réponse globale de l'hôte.

### 2.C. Mise en place d'une réponse mémoire des LB et d'une différenciation en plasmocytes

Nous avons cherché à évaluer la dynamique de mise en place de la réponse humorale et mémoire des LB dans les PBMC et les OLS, pour compléter le tableau de

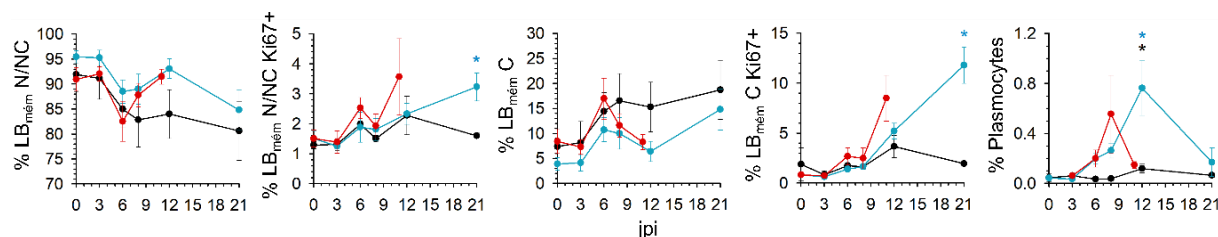
la réponse immune. Ces expériences ont fait l'objet d'expérimentations complémentaires pour un article, publié depuis dans *Communications Biology* <sup>198</sup>. Nous avons utilisé différents marqueurs phénotypiques pour caractériser les populations de LB<sub>mém</sub> (cf. **Tableau 3**) ainsi que les plasmocytes, qui sont des LB hautement différenciés et spécialisés dans la sécrétion d'anticorps.

**Tableau 3.** Marqueurs d'indentification des différentes catégories de LB<sub>mém</sub> par cytométrie.

Types de LB <sub>mém</sub> /marqueurs	CD20	CD38	CD27	CD10
Naïfs/Non Conventionnels	+	moyen	-	-
Transitoires	+	moyen	-	+
Conventionnels	+	moyen	+	-
Plasmocytes	faible	fort	+	

### 2.C.i. Evolution des populations de LB<sub>mém</sub> dans les PBMC au cours de l'infection

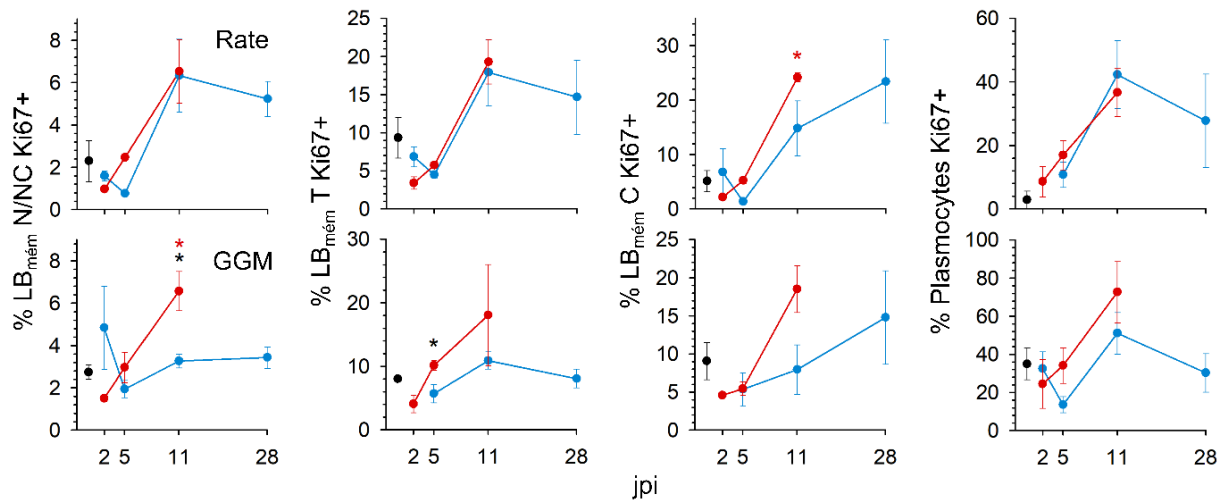
Dans les PBMC, on note une augmentation significative de la prolifération des LB<sub>mém</sub> naïfs mais surtout des conventionnels chez les singes survivants, qui intervient tardivement (21 jpi) lors de la convalescence des animaux (cf. **Figure 40**). On assiste aussi à une augmentation transitoire du pourcentage de plasmocytes chez les singes infectés, qui est plus précoce lors de l'infection par LASV Josiah (8 jpi), relativement à celle par LASV AV qui est significativement plus élevée au pic de la phase aiguë (12 jpi).



**Figure 40.** Dynamique de différenciation des LB<sub>mém</sub> et des plasmocytes dans les PBMC lors de la FL. Des PBMC de singes Mock (courbe noire) ou infectés par LASV AV (courbe bleue) ou LASV Josiah (courbe rouge) ont été marquées (voir marqueurs dans le Tableau 2) et analysées par cytométrie en flux. Les proportions des populations de LB<sub>mém</sub> naïfs/non conventionnels (N/NC), conventionnels (C) et de plasmocytes ont été quantifiées au sein de la population des cellules CD20+, ainsi que la proportion des LB<sub>mém</sub> N/NC et C prolifératifs (Ki67+). A chaque point de temps, les conditions LASV AV, Josiah et Mock ont été comparées par ANOVA suivie d'une comparaison multiple de Tukey, et les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par des astérisques colorées (AV ou Josiah vs Mock) ou noires (AV vs Josiah). \* : p < 0,05.

### 2.C.ii. Evolution des populations de $LB_{mém}$ dans les OLS au cours de l'infection

On assiste à une induction forte et généralisée de la prolifération des  $LB_{mém}$  et des plasmocytes dans la rate lors de l'infection par LASV, avec en moyenne un facteur 3 d'augmentation des pourcentages de cellules Ki67+ dans les sous-populations observées à 11 jpi (cf. **Figure 41**). Si la dynamique entre les deux souches virales semble très similaire dans la rate, elle apparaît comme plus précoce chez les singes décédés dans les GGM. On ne détecte par ailleurs pas d'augmentation des signaux de prolifération chez les  $LB_{mém}$  naïfs, transitoires et chez les plasmocytes des singes survivants.



**Figure 41. Prolifération des  $LB_{mém}$  et des plasmocytes dans les OLS lors de la FL.** Des cellules de Rate et de GGM de singes Mock (courbe noire) ou infectés par LASV AV (courbe bleue) ou LASV Josiah (courbe rouge) ont été marquées (voir marqueurs dans le Tableau 2) et analysées par cytométrie en flux. Les proportions de  $LB_{mém}$  naïfs/non conventionnels (N/NC), transitoires (T), conventionnels (C) et de plasmocytes en prolifération (Ki67+) ont été quantifiées au sein de ces populations respectives. A chaque point de temps, les conditions LASV AV, Josiah et Mock ont été comparées par ANOVA suivie d'une comparaison multiple de Tukey, et les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par des astérisques colorées (AV ou Josiah vs Mock) ou noires (AV vs Josiah). \* :  $p < 0,05$ .

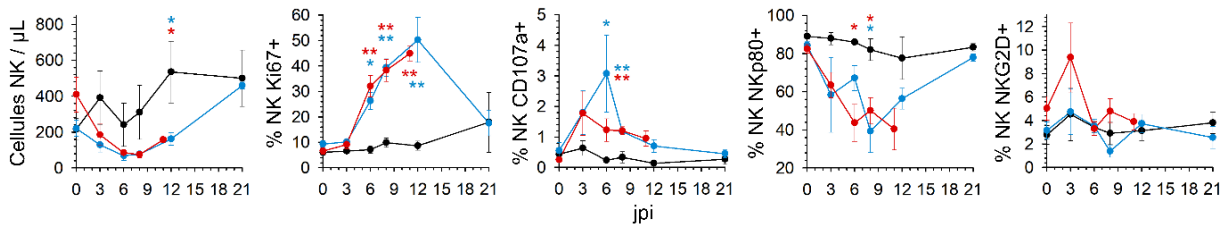
On sait d'ores et déjà que les anticorps produits lors de l'infection par LASV (létale ou non) ne possèdent qu'une activité neutralisante très limitée, et que leur présence, même précoce, ne corrèle pas avec la survie des individus. Reste à déterminer si ces anticorps pourraient présenter d'autres propriétés leur permettant de participer à la protection ou à la pathologie, comme l'ADCC (*Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity*) ou l'ADCP (*Antibody-Dependent Cell Phagocytosis*).

## 2.D. Rôle et activation des cellules NK au cours de l'infection par LASV

Pour compléter la vue d'ensemble de l'activité du système lymphoïde, nous avons voulu caractériser le rôle des cellules NK lors de la FL, dans les PBMC et les OLS à nouveau.

### 2.D.i. Le comportement des cellules NK dans les PBMC lors de l'infection par LASV

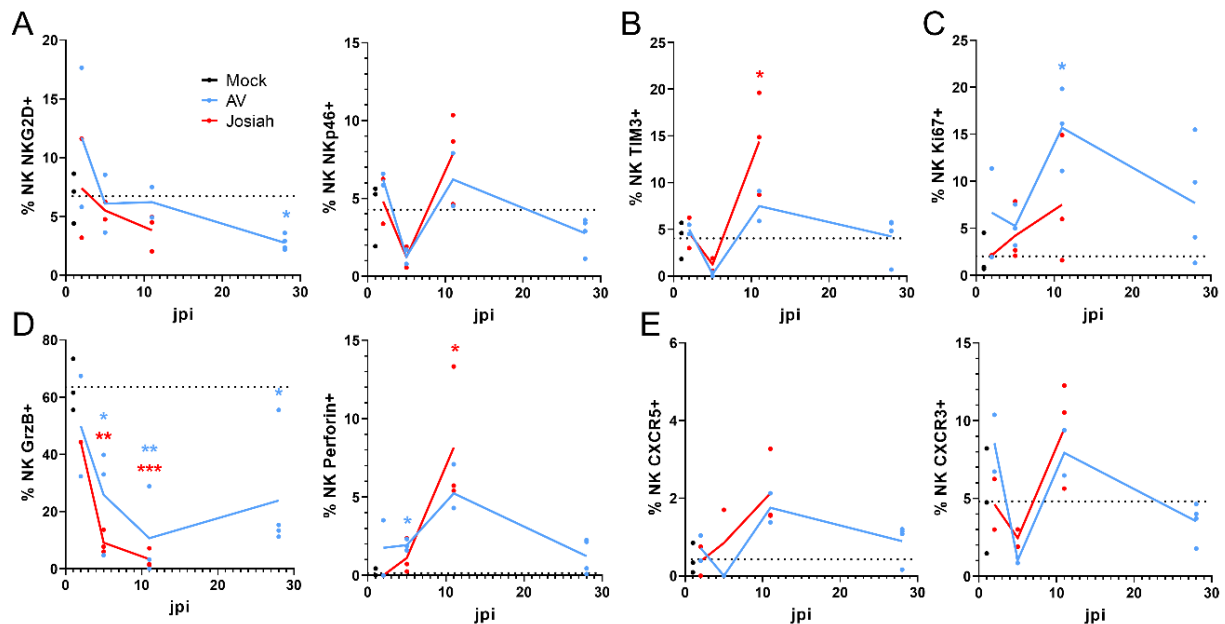
On observe que les cellules NK subissent la lymphopénie au même titre que les autres populations lymphocytaires, et que celle-ci dure assez tardivement puisqu'à 12 jpi les NK n'ont pas restauré leur niveau basal (cf. **Figure 42**). En revanche, les signaux de prolifération sont très rapidement induits dans la population des NK (dès 6 jpi) et continuent d'augmenter jusqu'à atteindre environ 50% des NK au pic des symptômes de la FL (12 jpi), et ce quelle que soit l'issue de l'infection. On assiste parallèlement à une hausse de la dégranulation qui intervient dès 3 jpi et atteint son maximum chez les singes survivants à 6 jpi, malgré l'invariabilité du marqueur d'activation NKG2D. La proportion de cellules NK matures diminue fortement de manière concomitante à la lymphopénie, les cellules nouvellement produites étant immatures. La maturité des NK est restaurée chez les survivants lors de la phase convalescente.



**Figure 42. Prolifération et cytotoxicité des NK dans les PBMC lors de l'infection par LASV.** Des PBMC de singes Mock (courbe noire) ou infectés par LASV AV (courbe bleue) ou LASV Josiah (courbe rouge) ont été marquées et traitées par cytométrie en flux. Sont représentés, de gauche à droite, le nombre absolu de cellules NK par  $\mu$ L de sang, ainsi que les pourcentages de ces NK étant prolifératifs (Ki67+), en dégranulation (CD107a+), matures (NKp80+) et activés (NKG2D+). A chaque point de temps, les conditions LASV AV, Josiah et Mock ont été comparées par ANOVA suivie d'une comparaison multiple de Tukey, et les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par des astérisques colorées (AV ou Josiah vs Mock) ou noires (AV vs Josiah). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ .

Nous avons également évalué l'activité des cellules NK après décongélation et remise en culture pendant 3 jours d'un mélange de PBMC, l'objectif étant de laisser le temps aux populations en prolifération de se développer et d'éventuellement interagir avec d'autres types cellulaires potentialisants (cf. **Figure 43**). On n'observe pas de variation des marqueurs d'activation au cours de l'infection, mais la prolifération des

cellules NK augmente sensiblement à 11 jpi chez les survivants. De manière très intéressante, on détecte l'apparition de facteurs d'épuisement à la surface des NK des singes décédés au pic de la phase aiguë (TIM-3). Dès 5 jpi, on identifie une forte dégranulation du granzyme B, exprimé de manière basale dans plus de 60% des NK et sécrété dans le plasma. L'activité cytotoxique des NK est confirmée par l'augmentation de l'expression de la perforine à 11 jpi. On semble détecter une légère augmentation de l'adressage des NK vers les zones folliculaires des OLS (CXCR5).

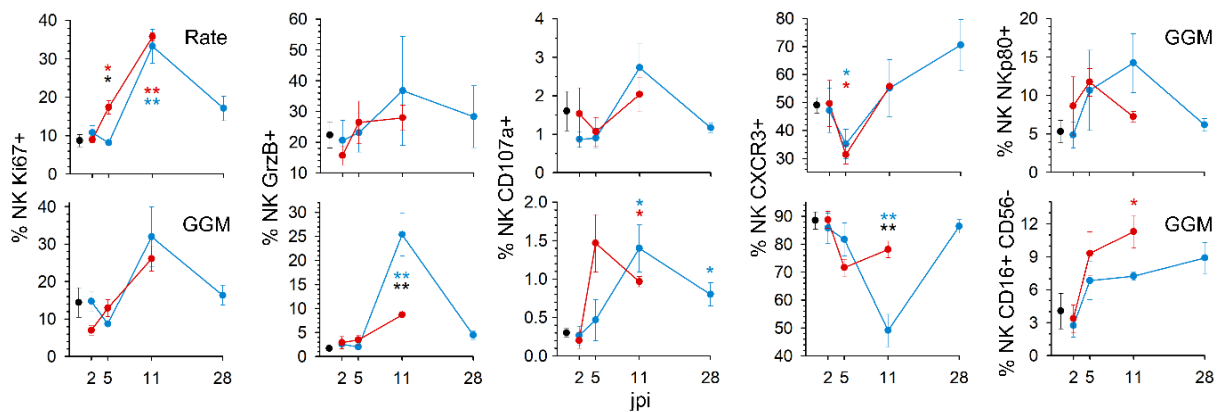


**Figure 43. Epuisement et cytotoxicité des NK dans les PBMC lors de l'infection par LASV.** Des PBMC de singes Mock (ligne pointillée noire) ou infectés par LASV AV (courbe bleue) ou LASV Josiah (courbe rouge) ont été décongelés puis remis en culture pour une durée de 3 jours, puis marquées et traitées par cytométrie en flux. Sont représentés les proportions des cellules NK activées (A), épuisées (B), prolifératives (C), cytotoxiques (D) ainsi que leurs marqueurs d'adressage tissulaire (E). A chaque point de temps, les conditions LASV AV, Josiah et Mock ont été comparées par ANOVA suivie d'une comparaison multiple de Tukey, et les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par des astérisques colorées (AV ou Josiah vs Mock) ou noires (AV vs Josiah). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ .

### 2.D.ii. *Activité des cellules NK dans les OLS lors de l'infection par LASV*

La prolifération des NK est également fortement induite dans les OLS à 11 jpi, et ce dès 5 jpi dans la rate des singes infectés par LASV Josiah uniquement (cf. **Figure 44**). Le potentiel cytotoxique des NK augmente très fortement à 11 jpi dans les GGM des singes survivants, et cela s'accompagne d'une sensible augmentation de la dégranulation dans ce même compartiment chez tous les singes infectés. On note également une forte baisse de l'expression de CXCR3 à la surface des NK des singes

infectés par LASV, de manière transitoire dans la rate à 5 jpi, et de manière beaucoup plus marquée dans les GGM des singes survivants à 11 jpi. On détecte une forte augmentation de la proportion de cellules NK CD16+/CD56- chez les singes décédés, ce phénotype étant connu pour être dysfonctionnel <sup>284,285</sup>.



**Figure 44. Prolifération et cytotoxicité des NK dans les OLS lors de l'infection par LASV.** Des cellules de rate et de GGM de singes Mock (valeur en noir) ou infectés par AV (courbe bleue) ou Josiah (courbe rouge) ont été marquées et traitées par cytométrie en flux. Sont représentés, de gauche à droite, les proportions des cellules NK prolifératives (Ki67+), cytotoxiques (GrzB+), en dégranulation (CD107a+), adressées vers les zones T (CXCR3+), matures (NKp80+) et dysfonctionnelles (CD16+/CD56-). A chaque point de temps, les conditions AV, Josiah et Mock ont été comparées par ANOVA suivie d'une comparaison multiple de Tukey, et les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par des astérisques colorées (AV ou Josiah vs Mock) ou noires (AV vs Josiah). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ .

Bien que peu de différences majeures apparaissent au sein des populations de NK entre les singes infectés par LASV AV et ceux infectés par LASV Josiah, la détection de cellules épuisées ou dysfonctionnelles chez les singes décédés peut laisser imaginer une contribution des NK aux processus impliqués dans la survie. Des hypothèses à ce propos seront avancées dans le chapitre consacré à la discussion.

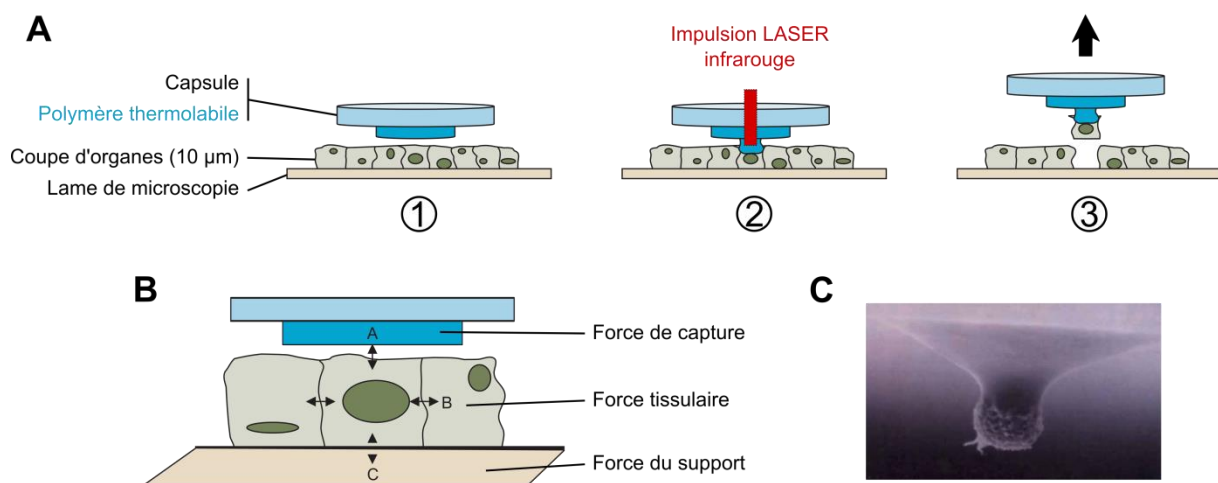
## 2.E. Analyse comparative du transcriptome de la zone marginale splénique prélevé *in situ* par microdissection par capture laser

Si nous disposions des transcriptomes de broyats d'organes totaux des ganglions et de la rate réalisés lors de l'étude précédente, il nous est apparu que leur interprétation ne pouvait être complète, étant donné que les transcrits avaient été obtenus à partir d'un mélange cellulaire très vaste et hétérogène. En effet, si certains organes comme le foie ou le rein présentent une morphologie homogène et ne sont peu ou pas polarisés, ce n'est pas le cas des OLS qui sont hautement structurés et possèdent une spatialisation fonctionnelle, avec la présence de follicules. Dans la rate notamment, on distingue habituellement pulpe rouge et pulpe blanche, qui ont des rôles biologiques différents. La pulpe rouge correspond à un enchevêtrement de sinusoides spléniques où

gravitent globules rouges, plaquettes, monocytes et granulocytes, et où a lieu la filtration et la suppression des globules rouges âgés. Cette zone agit également comme un réservoir de monocytes. La pulpe blanche constitue quant à elle la zone lymphoïde de la rate, elle est structurée en trois zones : la zone T, la zone B et la zone marginale splénique (ZMS), qui centralise les CPA (macrophages/monocytes et DC) et constitue la frontière avec la pulpe rouge. Cette zonation cellulaire et fonctionnelle rend moins pertinente l'analyse du transcriptome de l'organe dans son ensemble, car les variations de transcrits peuvent être opposées d'une région à l'autre, s'équilibrer et ainsi gommer des différences biologiques bien réelles. C'est pourquoi nous avons souhaité employer une technique nous permettant de sélectionner finement les zones prélevées pour en analyser le transcriptome.

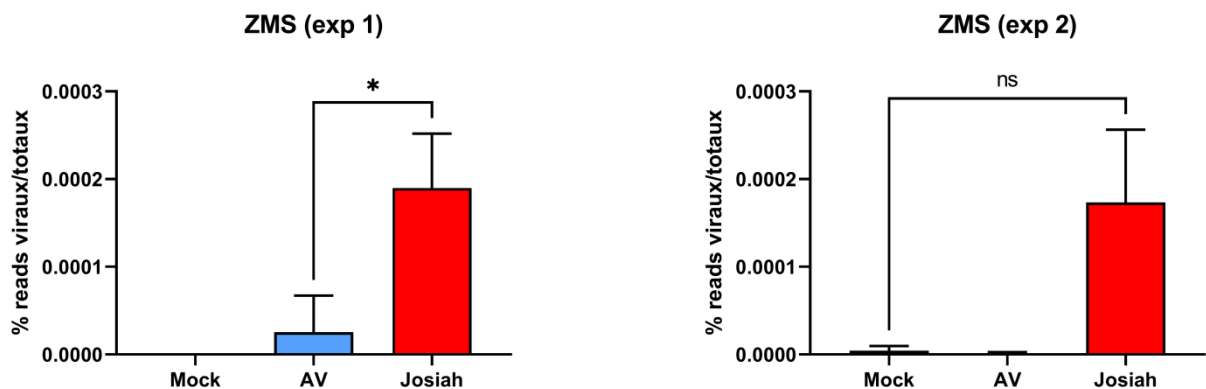
### 2.E.i. Présentation et test de la technique de microdissection par capture laser

Nous nous sommes tournés vers la microdissection par capture laser (MCL) qui permet de sélectionner des zones très précises sur une lame mince d'organe et de les prélever spécifiquement, pour ensuite en séquencer les ARN et en construire le transcriptome (cf. **Figure 45**). Cette technique est très fine et sensible, et elle peut notamment permettre de faire de la transcriptomique sur cellule unique, lorsque que la qualité de l'échantillon le permet. Bien que nous ayons initialement considéré cette possibilité, il est rapidement apparu que les conditions de fixation exigeantes appliquées à nos échantillons affectaient trop la qualité des ARN pour faire une analyse comparative sur cellules uniques. Nous avons donc décidé de prélever plusieurs cellules au sein d'une même zone fonctionnelle dans différents organes, à commencer par la ZMS de la rate, où se réalise la présentation antigénique lors d'une infection.



**Figure 45. Technique de microdissection par capture laser.** A. Description des étapes majeures du protocole de MCL, avec le rapprochement physique de la capsule au-dessus du tissu d'intérêt (1), la déformation du polymère thermolabile par l'impulsion laser et la liaison consécutive à la cellule d'intérêt (2) et la capture de la cellule d'intérêt induite par le mouvement vertical de la capsule (3). B. Inventaire des forces à l'œuvre lors de la MCL. C. Image du polymère thermolabile localement déformé après impulsion laser et de la cellule qui y est liée par la force de capture. Adapté d'Espina et al. <sup>286</sup>

Après microdissection des ZMS des singes contrôles, survivants et décédés (à 11 jpi), les ARN contenus dans les échantillons obtenus ont été extraits puis séquencés par *Next-Generation Sequencing* (NGS). L'expérience complète a été réalisée deux fois indépendamment, et les reads viraux ont été quantifiés dans les différents échantillons, pour validation des résultats obtenus (cf. **Figure 46**). On note que dans chacune des expériences, le pourcentage de reads viraux est sensiblement plus élevé chez les singes décédés que chez les singes survivants et les Mock, ce qui était attendu. De plus, les pourcentages de reads viraux chez les singes décédés est très comparable d'une expérience à l'autre, ce qui est rassurant quant à la qualité des résultats obtenus. Il convient toutefois de signaler qu'une grande proportion des reads totaux (entre 40 et 70%) étaient très dégradés et qu'aucune correspondance avec des transcrits de singes cynomolgus ou d'humains n'a pu leur être trouvée. Cet état de forte dégradation est sans nul doute causé par les méthodes d'inactivation du laboratoire P4 Jean Mérieux, où les échantillons ont été pris en charge, et qui impose une mise en contact prolongée (14 jours) des organes avec de la formaline 10% pour garantir leur inactivation complète. Nous nous sommes donc affranchis pour l'analyse du transcriptome de tous les transcrits sans correspondance et avons travaillé avec les 30-60% restants. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 47**.

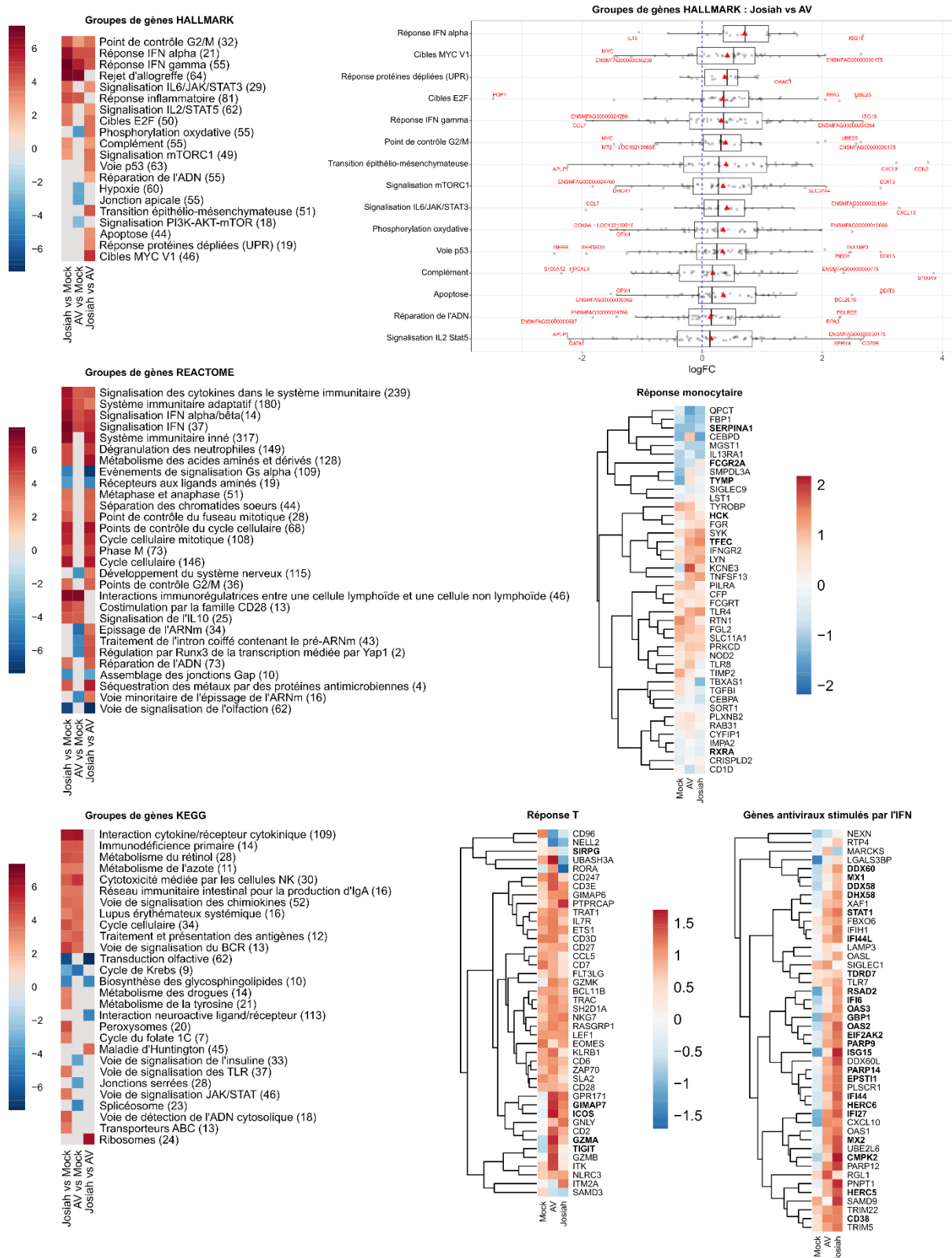


**Figure 46.** Pourcentage de reads viraux dans les transcriptomes obtenus dans la ZMS à 11 jpi. Les reads séquencés dans les transcriptomes des ZMS des singes Mock, infectés par LASV AV ou Josiah (n=3 pour chaque groupe) ont été comparés aux génomes viraux des deux souches de LASV. Les graphiques représentent le pourcentage des reads totaux ayant été identifiés comme des reads viraux dans chaque condition. Chacun d'entre eux correspond à une expérience de MCL indépendante réalisée dans la ZMS.

### *2.E.ii. Analyse transcriptomique différentielle des ZMS lors de la phase aiguë de la FL*

Les analyses par ontologies permettent de mettre en lumière de nombreux processus dont l'activité est augmentée lors de l'infection létale ou non létale par LASV (cf. **Figure 47**, à gauche). Ces ontologies se regroupent majoritairement dans les grandes familles suivantes :





**Figure 47. Analyse comparative des transcriptomes de la ZMS à 11 jpi.** Des cellules présentes dans les ZMS de singes contrôles, infectés par LASV AV ou Josiah (n=3 pour chaque groupe) ont été prélevées par MCL et leurs transcriptomes ont été construits. Une analyse différentielle des transcriptomes obtenus dans les différents groupes a ensuite été réalisée. A gauche, les heatmaps représentent les résultats des analyses ontologiques dans les bases HALLMARK, REACTOME et KEGG. Les ontologies impactées dans au moins une des conditions y figurent, avec le nombre de gènes

différentiellement exprimés qui s'y rapportent (nombres entre parenthèses). Les boxplots en haut à droite montrent les différences d'expression des gènes individuels des ontologies de la base HALLMARK, ainsi que leur moyenne (triangle rouge), observées entre LASV Josiah et AV.  $\logFC = \log(\text{Fold Change})$ , où le *Fold Change* correspond au facteur d'accroissement entre les deux conditions. En bas à droite, les heatmaps montrent l'expression différentielle de groupes de gènes associés à la réponse monocytaire, à la réponse des LT ou à la réponse antivirale induite par l'IFN. Les gènes en gras présentent une différence statistiquement significative d'expression pour au moins une des conditions, et identifiée par ANOVA.

- **Réponse immunitaire innée :**
  - Réponse IFN $\alpha/\beta$
  - Réponse IFN $\gamma$
  - Cytotoxicité des NK
- **Réponse immunitaire adaptative :**
  - Présentation antigénique
  - Réponse IFN $\gamma$
  - Réponse B
  - Réponse T
  - Réponse inflammatoire
  - Complément
  - Signalisation des cytokines
  - Immunorégulation
- **Régulation du cycle cellulaire :**
  - Points de contrôles
  - Mitose
- **Induction de la mort cellulaire :**
  - Voie p53
  - Apoptose
  - Réponse UPR
- **Contrôle de la synthèse protéique :**
  - Métabolisme des acides aminés
  - Activité des ribosomes

La très grande majorité des voies activées présentent un niveau d'activation plus fort pour LASV Josiah que pour LASV AV, comme on peut notamment le voir sur les boxplots (cf. **Figure 47**, en haut à droite). C'est notamment le cas des réponses IFN de type I et de type II, ainsi que pour la signalisation médiée par les cytokines (IL-2, IL-6, IL-10), mais pas pour l'activité cytotoxique des NK, qui est plus forte chez AV. On note d'ailleurs une expression plus forte des gènes codants pour les granzymes A et B chez les survivants que chez les décédés (cf. **Figure 47**, heatmap réponse T). La réponse antivirale stimulée par l'IFN apparaît généralement plus intense lors de l'infection létale. Soulignons aussi que de nombreuses voies impliquées dans le cycle cellulaire, la mitose, et l'apoptose sont spécifiquement activées avec LASV Josiah et pas avec LASV AV. Cela semble indiquer une prolifération des cellules immunitaires

plus active lors de l'infection par Josiah, ainsi que des mécanismes d'immunosuppression. Une dizaine de gènes associés à la réponse T apparaissent plus uprégulés chez les survivants que chez les décédés, mais la grande majorité des gènes ne présente pas de différences. En revanche, nous avons identifié plusieurs gènes d'intérêt n'appartenant pas aux groupes de gènes présentés sur la **Figure 47** et qui sont différentiellement exprimés (DE) entre LASV Josiah et AV. C'est le cas du gène S100A9, que certains décrivent comme un marqueur de MDSC, actrices majeures de l'immunosuppression, et qui est très fortement surexprimé dans la ZMS chez les singes décédés en comparaison aux singes survivants ( $\log_2(\text{FC}) = 3,85^*$  ;  $p < 0,05$ ). A l'inverse, le gène CD5L, qui est impliqué dans la régulation de l'activité pro-inflammatoire des lymphocytes Th17, est sous-exprimé chez les singes décédés par rapport aux singes survivants ( $\log_2(\text{FC}) = -3,18^*$  ;  $p < 0,05$ ). C'est également le cas du gène TRBV10-3, qui code pour une région du domaine variable du TCR et qui participe à la reconnaissance antigénique spécifique, dont l'expression est fortement sous-régulée chez les singes infectés par Josiah ( $\log_2(\text{FC}) = -16,47^*$  ;  $p < 0,05$ ). Cela peut indiquer une dysfonction de la présentation antigénique et par conséquent de la maturation des LT spécifiques dans la ZMS des singes décédés.

En conclusion, la pertinence des résultats obtenus grâce à l'analyse différentielle du transcriptome nous a incités à valider avec un bon degré de confiance la recevabilité de la méthodologie employée pour isoler les transcrits à partir d'un matériel biologique non optimal. Et ce malgré la fraction importante de transcrits non identifiés après le séquençage. A notre connaissance, c'est la première fois que de la MCL est pratiquée sur des tissus animaux infectés par un virus de classe 4, ayant par conséquent subis des méthodes drastiques d'inactivation.

### 3. Caractérisation de la pathologie induite par LASV dans les organes non lymphoïdes essentiels

Le syndrome de défaillance multiviscérale (SDMV) est souvent une réalité clinique chez les patients périssant de la FL. Au sens médical, ce syndrome est déclaré lorsque qu’au moins deux des symptômes suivants sont observés : insuffisance rénale aiguë (IRA), syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), insuffisance cardiaque (IC) ou insuffisance hépatique aiguë (IHA). Le SDMV intervient le plus souvent à la suite d’un sepsis ayant évolué en choc septique, et le taux de mortalité est compris entre 30 et 100% – augmentant avec le nombre d’organes atteints. On sait qu’au moins trois de ces organes sont au centre de la pathologie causée par LASV, au cours de laquelle on observe des marqueurs forts de dysfonction rénale, hépatique et pulmonaire. Nous avons montré dans la première partie de nos résultats que ces trois organes possèdent un taux d’infection élevé, en particulier dans le cas du foie et du rein. C’est également le cas d’un autre organe moins souvent évoqué dans la littérature mais qui possède une fonction endocrine primordiale pour le maintien de la pression artérielle et pour l’homéostasie en général, les glandes surrénales. Nous avons souhaité caractériser les phénomènes à l’œuvre dans ces quatre organes pour tenter de comprendre les causes de leur dysfonction, qu’elles soient directement liées à l’infection virale ou bien associées à la réponse immunitaire induite de manière systémique. Nous nous sommes à nouveau tournés vers des approches non biaisées pour n’occulter aucun phénomène, c’est pourquoi l’essentiel des résultats présentés dans cet axe découle d’analyses transcriptomiques.

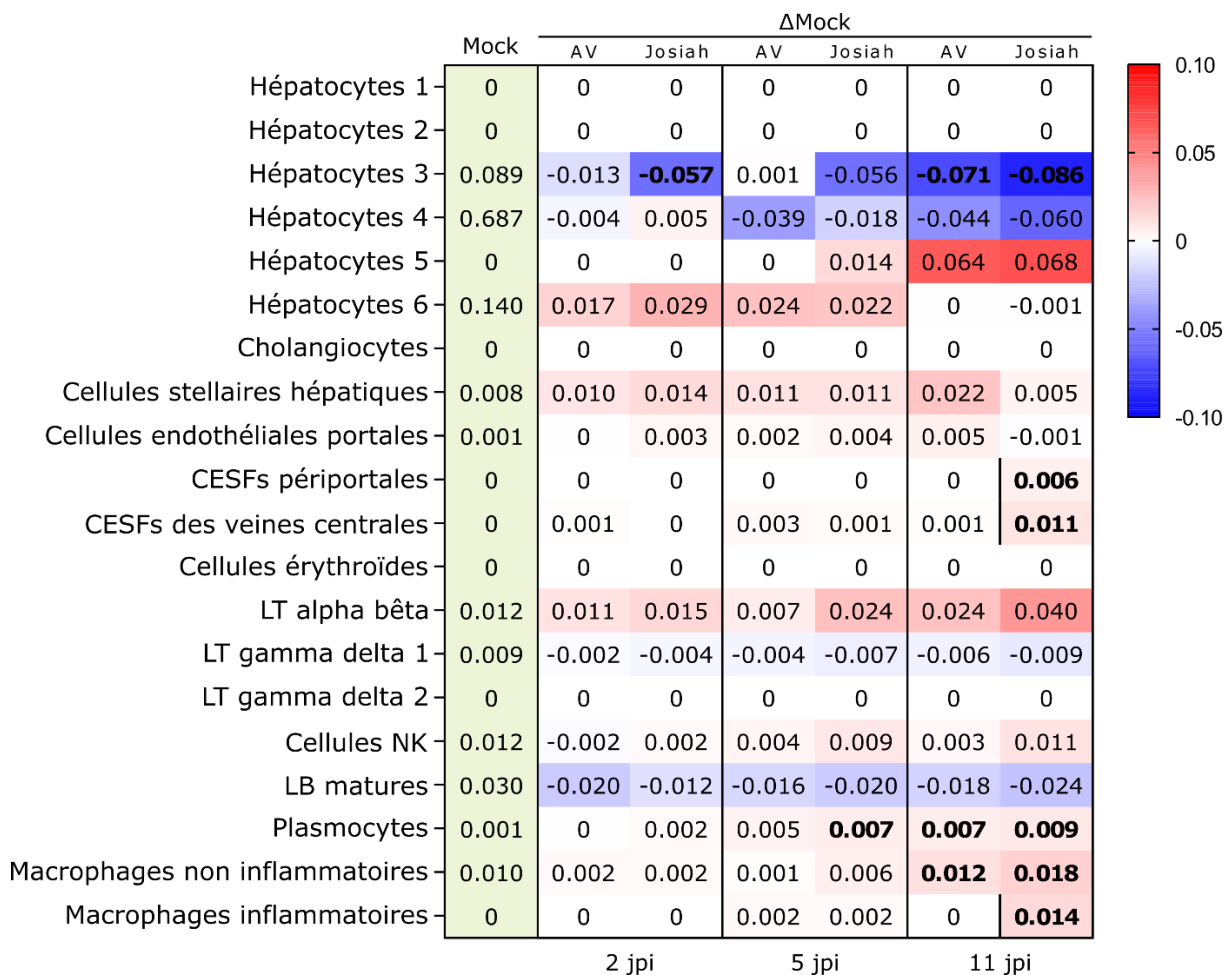
#### 3.A. Identification des changements fonctionnels et caractérisation de l’inflammation dans les organes clés de la pathologie grâce à la déconvolution du transcriptome

En suivant la même approche que celle appliquée dans les OLS dans l’axe précédent, nous sommes parvenus à appliquer la méthode de déconvolution aux transcriptomes obtenus à partir de prélèvement totaux de foie, de rein et de poumon. Nous avons pu constituer des signatures pertinentes pour chacun des organes d’intérêt, à partir d’atlas de transcriptomes sur cellules uniques sélectionnés selon les critères expliqués dans la partie 2.A.i. (exhaustivité des types cellulaires fonctionnels et diversité des types cellulaires immunitaires). Malheureusement, aucun atlas de glandes surrénales humaines n’a encore été rendu public – bien que cela ait été réalisé récemment <sup>287</sup> – ce qui ne nous a pas permis d’appliquer la déconvolution à cet organe.

##### 3.A.i. Evolution de la composition cellulaire hépatique lors de la FL

Pour la déconvolution du transcriptome de foie, nous avons choisi l’atlas proposé par MacParland *et al.* <sup>288</sup> dont les données sont accessibles en ligne <sup>289</sup>. A l’analyse des résultats, on peut voir que les hépatocytes des singes infectés par Josiah opèrent très

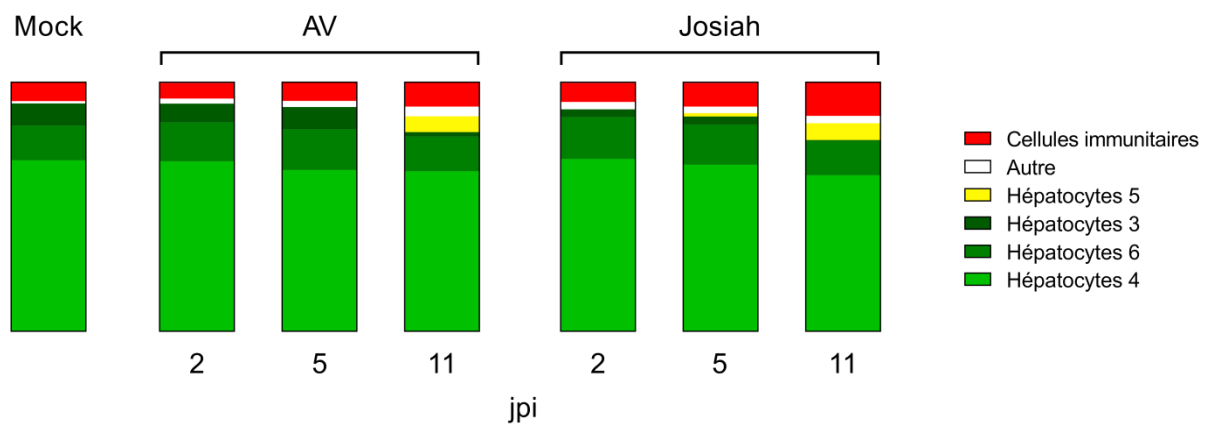
précocement (dès 2 jpi, et jusqu'à 5 jpi) un changement d'état transcriptionnel, du type 3 vers le type 6 (cf. **Figure 48** et **Figure 49**). Les hépatocytes de type 3 disparaissent même complètement à 11 jpi chez les singes décédés, et leur proportion diminue très fortement chez les survivants, tandis que le type 6 retrouve son niveau de base. Le type 4, qui est le type majoritaire au niveau basal, diminue légèrement à partir de la phase d'incubation, avec les deux souches virales, au profit d'un nouveau type d'hépatocytes, le type 5, qui n'existe pas en condition normale et qui est très présent à 11 jpi chez tous les singes infectés. On note aussi une augmentation relative des cellules stellaires hépatiques, de même envergure pour AV et Josiah, sauf à 11 jpi où le niveau basal est restauré chez les singes décédés. Ces cellules sont connues pour proliférer en cas de lésion des hépatocytes, elles contribuent à la fibrinogénèse hépatique en produisant des collagènes fibrillaires. De plus, on observe une hausse significative des proportions de cellules endothéliales sinusoidales (périportales et centrales) chez les singes décédés à 11 jpi, ce qui témoigne d'une induction de l'angiogenèse dans le foie.



**Figure 48. Composition cellulaire du foie au cours de l'infection par LASV.** Les valeurs présentées ont été obtenues par déconvolution du transcriptome de foie total, en utilisant la méthode CIBERSORT et la matrice signature issue d'un atlas de foie <sup>288</sup>. La colonne Mock présente les proportions moyennes de chaque type cellulaire mesurées dans le foie des singes contrôles (n=3). Les autres colonnes montrent la différence entre la valeur moyenne de chaque condition et la valeur moyenne

des singes Mock. L'échelle de couleur montre l'intensité des variations observées entre chaque condition et la condition contrôle, les augmentations en rouge et les diminutions en bleu. Les valeurs apparaissent en gras lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) avec la valeur contrôle a été mise en évidence par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples. Un trait vertical noir sépare les conditions LASV AV et Josiah (au même point de temps) lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) a été établie entre elles par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples. CESFs: cellules endothéliales sinusoidales du foie.

On assiste également à une augmentation de la proportion totale des types cellulaires immunitaires dans le tissu hépatique, elle passe de 7,4% chez les singes contrôles à 9,6% chez les singes survivants et 13,3% chez les décédés à 11 jpi (cf. **Figure 49**). En particulier, on observe une forte infiltration de LT  $\alpha/\beta$  chez tous les singes infectés, leur présence dans le foie double dès 2 jpi, tandis qu'elle continue d'augmenter chez les singes décédés pour presque quintupler à 11 jpi, tandis qu'elle triple chez les survivants (cf. **Figure 48**). La proportion des NK dans le tissu hépatique double également au pic des symptômes chez les singes infectés par Josiah. En parallèle, la présence de LB diminue fortement dans les deux conditions d'infection, et est progressivement remplacée par des populations de plasmocytes qui apparaissent dès 5 jpi et se renforcent à 11 jpi. Enfin, on détecte une infiltration significative de macrophages non inflammatoires chez tous les singes infectés à 11 jpi, et de macrophages inflammatoires uniquement chez les singes décédés.



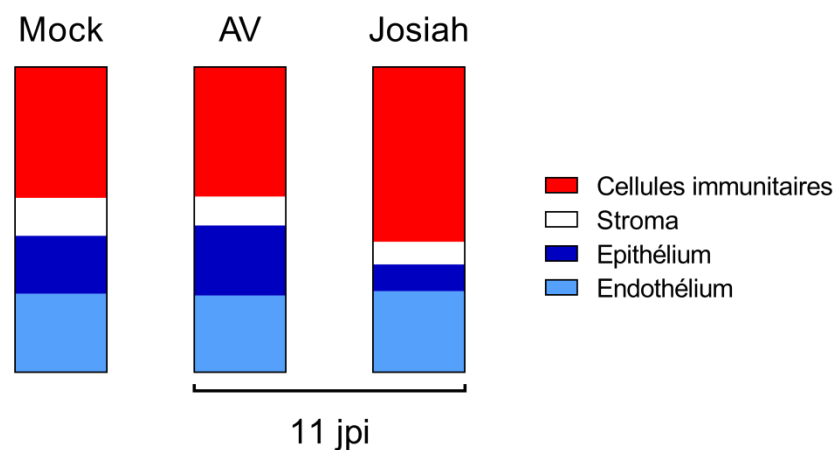
**Figure 49. Proportions relatives des différents types d'hépatocytes et des cellules immunitaires dans le foie.** Les valeurs présentées sont déduites de la Figure 48, et groupées pour représenter la totalité des cellules immunitaires ou les différents types d'hépatocytes identifiés par déconvolution.

### 3.A.ii. Evolution de la composition cellulaire pulmonaire lors de la FL

La déconvolution du transcriptome du poumon a été réalisée à partir de l'atlas publié par Travaglini *et al.*<sup>290</sup> dans le poumon humain. La déconvolution a un intérêt particulier dans le poumon, puisque lors de la FL létale on observe un fort épaissement des parois alvéolaires et qu'on assiste par conséquent à une densification du tissu. Les numérations surfaciques réalisées dans le premier axe de cette thèse sont par conséquent biaisés dans le poumon, et une approche en termes de proportions

relatives de types cellulaires est beaucoup plus pertinente. Malheureusement nous n'avons pas pu obtenir d'ARNm de suffisamment bonne qualité pour établir les transcriptomes des singes à 2 et 5 jpi. Dans les figures suivantes, on ne présente donc que les singes contrôles et les conditions d'infection lors de la phase aiguë.

Si on observe d'abord les variations en termes d'ensembles fonctionnels, on note une franche augmentation de la proportion de cellules immunitaires dans le tissu pulmonaire des singes décédés : de 42,7% chez les singes contrôles à 57,1% (cf. **Figure 50**). On n'observe pas de différences notoires entre les singes contrôles et les singes survivants, pour aucun des ensembles fonctionnels, avec notamment une proportion de cellules immunitaires de 42,3%. Chez les singes décédés, la présence inflammatoire se fait au détriment de l'épithélium, qui diminue fortement lors de la phase aiguë, et qui traduit une diminution forte de la surface dédiée aux échanges gazeux lors de l'infection létale par LASV.



**Figure 50. Proportions relatives des types cellulaires pulmonaires regroupés par ensembles fonctionnels.** Les valeurs présentées sont déduites de la Figure 51 et ont été obtenues par déconvolution du transcriptome pulmonaire.

Dans le détail, on remarque une augmentation de la proportion de capillaires dans les poumons des singes infectés par Josiah, notamment d'aérocytes qui sont des capillaires spécialisés dans les échanges gazeux <sup>291</sup> (cf. **Figure 51**). Cela s'accompagne néanmoins d'une baisse de la proportion en vaisseaux bronchiaux, qui peut possiblement venir d'un biais dans la zone d'échantillonnage. Il y a également une forte diminution des muscles lisses vasculaires dans les deux conditions d'infection, ces cellules étant connues pour réguler l'afflux sanguin dans les poumons et donc l'absorption d'O<sub>2</sub>. Les cellules épithéliales alvéolaires de type 1 (CEAT1), membres de la dyade spécialisée dans les échanges gazeux avec les aérocytes, sont relativement moins présentes chez tous les singes infectés. Les CEAT2 (signalisantes ou non, prises en globalité), qui sécrètent le surfactant et préviennent ainsi le collapsus alvéolaire, sont en net déclin dans les poumons des singes décédés, tandis qu'elles augmentent légèrement dans ceux des singes survivants. On note une légère augmentation de la

	Mock	$\Delta$ Mock	
		AV	Josiah
Aérocytes (capillaires)	0.038	-0.007	<b>0.047</b>
Capillaires	0.054	-0.001	0.023
Capillaires intermédiaires	0.002	0.002	-0.002
Artères	0.092	0.009	-0.013
Péricytes	0	0	0.002
Muscles lisses vasculaires	0.036	-0.018	<b>-0.036</b>
Vaisseaux bronchiaux	0.071	-0.010	-0.046
Cellules épithéliales alvéolaires type 1	0.033	<b>-0.012</b>	<b>-0.013</b>
Cellules épithéliales alvéolaires type 2	0	0	0.007
Cellules épithéliales alvéolaires type 2 signalisantes	0.112	0.026	<b>-0.077</b>
Glandes séromuqueuses	0.001	<b>0.003</b>	-0.001
Cellules ciliées proximales	0.013	0.013	-0.012
Cellules caliciformes	0.002	-0.002	<b>0.005</b>
Cellules basales en différenciation	0.029	0.011	-0.011
Fibroblastes alvéolaires	0.034	-0.001	0.004
Myofibroblastes	0.001	0.006	-0.001
Fibroblastes adventitiels	0.013	0	-0.006
Lipofibroblastes	0.019	0.002	0.003
Fibromyocytes	0.024	-0.016	-0.020
Canaux lymphatiques	0.001	<b>0.001</b>	-0.001
Cellules neuroendocrines pulmonaires	0	0.001	0
LT CD4 naïfs	0	0	0
LT CD4 mémoires effecteurs	0.095	-0.015	<b>0.041</b>
LT CD8 naïfs	0	0.001	0.004
LT CD8 mémoires effecteurs	0	0	0
LB	0.070	-0.001	<b>-0.050</b>
Plasmocytes	0	<b>0.006</b>	0.005
Cellules NK	0.017	0.002	<b>0.028</b>
Cellules NKT proliférantes	0.037	0.009	-0.011
mDCs type 1	0	0.002	<b>0.029</b>
mDCs type 2	0.015	0.004	<b>0.041</b>
pDCs	0	0.001	0.001
IGSF21 DCs	0.032	-0.010	0.004
TREM2 DCs	0.075	-0.024	-0.030
Macrophages	0.002	<b>0.032</b>	0.002
Monocytes classiques	0.003	0.012	0.035
Monocytes intermédiaires	0.043	-0.006	0.001
OLR1 monocytes classiques	0.001	0.005	<b>0.025</b>
Basophiles mastocytes	0.030	-0.015	-0.004
Plaquettes mégakaryocytes	0.007	-0.007	<b>0.023</b>

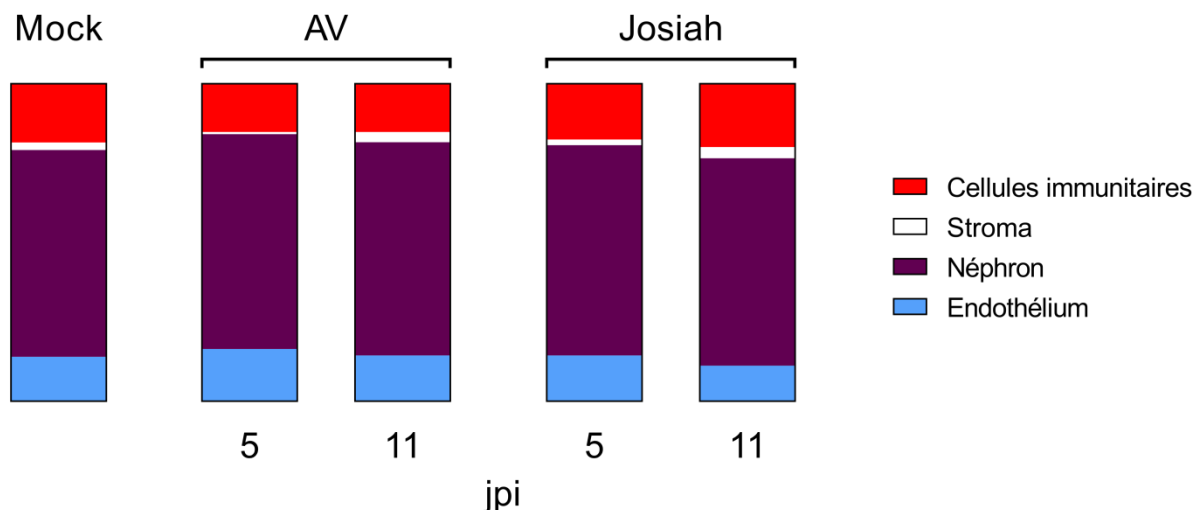
11 jpi



**Figure 51. Composition cellulaire du poumon au cours de l'infection par LASV.** Les valeurs présentées ont été obtenues par déconvolution du transcriptome de poumon total, en utilisant la méthode CIBERSORT et la matrice signature issue d'un atlas pulmonaire<sup>290</sup>. La colonne Mock présente les proportions moyennes de chaque type cellulaire mesurées dans le poumon des singes contrôles (n=3). Les autres colonnes montrent la différence entre la valeur moyenne de chaque condition et la valeur moyenne des singes Mock. L'échelle de couleur montre l'intensité des variations observées entre chaque condition et la condition contrôle, les augmentations en rouge et les diminutions en bleu. Les valeurs apparaissent en gras lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) avec la valeur contrôle a été mise en évidence par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples. Un trait vertical noir sépare les conditions LASV AV et Josiah (au même point de temps) lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) a été établie entre elles par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples. mDC : cellule dendritique myéloïde, pDC : cellule dendritique plasmacytoïde.

proportion des cellules caliciformes, responsables de la sécrétion du mucus, chez les singes mortellement infectés. Quant aux cellules de l'immunité, on note une infiltration significative de  $LT_{\text{mém}} CD4+$  effecteurs, de cellules NK, de mDCs (types 1 et 2), de monocytes classiques et de plaquettes dans les poumons des singes infectés par Josiah. Ces types cellulaires n'augmentent pas chez les singes survivants, où on détecte seulement une hausse significative de la proportion des macrophages et des plasmocytes. A l'inverse, la population de LB décroît fortement dans les poumons des singes infectés par Josiah.

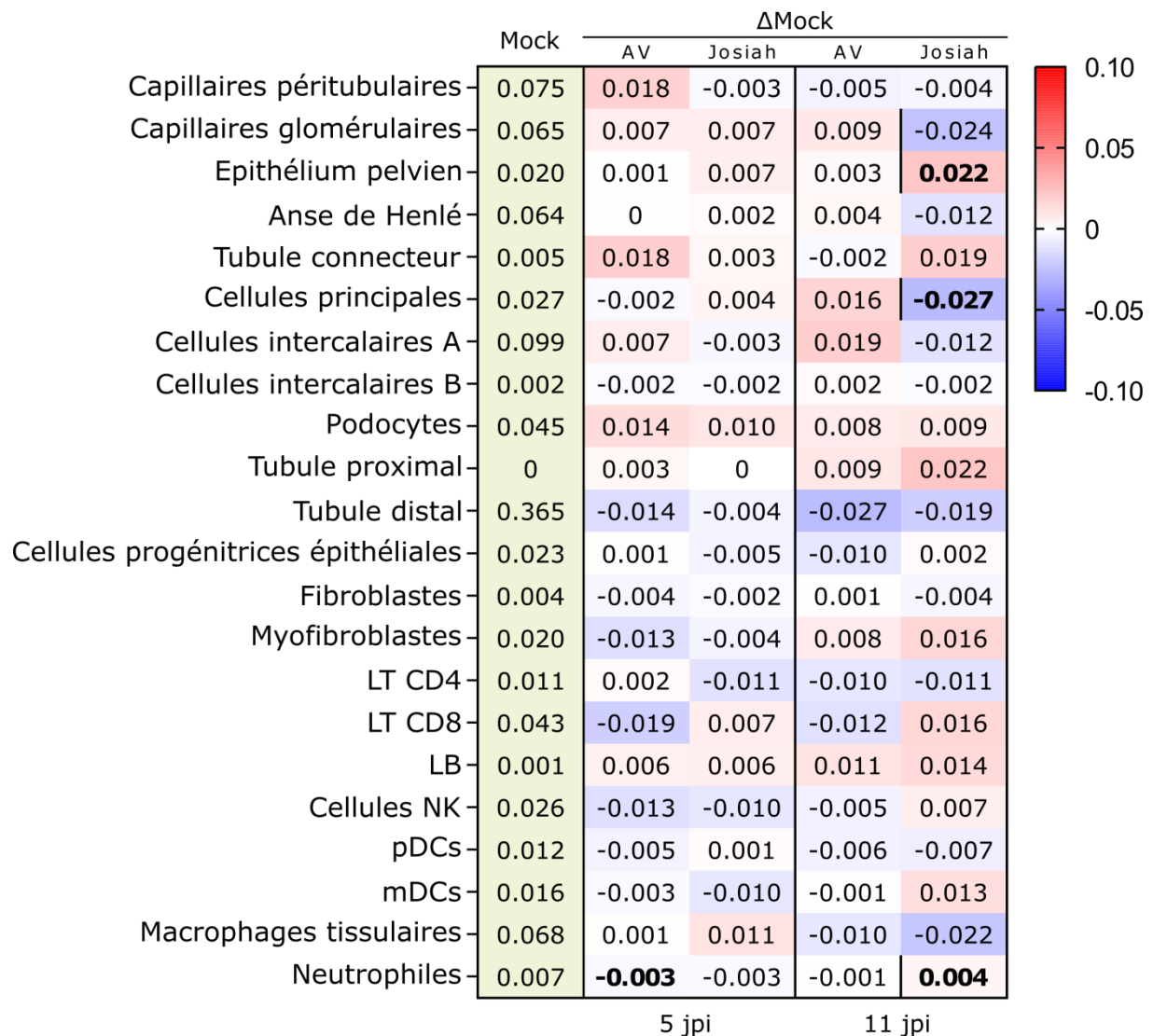
### 3.A.iii. Evolution de la composition cellulaire rénale lors de la FL



**Figure 52. Proportions relatives des types cellulaires rénaux regroupés par ensembles fonctionnels.** Les valeurs présentées sont déduites de la Figure 30 et ont été obtenues par déconvolution du transcriptome rénal.

L'atlas rénal proposé par Stewart *et al.*<sup>292</sup> dont les données brutes sont disponibles en ligne<sup>293</sup> a été utilisé pour la déconvolution du transcriptome du rein. De manière générale, on observe très peu de variations d'abondance des différents ensembles fonctionnels dans le rein (cf. **Figure 52**). Le pourcentage global de cellules appartenant aux néphrons, qui sont les unités fonctionnelles de filtration-réabsorption

du rein, reste particulièrement stable au cours de l'infection quelle que soit son pronostic. La proportion globale de cellules immunitaires dans le rein n'augmente que très légèrement lors de l'infection létale (18,4% chez les singes Mock contre 19,8% chez les singes décédés à 11 jpi), aux dépens de l'endothélium qui régresse de 20% par rapport à sa valeur basale. En globalité, on n'identifie pas d'inflammation majeure dans le rein des animaux infectés par Josiah.



**Figure 53. Composition cellulaire du rein au cours de l'infection par LASV.** Les valeurs présentées ont été obtenues par déconvolution du transcriptome de rein total, en utilisant la méthode CIBERSORT et la matrice signature issue d'un atlas rénal<sup>292</sup>. La colonne Mock présente les proportions moyennes de chaque type cellulaire mesurées dans le rein des singes contrôles (n=3). Les autres colonnes montrent la différence entre la valeur moyenne de chaque condition et la valeur moyenne des singes Mock. L'échelle de couleur montre l'intensité des variations observées entre chaque condition et la condition contrôle, les augmentations en rouge et les diminutions en bleu. Les valeurs apparaissent en gras lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) avec la valeur contrôle a été mise en évidence par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples. Un trait vertical noir sépare les conditions AV et Josiah (au même point de temps) lorsqu'une différence statistique ( $p < 0,05$ ) a été établie entre

elles par ANOVA, suivie du test de Tukey de comparaisons multiples. mDC : cellule dendritique myéloïde, pDC : cellule dendritique plasmacytoïde.

Si on regarde plus dans le détail, on observe une baisse d'un tiers de la proportion des capillaires glomérulaires lors de l'infection létale à 11 jpi, ce qui contraste significativement avec l'infection non létale au même point de temps, où on observe une légère augmentation (cf. **Figure 53**). La différence observée quant à l'épithélium du pelvis rénal vient possiblement d'une différence accidentelle dans la zone d'échantillonnage du rein d'un individu à l'autre. N'étant pas sûrs de la provenance de cette différence, nous préférons ne pas la discuter. On identifie aussi une disparition des cellules principales chez les singes décédés, tandis que leur proportion augmente sensiblement chez les singes survivants. Ces cellules sont sensibles à l'aldostérone, dont la fixation stimule l'activité de réabsorption des ions  $\text{Na}^+$  et la sécrétion des ions  $\text{K}^+$ . Bien que la proportion globale des populations immunitaires reste assez stable, on observe tout de même quelques changements sur certaines populations spécifiques. Notamment, les LT  $\text{CD4}^+$  semblent disparaître du tissu chez tous les singes infectés à 11 jpi, au profit des LT  $\text{CD8}^+$  qui augmentent chez les singes décédés mais pas chez les survivants. On note aussi une sensible hausse de la proportion des LB chez les singes infectés, dès 5 jpi et jusqu'à 11 jpi. La proportion des mDCs double chez les singes décédés à 11 jpi, à l'inverse de celle des macrophages tissulaires qui baisse de près d'un tiers. Enfin, on observe une hausse très faible mais significative du pourcentage des neutrophiles au pic de la phase aiguë chez les singes décédés.

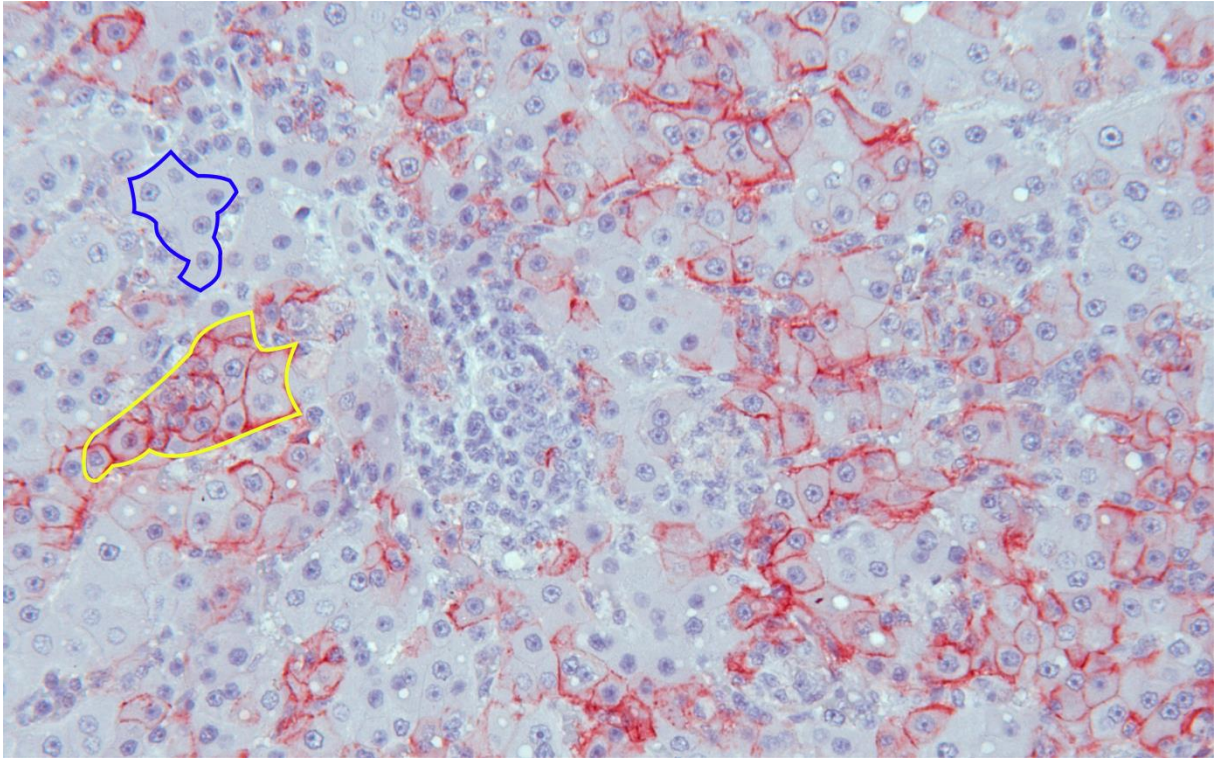
### **3.B. Analyse différentielle de l'expression génique dans les organes clés de la pathologie de la FL**

#### *3.B.i. Etude comparative des états transcriptomiques des hépatocytes par MCL-ARNseq*

A l'instar de l'approche méthodologique que nous avons développée pour obtenir le transcriptome des ZMS, nous avons employé la MCL pour établir le transcriptome de clusters d'hépatocytes infectés dans le but de les comparer à des groupes d'hépatocytes non infectés issus des foies des mêmes animaux. Nous avons donc immunomarcqué les hépatocytes infectés grâce à un anticorps dirigé contre la GP2 de LASV dans le foie des singes infectés par Josiah, et utilisé ce marquage pour discriminer et prélever sur ces coupes deux groupes distincts d'hépatocytes : infectés et non infectés (cf. **Figure 54**). En parallèle, nous avons prélevé dans les mêmes conditions des hépatocytes (non infectés) de singes infectés par AV et de singes Mock.

Nous avons ensuite établi les transcriptomes de ces quatre groupes d'hépatocytes et identifié le pourcentage des reads viraux dans chacun des groupes pour évaluer le niveau de succès de la discrimination de l'état d'infection. Nous avons réalisé le même protocole dans deux expériences totalement indépendantes, et les pourcentages des reads viraux nous ont montré que seule la deuxième expérience avait été un succès (cf.

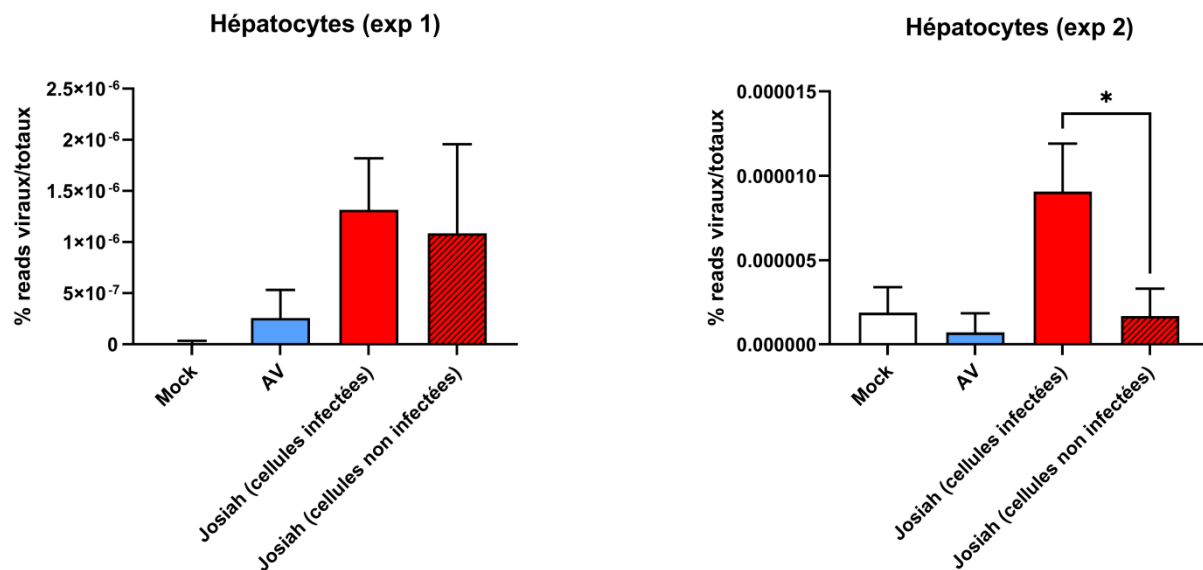
Figure 55). En effet, on y observe une différence significative de la présence du génome viral entre les cellules infectées et les cellules supposément non infectées. Nous avons donc décidé de n'utiliser que les résultats de transcriptome obtenus lors de la deuxième expérience, et avons exclu les résultats de la première.



**Figure 54. Discrimination de l'état d'infection des hépatocytes en préparation de la MCL.** Coupe de foie de singe infecté par Josiah à 11 jpi avec immunomarquage (rouge) de la GP2 de LASV. Zone jaune : exemple de cluster d'hépatocytes infectés prélevés par MCL. Zone bleue : exemple d'un groupe d'hépatocytes non infectés prélevés par MCL.

Ces conditions ont ensuite été comparées dans les bases ontologiques HALLMARK, KEGG et REACTOME (cf. Figure 56). Parmi les ontologies qui apparaissent le plus amplifiées, on identifie sans surprise les voies de signalisation des IFN  $\alpha/\beta$  et  $\gamma$ , présentes dans les bases HALLMARK et REACTOME, et qui montrent un niveau d'activation sensiblement plus fort dans les hépatocytes infectés par LASV Josiah que dans les hépatocytes non infectés des mêmes singes, et également lorsqu'on les compare à ceux des singes infectés par LASV AV. D'autres voies de l'immunité sont également positivement différentiellement exprimées (DE+) dans les conditions d'infection, et elles sont toujours plus activées chez les hépatocytes infectés par LASV Josiah que chez ceux infectés par LASV AV : système immunitaire inné, signalisation IL6/JAK/STAT3, réponse inflammatoire, signalisation du TNF $\alpha$  via NF- $\kappa$ B, complément, signalisation des cytokines immunitaires, système immunitaire adaptatif, cytotoxicité médiée par les cellules NK, interaction cytokines/récepteurs, signalisation des chimiokines, phagocytose, signalisation du BCR, prise en charge et présentation des antigènes. Cela semble indiquer que les types cellulaires prélevés lors de la MCL ne

sont pas uniquement des hépatocytes, et que nous avons également prélevé des cellules immunitaires présentes dans l'environnement proche des hépatocytes.



**Figure 55.** Pourcentage de reads viraux dans les transcriptomes d'hépatocytes à 11 jpi. Les reads séquencés dans les transcriptomes des hépatocytes des singes Mock, infectés par AV ou Josiah (infectés ou non infectés) ont été comparés aux génomes viraux des deux souches de LASV (n=3 pour chaque groupe). Les graphiques représentent le pourcentage des reads totaux ayant été identifiés comme des reads viraux dans chaque condition. Chacun d'entre eux correspond à une expérience de MCL indépendante réalisée dans le foie.

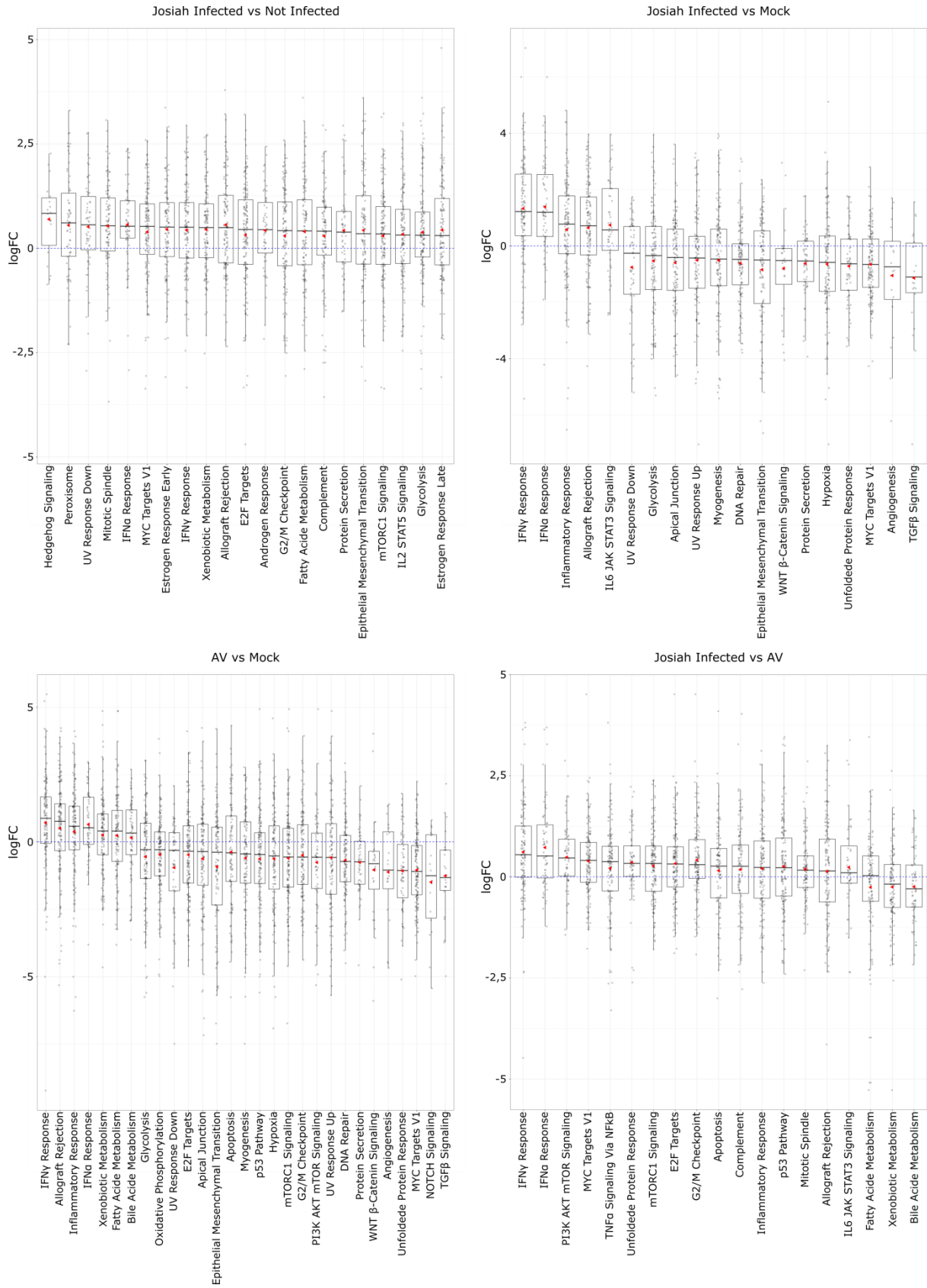
Parmi les voies DE+ associées à l'immunité dans l'environnement des hépatocytes infectés par LASV Josiah comparé à l'environnement des hépatocytes non infectés chez les mêmes singes, nous avons déjà évoqué les voies de signalisation associées à l'IFN, mais on identifie aussi la voie du complément, la voie de signalisation de l'IL2/STAT5, des marqueurs transcriptomiques de pathologie et de maladie infectieuse associant notamment le profil observé à celui de l'infection par HIV, mais encore les voies de signalisation des cytokines, la mise en place de la réponse adaptative et de la phagocytose.

D'autres mécanismes généraux semblent être fortement induits lors de l'infection effective des hépatocytes par LASV Josiah :

- Prolifération cellulaire : points de contrôle du cycle cellulaire (G2/M, phase M), mitose (prophase, fuseau mitotique).
- Endocytose et trafic vésiculaire : endocytose médiée par la clathrine, transport vésiculaire et transmembranaire, trafic membranaire, biogenèse des vésicules associée au Golgi.
- Transcription : activité des polymérases, métabolisme des ARN, épissage des ARNm, prise en charge des pré-ARNm cappés, régulation de la transcription par p53.



**Figure 56.** Analyse comparative des transcriptomes d'hépatocytes à 11 jpi. Des hépatocytes infectés et non infectés ont été prélevés par MCL dans les foies de singes infectés par LASV Josiah, et comparés à des hépatocytes de singes contrôles ou infectés par LASV AV. Une analyse différentielle des transcriptomes obtenus dans les différents groupes a ensuite été réalisée. Les heatmaps représentent les résultats des analyses ontologiques dans les bases HALLMARK, REACTOME et KEGG. Les ontologies impactées dans au moins une des conditions y figurent, avec le nombre de gènes différentiellement exprimés qui s'y rapportent (nombres entre parenthèses).



**Figure 57.** Comparaison de l'activation des voies de la base HALLMARK chez les hépatocytes lors de l'infection par LASV. Dans les boxplots, chaque point représente le niveau d'expression différentiel d'un gène appartenant à l'ontologie correspondante de la base HALLMARK, et

les triangles rouges montrent leur moyenne d'expression différentielle.  $\log FC = \log(\text{Fold Change})$ , où le *Fold Change* correspond au facteur d'accroissement entre les deux conditions.

- Modifications post-traductionnelles.
- Métabolisme : métabolisme des acides gras, métabolisme xénobiotique, glycolyse.

La plupart de ces voies semblent cohérentes avec les différents mécanismes cellulaires causés par le cycle viral actif. On notera également que très peu de mécanismes semblent être négativement différentiellement exprimés (DE-) lors de la transition d'un hépatocyte non infecté à un hépatocyte infecté par LASV Josiah.

Enfin, on pourra souligner que l'infection par LASV Josiah est associée à une immunodéficiences primaire comparativement aux singes contrôles et aux singes infectés par LASV AV.

La **Figure 57** propose une représentation différente des expressions comparées des voies et mécanismes entre les différentes conditions d'infection, en s'intéressant à l'expression différentielle (ED) moyenne des gènes de chacune des ontologies référencée dans la base HALLMARK.. On note que les voies les plus stimulées lors de l'infection par LASV sont effectivement les voies de signalisation de la réponse  $IFN\alpha$ ,  $IFN\gamma$  et  $IL6$ , conjointement aux mécanismes de la réponse inflammatoire. Dans la globalité, il apparaît une similarité dans les profils comparant les hépatocytes infectés par LASV Josiah aux hépatocytes non infectés des mêmes singes d'une part, et aux hépatocytes des singes infectés par LASV AV d'autre part, ce qui suggère un comportement proche de ces deux types d'hépatocytes au cours de l'infection par LASV.

### *3.B.ii. Analyse différentielle de l'expression génique dans le poumon*

A partir des transcriptomes obtenus sur organes totaux, nous avons analysé l'ED des gènes du poumon, du rein et des glandes surrénales, en nous intéressant principalement à des groupes de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Nous présentons les volcano plots et la heatmap des gènes les plus différentiellement exprimés dans chaque organe pour présenter la tendance générale observée dans les différents groupes.

Dans le poumon, la **Figure 58** nous montre qu'un plus grand nombre de gènes sont positivement différentiellement exprimés (DE+) lors de l'infection non létale que lors de l'infection létale. Étonnamment, on montre que l'état transcriptionnel du poumon des singes survivants n'est pas retourné à la normale à 11 jpi, malgré une pathologie faiblement détectable. En revanche, la pathologie observée chez les singes décédés semble se caractériser par un grand nombre de gènes DE-, ce qui est surprenant dans le cas d'une réponse à une infection virale. On détecte cependant que l' $IFNL1$  – aussi appelé  $IL29$  et appartenant à la famille des  $IFN\lambda$ , spécialisée dans la réponse innée des cellules épithéliales – est fortement DE+ chez les singes décédés



comparés aux survivants, ce qui laisse supposer une forte activation de la voie de l'IFN chez ces singes.

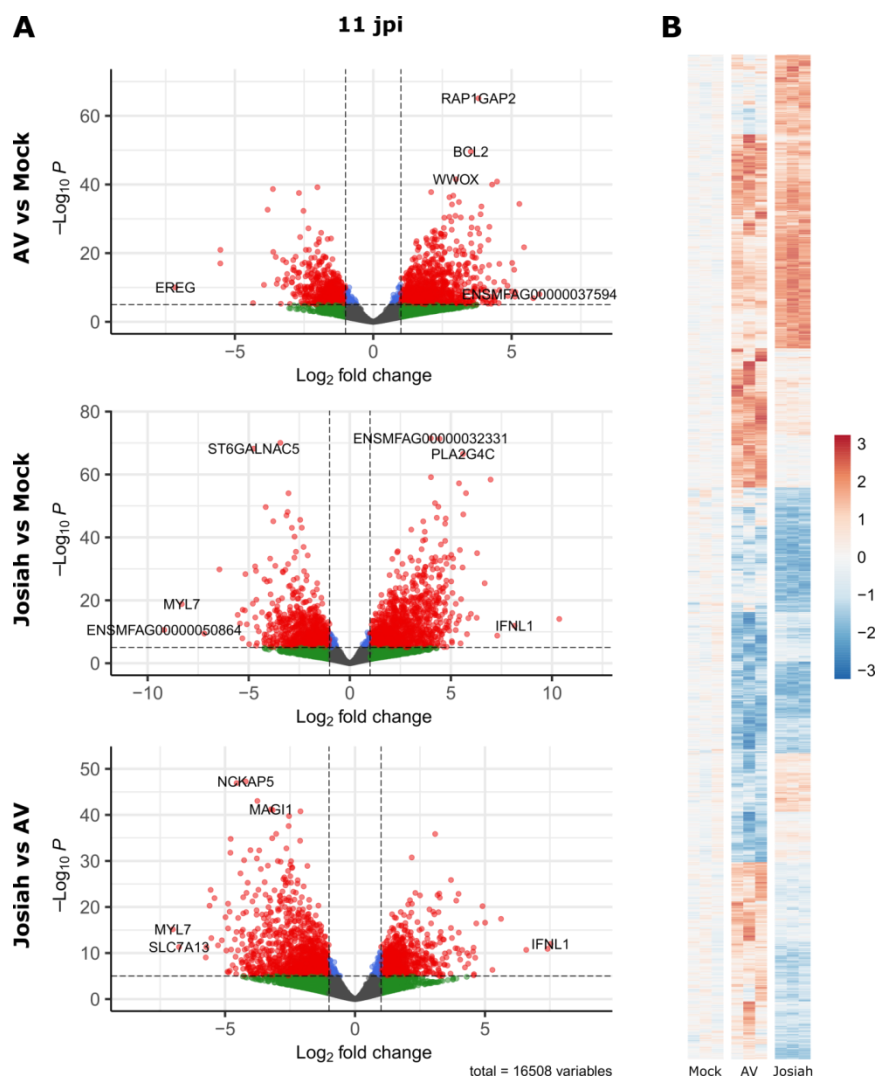
Nous pouvons voir que cette hypothèse se vérifie très majoritairement grâce à la heatmap montrant l'ED des gènes stimulés par l'IFN (ISG), qui met en évidence une expression très forte et généralisée de ce groupe de gènes chez les singes décédés, tandis qu'elle est beaucoup plus mesurée chez les survivants (cf. **Figure 59**). En tout, 42 des 48 gènes associés à la réponse IFN sont significativement DE+ chez les singes décédés par rapport aux survivants.

Par ailleurs, on note qu'une grande proportion des gènes associés à la réponse cellulaire des LT sont DE+, à la fois dans les poumons des singes décédés et survivants (cf. **Figure 59**). Une petite partie de ce groupe de gènes semble être DE+ chez les survivants uniquement, c'est notamment le cas de RORA, PRKCH, GATA3, GZMM, LEF1, XCL1/XCL2 et KLRB1. RORA, PRKCH et LEF1 jouent un rôle anti-inflammatoire via l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B, de manière directe ou via l'inhibition du TCR $\alpha/\beta$ . GATA3 joue un rôle primordial dans la mise en place de la réponse Th2 et l'inhibition de la réponse Th1 pro-inflammatoire. Les Th2 interviennent en effet à la fin du processus inflammatoire, en sécrétant de l'IL4 et de l'IL10, qui inhibent la sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  par les Th1 et mettent fin à l'inflammation. L'expression de XCL1/XCL2 chez les survivants montre la sécrétion de chimiokines attirant spécifiquement les LT et pas les monocytes ni les neutrophiles, ce qui montre également que l'inflammation est en phase de terminaison. Enfin, l'expression de KLRB1 met en avant l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK. A l'inverse, parmi les gènes significativement plus exprimés chez les décédés, on note des gènes marqueurs de l'activité cytotoxique (PRF1, GRZA/B) mais aussi des gènes stimulant la sécrétion cytokinique et l'activation des LT spécifique à l'antigène (CD2, CD3E, ICOS, SIRPG, TRAC) et enfin des gènes impliqués dans l'immunosuppression des LT (TIGIT, GPR171).

La réponse des monocytes est quant à elle inconsistante, et aucune tendance franche n'en ressort même si un grand nombre de gènes sont DE par rapport au Mock. Parmi les gènes qui sont significativement DE+ chez les singes décédés par rapport aux survivants, on trouve de nombreux gènes participant à l'activité pro-inflammatoire : TLR8 et TLR4 (via la voie Myd88/NF- $\kappa$ B), TGFB1 (qui active la réponse Th17 en présence d'IL6 et IL21), FGR et HCK (qui promeuvent la sécrétion de cytokines inflammatoires). On trouve aussi des gènes impliqués dans l'activation de l'apoptose (PRKCD), de la phagocytose des antigènes opsonisés (FCGR2A) et de la fonction des LT dans les muqueuses (FGL2).

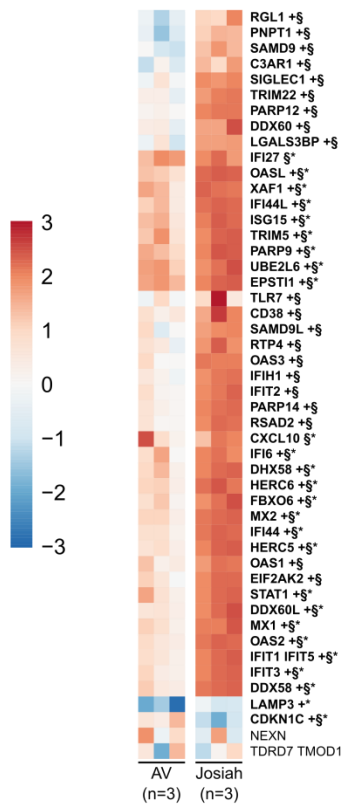
Enfin, la réponse cytokinique met en avant une activation très forte d'une grande partie des gènes de cytokines et de récepteurs, beaucoup plus marquée dans les poumons des singes décédés. Aucune tendance pro- ou anti-inflammatoire ne se dessine

dans les poumons des singes décédés, le profil est typique de la tempête cytokinique, aussi observée dans le sang, qui intervient en phase terminale et correspond à une sécrétion dérégulée d'un grand nombre de cytokines ayant souvent des rôles antagonistes. On note des signaux chimiotactiques de neutrophiles (CXCL1), basophiles et éosinophiles (CCL8) spécifiquement chez les singes décédés et des signaux d'attraction de macrophages, DC (CCL25), et de LT (CCL21) chez les singes survivants. On observe aussi que chez les singes mortellement atteints l'expression de gènes cytokiniques activant les voies de l'IL6 (IL6, LIFR) et NF- $\kappa$ B (EPOR, TNFRSF8). Le profil général est caractéristique d'un état inflammatoire avancé dans les poumons des singes infectés par LASV Josiah.

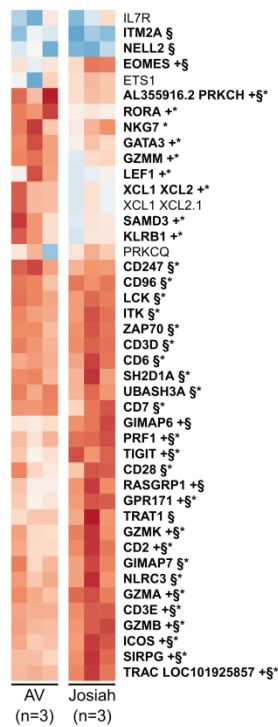


**Figure 58. Analyse différentielle de l'expression génique dans le poumon des singes infectés.** **A.** Volcano plots exposant la répartition des différences d'expression génique individuelles entre les conditions précisées à gauche de chaque graphique. Chaque point représente un gène et les points en rouge représentent les gènes dont la différence d'expression entre les deux conditions est statistiquement très significative ( $p < 1.10^{-5}$ ) avec  $|\log_2(\text{FC})| > 1$ . Quand on compare X vs Y,  $\log_2(\text{FC}) > 0$  implique Expression(X) > Expression(Y) et  $\log_2(\text{FC}) < 0$  implique Expression(X) < Expression(Y). **B.** Heatmap des gènes les plus différenciellement exprimés, les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock et normalisées par l'écart-type.

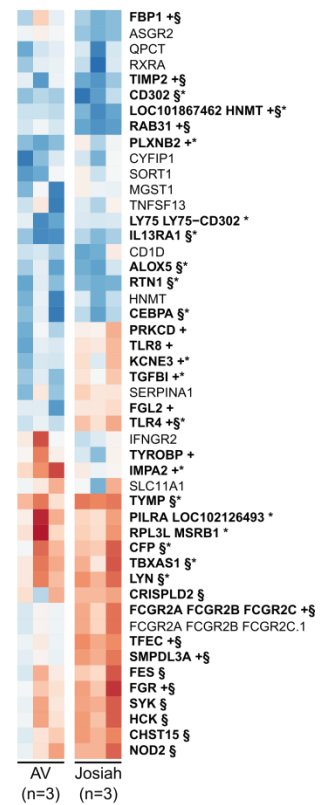
### Gènes antiviraux stimulés par l'IFN



### Réponse T



### Réponse monocytaire



### Cytokines

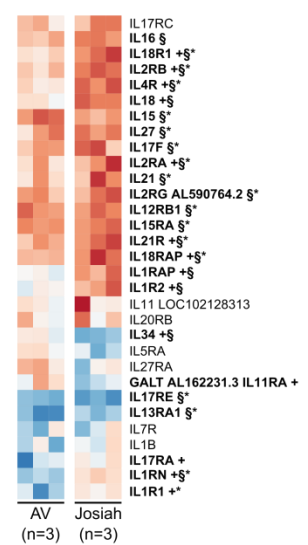
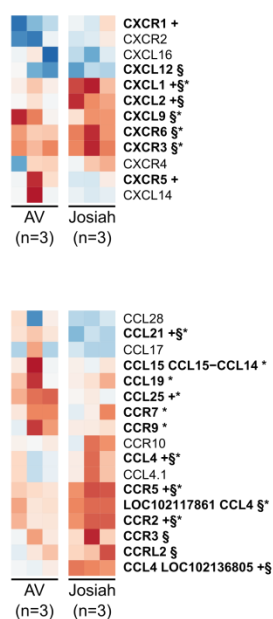
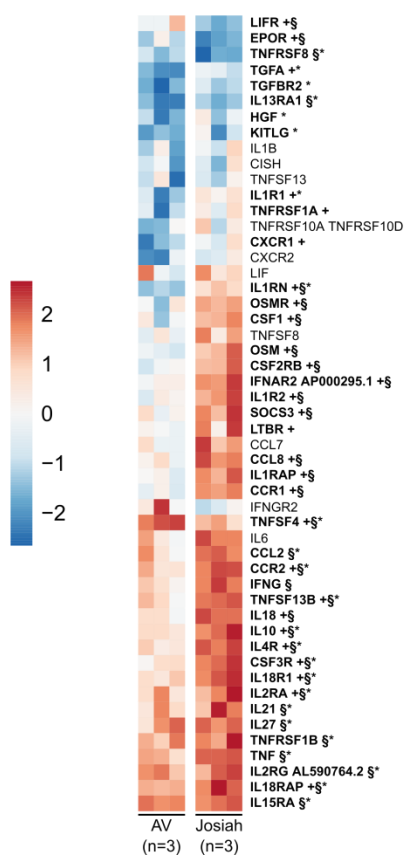


Figure 59. Analyse différentielle des gènes impliqués dans la réponse immunitaire dans le poumon lors de l'infection par LASV à 11 jpi. Les gènes d'intérêt sont regroupés pour former des

groupes fonctionnels : gènes antiviraux stimulés par l'IFN, réponse des LT, réponse des monocytes, cytokines et récepteurs généraux,  $\alpha$ -chimiokines et récepteurs,  $\beta$ -chimiokines et récepteurs, interleukines et récepteurs. Les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock (non présenté) et normalisées par l'écart-type. Les moyennes de chaque condition (Mock, AV et Josiah) ont été comparées par ANOVA et les gènes en gras présentent une différence statistique au sein d'au moins un des groupes sur les trois. \* :  $p(\text{AV vs Mock}) < 0,05$  ; § :  $p(\text{Josiah vs Mock}) < 0,05$  ; + :  $p(\text{AV vs Josiah}) < 0,05$ .

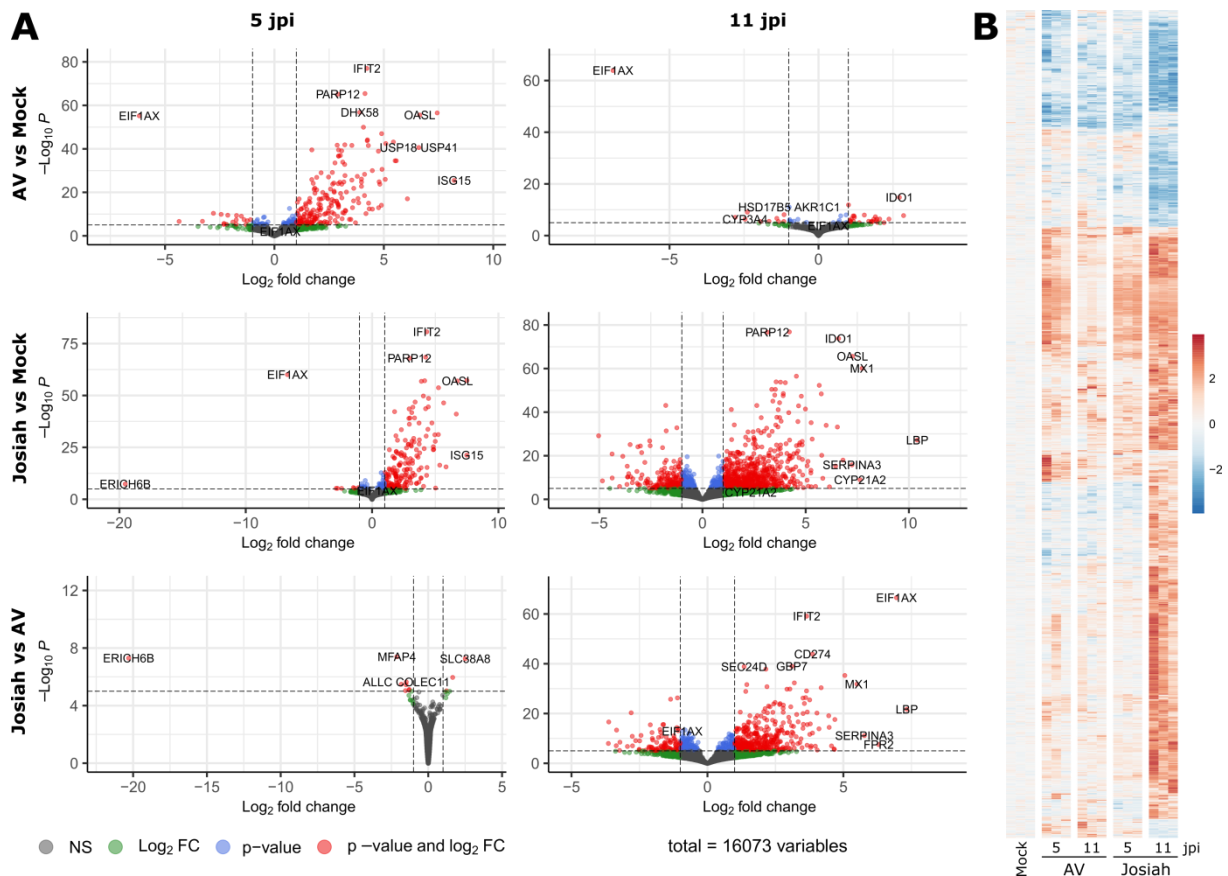
### *3.B.iii. Analyse différentielle de l'expression génique dans le rein*

Les profils d'ED matérialisés sur les volcano plots mettent en évidence un phénomène intéressant quant à la dynamique de l'infection. En effet, à 5 jpi les profils entre LASV AV et LASV Josiah sont extrêmement similaires, seule une poignée de gènes montrent une différence d'expression entre les deux conditions (cf. **Figure 60**). Le gène ERICH6B qui apparaît excessivement downrégulé chez les singes décédés uniquement n'est pas encore annoté et on ne connaît pas son rôle biologique. Lors de la phase aiguë en revanche, les profils entre les singes survivants et les singes décédés diffèrent fortement. Tandis que les reins des animaux infectés par LASV AV semblent avoir retrouvé un état transcriptomique très proche de celui des animaux sains, la dérégulation de l'expression des gènes s'est intensifiée chez les animaux décédés. On assiste là aussi à l'augmentation de l'expression de nombreux ISG dont OASL, MX1, IFIT2 et LBP et à des gènes marqueurs d'immunosuppression avec IDO1. On note sur la heatmap qu'à 11 jpi, parmi les gènes qui sont le plus DE chez les singes décédés, environ les trois quarts d'entre eux sont DE+.

Lorsqu'on s'intéresse aux ISG dans le rein, on identifie clairement un phénomène qui s'inscrit dans les observations précédemment décrites, avec une grande partie des gènes DE+ dans les deux conditions d'infection à 5 jpi, et un retour au niveau d'expression basal très net chez les singes survivants à 11 jpi, tandis que ces gènes restent très DE+ chez les animaux décédés (cf. **Figure 61**). Lors de la phase aiguë, on dénombre à nouveau 42/48 gènes appartenant aux ISG étant significativement DE+ dans la condition LASV Josiah comparé à LASV AV. Cela témoigne d'une activation très forte de la réponse IFN dans le rein qui se maintient jusqu'à la mort chez les singes décédés.

A l'inverse des résultats observés dans le tissu pulmonaire, les gènes de la réponse T dans les reins des singes survivants ne sont pas DE, ni précocement ni tardivement. Cela suggère un niveau très faible – voire nul – d'inflammation dans les reins de ces animaux. A contrario, on détecte que de nombreux gènes associés à la réponse T sont DE+ chez les singes décédés à 11 jpi uniquement, il s'agit majoritairement de gènes impliqués dans des processus pro-inflammatoires via la voie des TCR et NF- $\kappa$ B (CD6, ICOS, ITK, CD3E, CD247, ZAP70) ainsi que l'activité cytotoxique des NK (PRF1, GZMA/B/K). On note en revanche l'absence d'expression des gènes régulateurs de la réponse T que sont RASGRP1, RORA, GATA3 ou encore LEF1. Cela témoigne d'un

état d'inflammation en cours dans le rein des singes infectés par LASV Josiah au moment de leur mort.

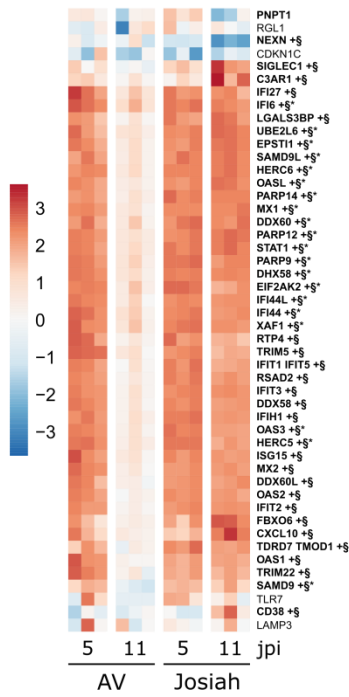


**Figure 60. Analyse différentielle de l'expression génique dans le rein des singes infectés. A.** Volcano plots exposant la répartition des différences d'expression génique individuelles entre les conditions précisées à gauche de chaque graphique. Chaque point représente un gène et les points en rouge représentent les gènes dont la différence d'expression entre les deux conditions est statistiquement très significative ( $p < 1.10^{-5}$ ) avec  $|\log_2(\text{FC})| > 1$ . Quand on compare X vs Y,  $\log_2(\text{FC}) > 0$  implique  $\text{Expression}(X) > \text{Expression}(Y)$  et  $\log_2(\text{FC}) < 0$  implique  $\text{Expression}(X) < \text{Expression}(Y)$ . B. Heatmap des gènes les plus différenciellement exprimés, les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock et normalisées par l'écart-type.

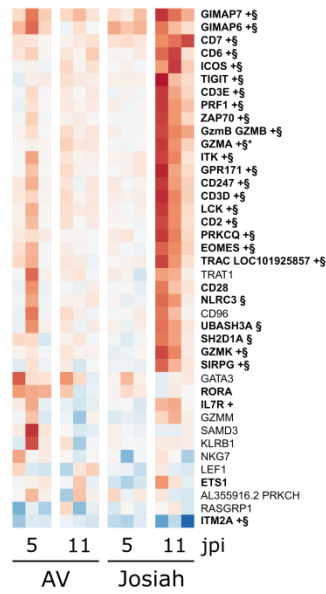
Les gènes de la réponse monocytaire sont encore une fois peu DE dans les reins des singes infectés, en particulier dans ceux des survivants, où le seul gène significativement DE+ au cours de l'infection est TNFSF13, un ligand analogue du  $\text{TNF}\alpha$  qui participe à la réponse immunitaire médiée par les monocytes et les macrophages. Parmi les gènes qui sont DE+ chez les singes décédés à 11 jpi, on retrouve essentiellement des gènes impliqués dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TLR4, FGR, HCK), facilitant en particulier la réponse IFN (NOD2, IFNGR2).

L'état transcriptomique des gènes cytokiniques en est accord avec les réponses T et monocytaire précédemment observées, en effet il permet de constater une forte réponse cytokinique chez les singes décédés uniquement, tandis que seulement trois

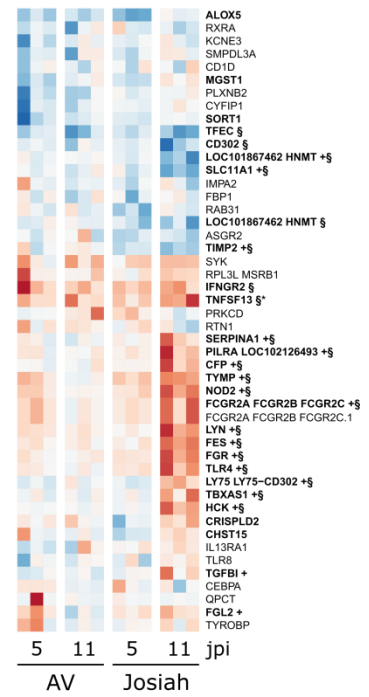
### Gènes antiviraux stimulés par l'IFN



### Réponse T



### Réponse monocytaire



### Cytokines

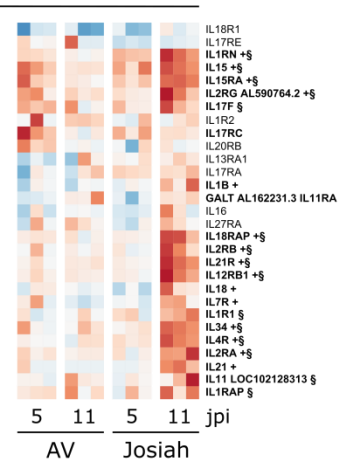
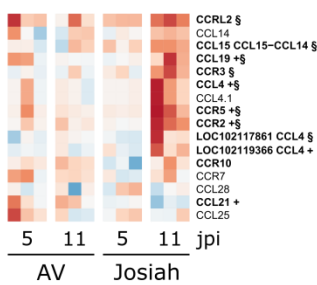
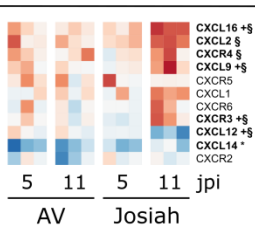
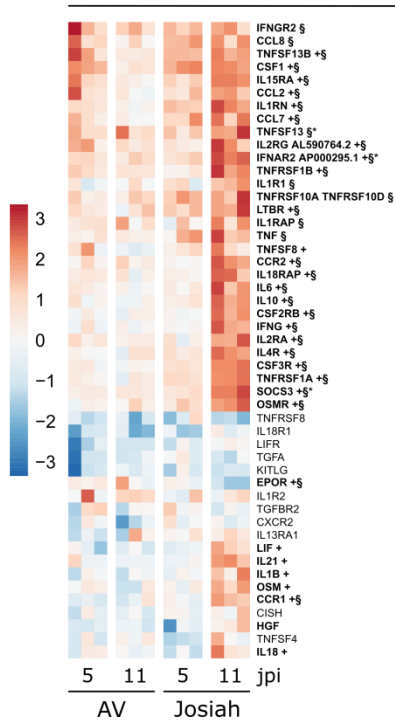


Figure 61. Analyse différentielle des gènes impliqués dans la réponse immunitaire dans le rein lors de l'infection par LASV. Les gènes d'intérêt sont regroupés pour former des groupes fonctionnels : gènes antiviraux stimulés par l'IFN, réponse des LT, réponse des monocytes, cytokines et récepteurs généraux,  $\alpha$ -chimiokines et récepteurs,  $\beta$ -chimiokines et récepteurs, interleukines et récepteurs. Les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock (non présenté) et normalisées par l'écart-type. Les moyennes de chaque condition (Mock, AV<sub>J5</sub>, AV<sub>J11</sub>, Josiah<sub>J5</sub> et Josiah<sub>J11</sub>) ont été comparées par ANOVA et les gènes en gras présentent une différence statistique au sein d'au moins un des groupes sur les cinq. \* :  $p(\text{AV}_{J11} \text{ vs Mock}) < 0,05$  ; § :  $p(\text{Josiah}_{J11} \text{ vs Mock}) < 0,05$  ; + :  $p(\text{AV}_{J11} \text{ vs Josiah}_{J11}) < 0,05$ .

gènes associés aux cytokines sont DE+ chez les singes survivants : TNFSF13, IFNAR2 et SOCS3. Nous avons déjà décrit TNFSF13 plus haut, et IFNAR2 est une des deux sous-unités qui compose le récepteur membranaire aux IFN de type I, il joue donc un rôle important dans la mise en place de la réponse IFN. SOCS3 est quant à lui impliqué dans la boucle de régulation négative de la sécrétion des cytokines, il a donc un rôle anti-inflammatoire, justifiant à nouveau le faible niveau inflammatoire mesuré dans le rein des singes infectés par LASV AV. En revanche les gènes cytokiniques sont très nombreux à être DE+ dans les reins des singes décédés à 11 jpi, et on assiste, comme dans le poumon, à l'activation d'un mélange de signaux contradictoires à la fois pro- et anti-inflammatoires caractéristiques d'une réponse immunitaire dérégulée et inefficace. Bien que les ISG soient fortement stimulés à 5 jpi dans les deux conditions, on note que cela ne se traduit pas immédiatement par une forte activation de la transcription des gènes de cytokines, ce qui peut s'expliquer par la faible proportion de cellules immunitaires dans le rein.

### *3.B.iv. Analyse différentielle de l'expression génique dans les glandes surrénales*

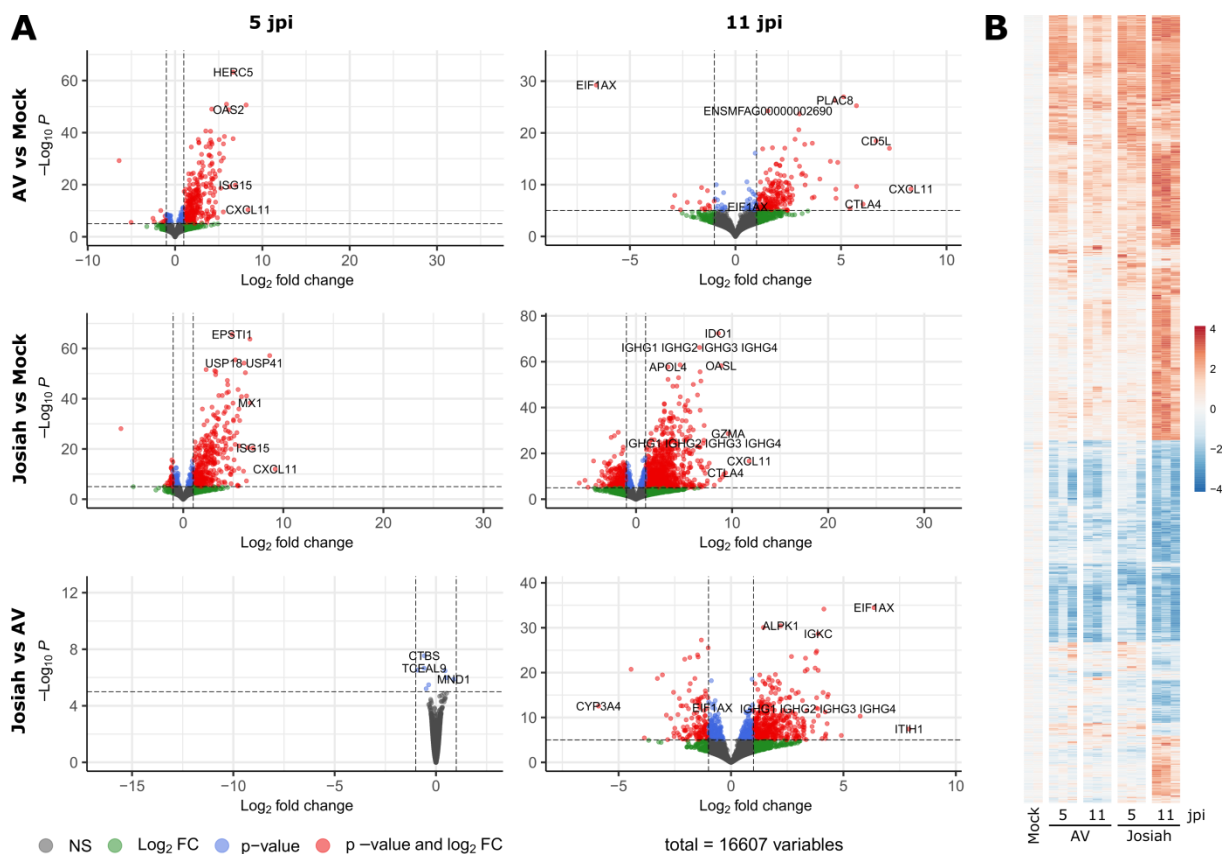
Le profil transcriptomique des glandes surrénales met en évidence un comportement intermédiaire entre celui observé dans les poumons et celui observé dans le rein (cf. **Figure 62**). En effet, le profil entre les deux conditions d'infection est très comparable à 5 jpi, les mêmes gènes sont DE- et DE+ dans chacune des conditions (cf. heatmap générale), et les gènes DE+ semblent être en majorité des ISG (OAS2, MX1, ISG15) ou des gènes associés à l'inflammation, comme CXCL11 qui recrute sélectivement les LT activés. Lors de la phase aiguë cependant, si l'état transcriptionnel des glandes surrénales des singes survivants semble être resté constant depuis la phase d'incubation, on assiste à une intensification de l'expression différentielle des gènes chez les singes décédés. On identifie notamment des gènes d'immunoglobulines spécifiquement exprimés chez les singes décédés (IGKC, IGHG1/2/3/4) ce qui peut suggérer un afflux de LB.

La réponse des ISG est très similaire à celle observée dans le poumon, avec une très forte activation généralisée de ces gènes dans les deux conditions d'infection à 5 jpi, et un retour au niveau presque basal dans les glandes surrénales des survivants uniquement à 11 jpi (cf. **Figure 63**). 36 gènes parmi les 48 de ce groupe de gènes sont significativement DE+ chez les décédés comparativement aux survivants à 11 jpi. De manière intéressante, on a pu remarquer que trois gènes d'ISG (NEXN, CDKN1C et LAMP3) restaient systématiquement à leur niveau basal d'expression ou étaient DE- à 11 jpi chez les singes décédés, et ce à la fois dans le poumon, les reins et les glandes surrénales.

Les gènes de la réponse T sont pour la plupart DE+ au cours de la phase aiguë chez les singes décédés, mais on observe que c'est également le cas de certains gènes chez les singes survivants. En particulier, on note que les gènes impliqués dans

l'activation de la cytotoxicité des cellules NK (PRF1, GZMA/B, SH2D1A) sont significativement DE+ chez les singes infectés par LASV AV comparé aux singes Mock, ainsi que plusieurs gènes impliqués dans la signalisation de la voie du TCR (CD2, CD6, CD247, LCK, ITK) et le gène de régulation de la voie NF- $\kappa$ B, PRKCH. Chez les singes décédés, on remarque là aussi l'absence de DE+ des gènes de régulation impliqués dans la fin du processus inflammatoire (LEF1, GATA3, XCL1/2). On notera que le gène NKG7, supposément nécessaire à la dégranulation des cellules NK et des LT cytotoxiques, n'est pas DE+ dans le rein et les glandes surrénales, alors qu'il l'est dans les poumons (significativement chez les survivants).

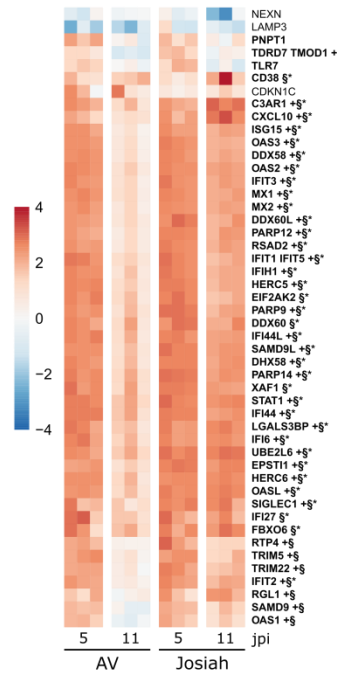
Dans les deux conditions d'infection, on remarque que la réponse monocytaire est beaucoup plus marquée que dans les poumons et dans les reins. On assiste en effet à une augmentation forte de l'expression d'un grand nombre de gènes, et ce dès 5 jpi, une réponse qui s'intensifie spécifiquement chez les singes décédés au pic des symptômes.



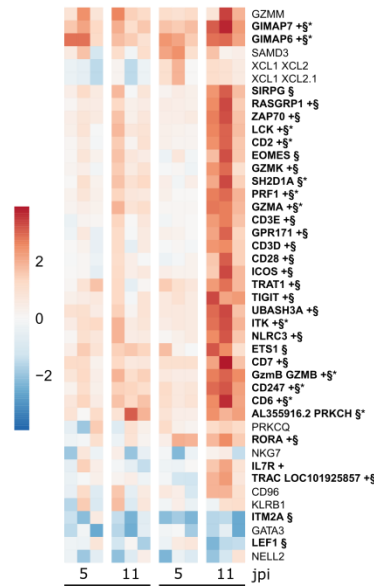
**Figure 62. Analyse différentielle de l'expression génique dans les glandes surrénales des singes infectés.** A. Volcano plots exposant la répartition des différences d'expression génique individuelles entre les conditions précisées à gauche de chaque graphique. Chaque point représente un gène et les points en rouge représentent les gènes dont la différence d'expression entre les deux conditions est statistiquement très significative ( $p < 1.10^{-5}$ ) avec  $|\log_2(\text{FC})| > 1$ . Quand on compare X vs Y,  $\log_2(\text{FC}) > 0$  implique  $\text{Expression}(X) > \text{Expression}(Y)$  et  $\log_2(\text{FC}) < 0$  implique  $\text{Expression}(X) < \text{Expression}(Y)$ . B. Heatmap des gènes les plus différenciellement exprimés, les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock et normalisées par l'écart-type.



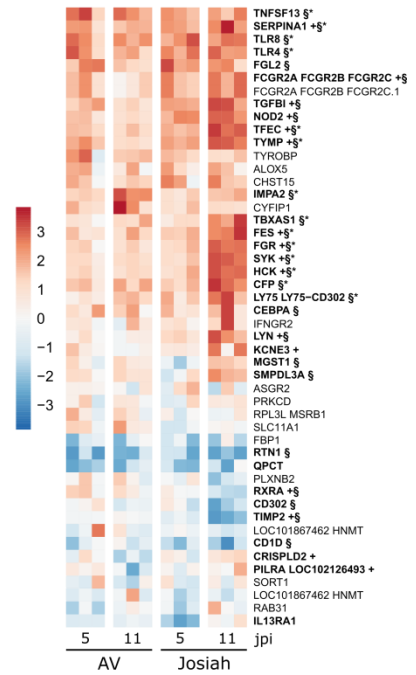
### Gènes antiviraux stimulés par l'IFN



### Réponse T



### Réponse monocytaire



### Cytokines

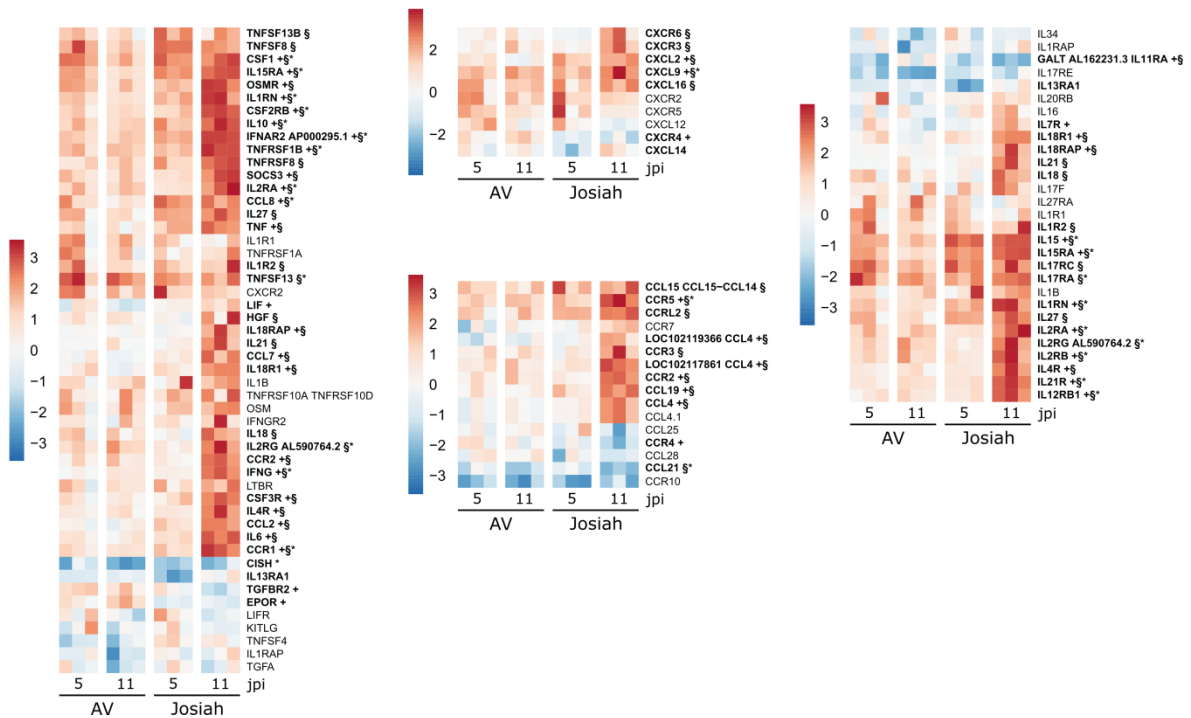


Figure 63. Analyse différentielle des gènes impliqués dans la réponse immunitaire dans les glandes surrénales lors de l'infection par LASV. Les gènes d'intérêt sont regroupés pour former des groupes fonctionnels : gènes antiviraux stimulés par l'IFN, réponse des LT, réponse des monocytes, cytokines et récepteurs généraux,  $\alpha$ -chimiokines et récepteurs,  $\beta$ -chimiokines et récepteurs, interleukines et récepteurs. Les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock (non présenté) et normalisées par l'écart-type. Les moyennes de chaque condition (Mock, AV<sub>J5</sub>, AV<sub>J11</sub>, Josiah<sub>J5</sub> et Josiah<sub>J11</sub>) ont été comparées par ANOVA et les gènes en gras présentent une différence statistique au sein d'au moins un des groupes sur les cinq. \* :  $p(\text{AV}_{J11} \text{ vs Mock}) < 0,05$  ; § :  $p(\text{Josiah}_{J11} \text{ vs Mock}) < 0,05$  ; + :  $p(\text{AV}_{J11} \text{ vs Josiah}_{J11}) < 0,05$ .

En détail, on détecte dans les deux conditions d'infection des gènes pro-inflammatoires étant DE+ (TLR4, TLR8, TNFSF13, FGR, HCK), témoignant d'un état d'inflammation avancée dans les glandes surrénales de tous les singes. Ce phénomène est cependant plus fort chez les singes mortellement infectés, dont un plus grand nombre de gènes pro-inflammatoire est DE+ (NOD2, TGFB1, FCGR2A/B/C) ou simplement encore plus DE+ que chez les singes survivants. On notera que le gène TBXAS1, qui catalyse la conversion de la prostaglandine H2 en thromboxane A2, un inducteur fort de la vasoconstriction et des processus de coagulation, est fortement DE+ dans les reins et les glandes surrénales des singes décédés à 11 jpi spécifiquement, et chez tous les infectés dans le poumon. Cela corrèle avec l'état physiologique d'hypovolémie et de perméabilité accrue de l'endothélium vasculaire.

Le profil transcriptomique des gènes cytokiniques montre une ED+ de nombreuses cytokines pro- et anti-inflammatoires chez les singes décédés à 11 jpi. A 5 jpi, les profils des singes survivants et décédés sont très comparables, et il reste constant chez les singes survivants à 11 jpi, s'amplifiant fortement chez les singes infectés par LASV Josiah. La tolérance immunitaire des glandes surrénales induite par la forte présence de cortisol dans cet organe peut contribuer à expliquer le haut niveau de sécrétion de cytokines lors de l'infection par LASV.

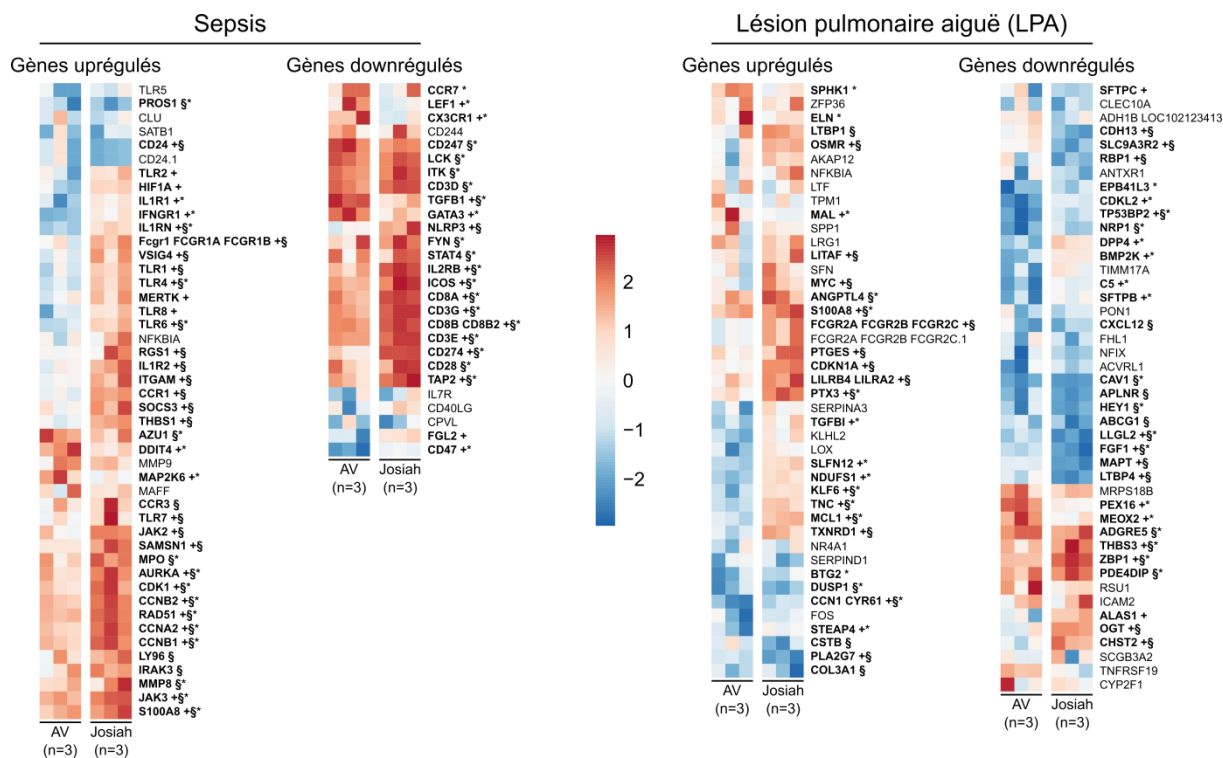
### **3.C. Comparaison des syndromes observés dans les organes des singes infectés par LASV avec des pathologies cliniquement décrites**

Nous avons également souhaité utiliser les données de transcriptomique sur organes totaux pour rechercher des similitudes entre la pathologie induite dans les organes lors de l'infection par LASV et d'autres pathologies connues affectant ces mêmes organes. Dans ce but, nous avons identifié des groupes de gènes dont l'ED avait au préalable été décrite dans ces organes au cours d'autres pathologies, et nous nous sommes intéressés à leur niveau d'expression dans nos modèles. Cette approche comparative a pour objectif d'appréhender plus en détail la symptomatologie de l'infection dans les organes centraux, et d'éventuellement identifier des axes de traitement si toutefois les pathologies approchantes en disposent.

#### *3.C.i. La pathologie pulmonaire*

La pathologie terminale de la FL a été rapprochée de la pathologie causée lors d'un choc septique, qui affecte généralement la fonction de tous les organes, c'est pourquoi nous avons sélectionné une liste de gènes qui sont significativement DE+ ou DE- dans les PBMC lors du sepsis<sup>294-300</sup>, et l'avons utilisée pour comparer les profils transcriptomiques mesurés dans les organes (cf. **Figure 64**). Nous avons déjà soumis cette même liste de gènes à la comparaison avec le transcriptome obtenu dans les PBMC, et les résultats étaient assez concordants, c'est pourquoi nous l'avons conservée pour effectuer la même comparaison dans les autres tissus. En parallèle, nous avons

aussi comparé les résultats obtenus lors de la FL à une liste de gènes identifiés comme DE+ ou DE- lors de la lésion pulmonaire aiguë (syndrome précédant le SDRA et souvent assimilé à ce dernier, parfois induit par le sepsis <sup>301</sup>) induite dans un modèle murin.



**Figure 64. Analyse comparative de l'infection par LASV avec le sepsis et la LPA dans le poumon.** Niveau d'expression différentiel de groupes de gènes décrits pour être positivement ou négativement régulés lors du sepsis (gauche) et positivement ou négativement régulés lors de la lésion pulmonaire aiguë (droite), comparativement à l'expression dans les poumons des singes Mock. Les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock (non présenté) et normalisées par l'écart-type. Les moyennes de chaque condition (Mock, AV et Josiah) ont été comparées par ANOVA et les gènes en gras présentent une différence statistique au sein d'au moins un des groupes sur les trois. \* :  $p(\text{AV vs Mock}) < 0,05$  ; § :  $p(\text{Josiah vs Mock}) < 0,05$  ; + :  $p(\text{AV vs Josiah}) < 0,05$ .

Si la similitude observée avec le profil transcriptomique du sepsis est forte pour les gènes DE+ (29/46 significativement DE+) chez les singes infectés par LASV Josiah, on ne peut absolument pas en dire autant dans la liste des gènes DE- (0/27). D'après les observations dans les différentes études de transcriptomique sur le sepsis, les gènes DE- sont essentiellement associés à l'immunité des LT et des NK, or ces deux réponses sont très DE+ lors de l'infection par LASV dans le poumon. La réponse observée avec LASV AV est encore plus éloignée du profil transcriptomique du sepsis.

La comparaison avec la LPA montre un profil qui est généralement similaire avec cette pathologie, la majorité des variations observées chez les singes infectés par LASV Josiah allant dans le même sens que celui observé lors de la LPA. Cependant, ces variations ne sont pas toutes mesurées à un niveau suffisant pour être statistiquement significatives, seulement 15/43 gènes sont significativement DE+ parmi la liste correspondante et 14/44 sont DE- parmi l'autre liste. Au sein des gènes qui sont DE- lors de la LPA et DE+ lors de l'infection par LASV Josiah, on identifie des gènes impliqués dans la migration et l'attraction des LT dans le tissu (ADGRE5 et CHST2) ainsi qu'un gène nécessaire à la nécroptose induite par le TNF $\alpha$  (ZBP1). Enfin, parmi les gènes qui sont DE+ lors de la LPA et DE- lors de l'infection par LASV Josiah, on détecte un gène promoteur de l'angiogenèse et de la prolifération cellulaire (CCN1) et un gène à l'activité anticoagulante (PLA2G7).

#### *Infection par SARS-CoV2*

Nous avons sélectionné un groupe de gènes subissant une forte modification de leur expression ( $|\log_2(\text{FC})| > 3,58$ ,  $p_{\text{adj}} < 0,05$ ) lors de l'infection de l'humain par SARS-CoV2, relativement à des patients sains, dans des échantillons de poumons humains prélevés post-mortem<sup>302-304</sup>. Deux listes de 134 et 161 gènes respectivement DE+ et DE- ont été établies et les niveaux d'expression des gènes en question ont été évalués lors de l'infection par LASV AV et LASV Josiah (cf. **Figure 65**).

Les résultats montrent que 60% de la signature d'uprégulation génique induite par le SARS-CoV2 dans le poumon est récapitulée par l'infection par LASV Josiah, contre 38% par LASV AV. En revanche, la signature des gènes DE- est recouverte à hauteur de ~20% seulement par les deux conditions d'infection à LASV. Malgré le fait que la FL ne soit pas une infection virale essentiellement pulmonaire, la forte correspondance de la signature des gènes DE+ lors des infections par LASV Josiah et par SARS-CoV2 démontre probablement des mécanismes communs à l'origine de la pathologie observée dans le poumon lors de ces deux maladies. Si on s'intéresse aux ontologies présentes dans la liste des 134 gènes uprégulés lors de l'infection par le SARS-CoV2, on remarque que celle-ci contient un grand nombre d'ISG connus pour leurs rôles dans la réponse innée dirigée contre les pathogènes et plus spécifiquement contre les virus. On y trouve notamment les gènes de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et chimiotactiques (CCL4, TNF, CXCL10, IL27, TNFSF13B, CCL8, CCL11, CCL19), récepteurs de cytokines (IL2RG), protéines ayant une activité antivirale ciblée (OAS1, OAS2, OAS3, MX1, MX2, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFI6, ISG15, IFITM1) et des marqueurs d'activité immunosuppressive d'origine myéloïde (S100A8, CEACAM1). Cette réponse semble induire un environnement très riche en cytokines pro- et anti-inflammatoires, signe d'une réponse dérégulée et non contrôlée probablement délétère.

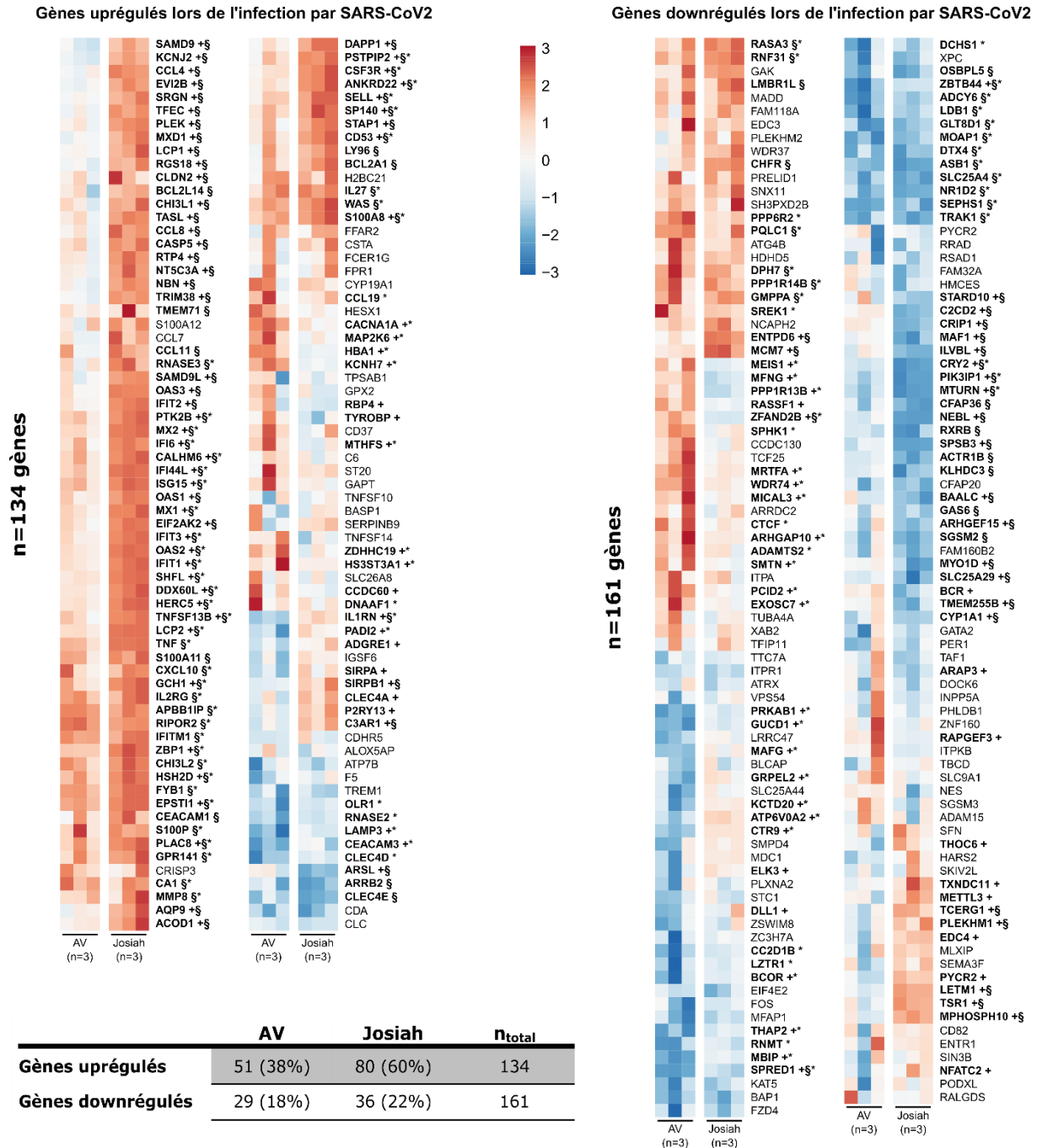
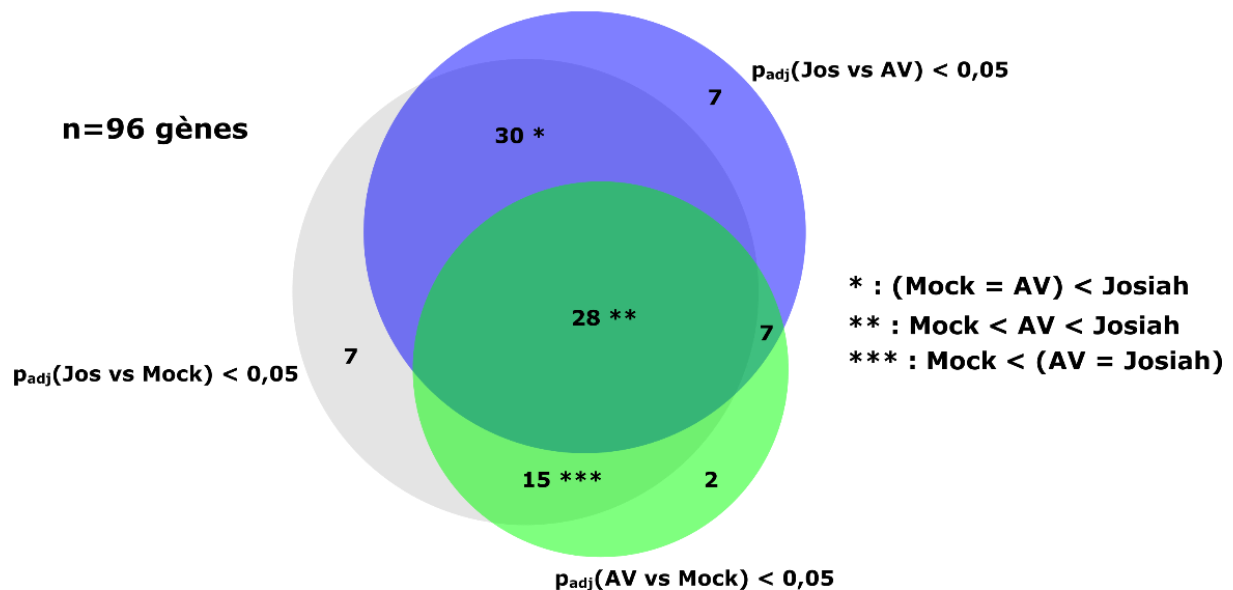


Figure 65. Analyse comparative de l'infection par LASV avec la pathologie pulmonaire induite par SARS-CoV2. Niveau d'expression différentiel de groupes de gènes décrits pour être positivement (gauche) ou négativement (droite) régulés lors de l'infection par SARS-CoV2, comparativement à l'expression dans les poumons des singes Mock. Les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock (non présenté) et normalisées par l'écart-type. Le tableau montre le nombre absolu et le pourcentage de gènes suivant significativement la même tendance d'expression différentielle que lors de l'infection par SARS-CoV2. Les moyennes de chaque condition (Mock, AV et Josiah) ont été comparées par ANOVA et les gènes en gras présentent une différence statistique au sein d'au moins un des groupes sur les trois. \* :  $p(\text{AV vs Mock}) < 0,05$  ; § :  $p(\text{Josiah vs Mock}) < 0,05$  ; + :  $p(\text{AV vs Josiah}) < 0,05$ .

Dans l'objectif de clarifier les comportements des différents gènes pulmonaires au cours des pathologies létale et non létale, nous avons sélectionné les gènes pour lesquels au moins une des conditions d'infection était significativement identique à celle observée avec SARS-CoV2, et les avons présentés dans un diagramme de Venn (cf. **Figure 66**)<sup>305</sup>. Cela représente 96 gènes parmi les 134 DE+ et 62 parmi les 161 DE- lors du COVID-19.

**Répartition des gènes présentant au moins une uprégulation avec  $p_{adj} < 0,05$  :**



**Répartition des gènes présentant au moins une downrégulation avec  $p_{adj} < 0,05$  :**

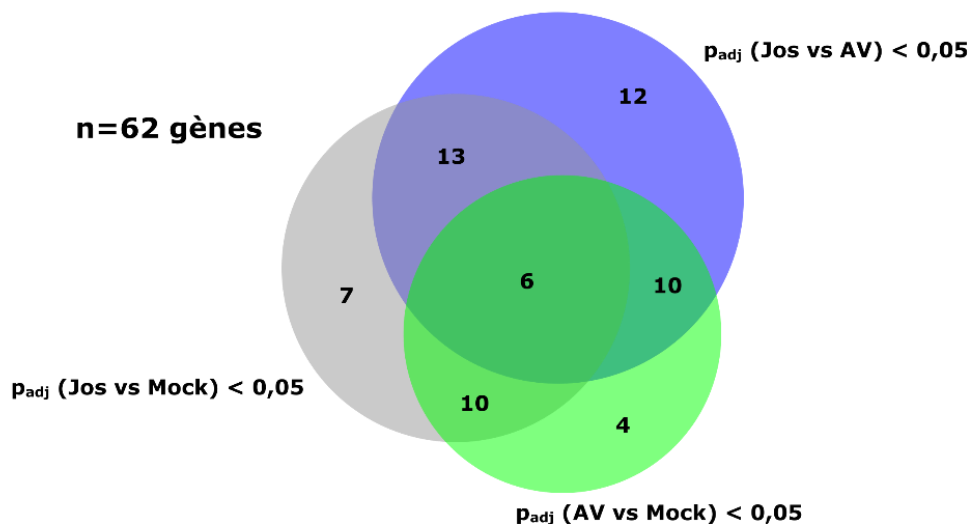
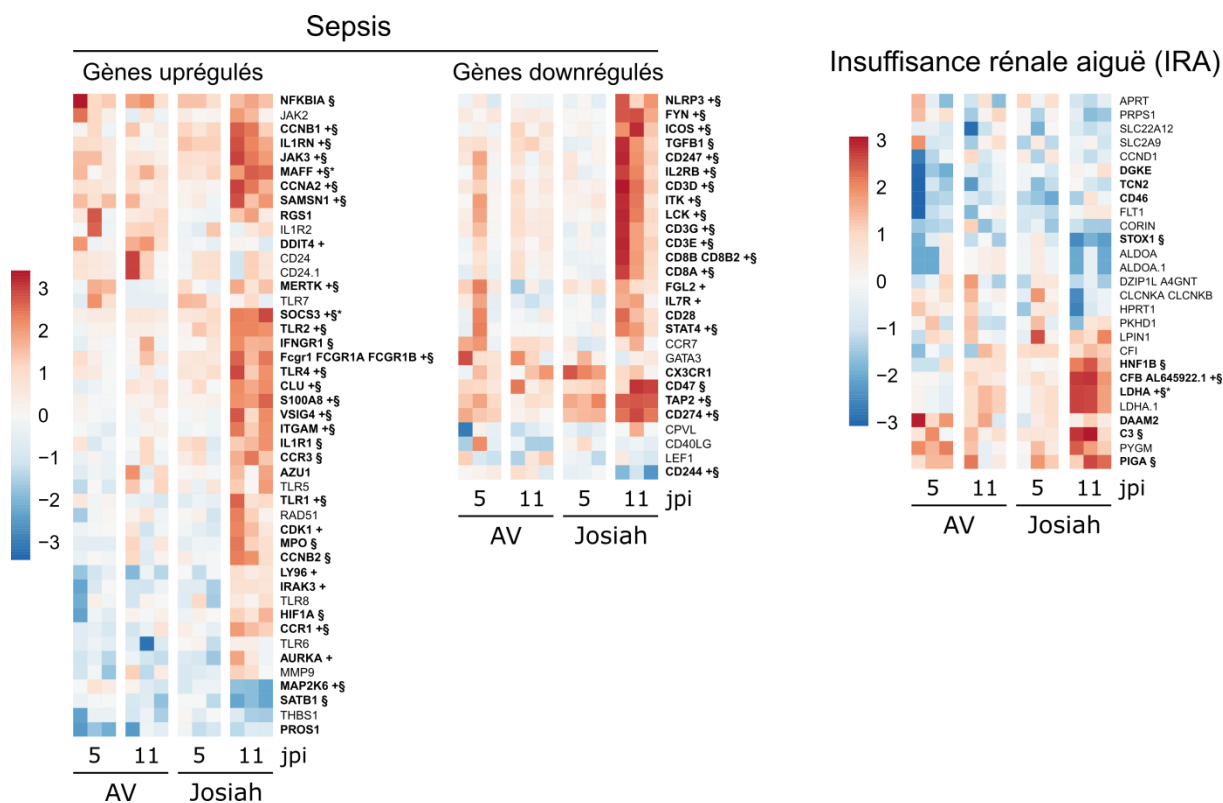


Figure 66. Comportement des gènes montrant une ED comparable à celle mesurée lors du COVID-19. Diagrammes de Venn répartissant les gènes ayant une ED significativement comparable à celle observée lors du COVID-19 (DE+ en haut, DE- en bas) en regard des p-values obtenues dans les différentes comparaisons de chacun d'eux (AV vs Mock, Josiah vs Mock, Josiah vs AV). Les différents comportements observés chez les gènes DE+ sont marqués par des étoiles (\*, \*\* et \*\*\*) et explicités à droite.

Parmi les gènes significativement DE+ dans au moins une des conditions d'infection, on remarque que 60% d'entre eux (58/96) se caractérisent par une ED significativement plus forte chez les singes infectés par LASV Josiah que chez les singes infectés par LASV AV. Ceci traduit un phénotype intermédiaire de la pathologie observée chez les singes survivants, qui montrent des similitudes avec l'infection par SARS-CoV2 mais dans des proportions bien moindre que la pathologie induite par LASV Josiah. Cette observation permet de niveler la sévérité de la pathologie mesurée dans le poumon lors de nos deux conditions d'infection.

### 3.C.ii. La pathologie rénale

Nous nous sommes intéressés à la pathologie rénale avec la même approche vis-à-vis des gènes du sepsis, et nous avons sélectionné une liste de gènes dont l'uprégulation a été associée à l'insuffisance rénale aiguë (IRA) <sup>306</sup>, décrite comme un syndrome majeur associé à la létalité de la FL chez l'humain <sup>169</sup>.



**Figure 67.** Analyse comparative de l'infection par LASV avec le sepsis et l'IRA dans le rein. Niveau d'expression différentiel de groupes de gènes décrits pour être positivement ou négativement régulés lors du sepsis (gauche) et positivement régulés lors de l'insuffisance rénale aiguë (droite), comparativement à l'expression dans les reins des singes Mock. Les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock (non présenté) et normalisées par l'écart-type. Les moyennes de chaque condition (Mock, AV<sub>J5</sub>, AV<sub>J11</sub>, Josiah<sub>J5</sub> et Josiah<sub>J11</sub>) ont été comparées par ANOVA et les gènes en gras présentent une différence statistique au sein d'au moins un des groupes sur les cinq. \* :  $p(\text{AV}_{J11} \text{ vs Mock}) < 0,05$  ; § :  $p(\text{Josiah}_{J11} \text{ vs Mock}) < 0,05$  ; + :  $p(\text{AV}_{J11} \text{ vs Josiah}_{J11}) < 0,05$ .

On observe dans le rein une signature comparative de la FL avec le sepsis qui est très similaire à celle précédemment décrite dans le poumon (cf. [Figure 67](#)). En effet, si les gènes DE+ lors du sepsis le sont majoritairement aussi au pic de la phase aiguë lors de l'infection létale par LASV (23/46), les gènes qui sont décrits comme DE- lors du sepsis sont en revanche essentiellement DE+ lors de la FL létale. De très légères variations d'expression sont observées au cours de la FL non létale, elles ne sont pas significatives et suggèrent à nouveau une pathologie rénale bénigne chez les singes survivants.

Le profil transcriptomique du rein lors de la FL, même létale, est éloigné de celui de l'IRA, pourtant fréquemment décrite chez l'humain. Parmi les rares gènes de cette liste significativement DE+ lors de la FL fatale, on note la présence de deux gènes importants de l'activation du complément : C3 et CFB.

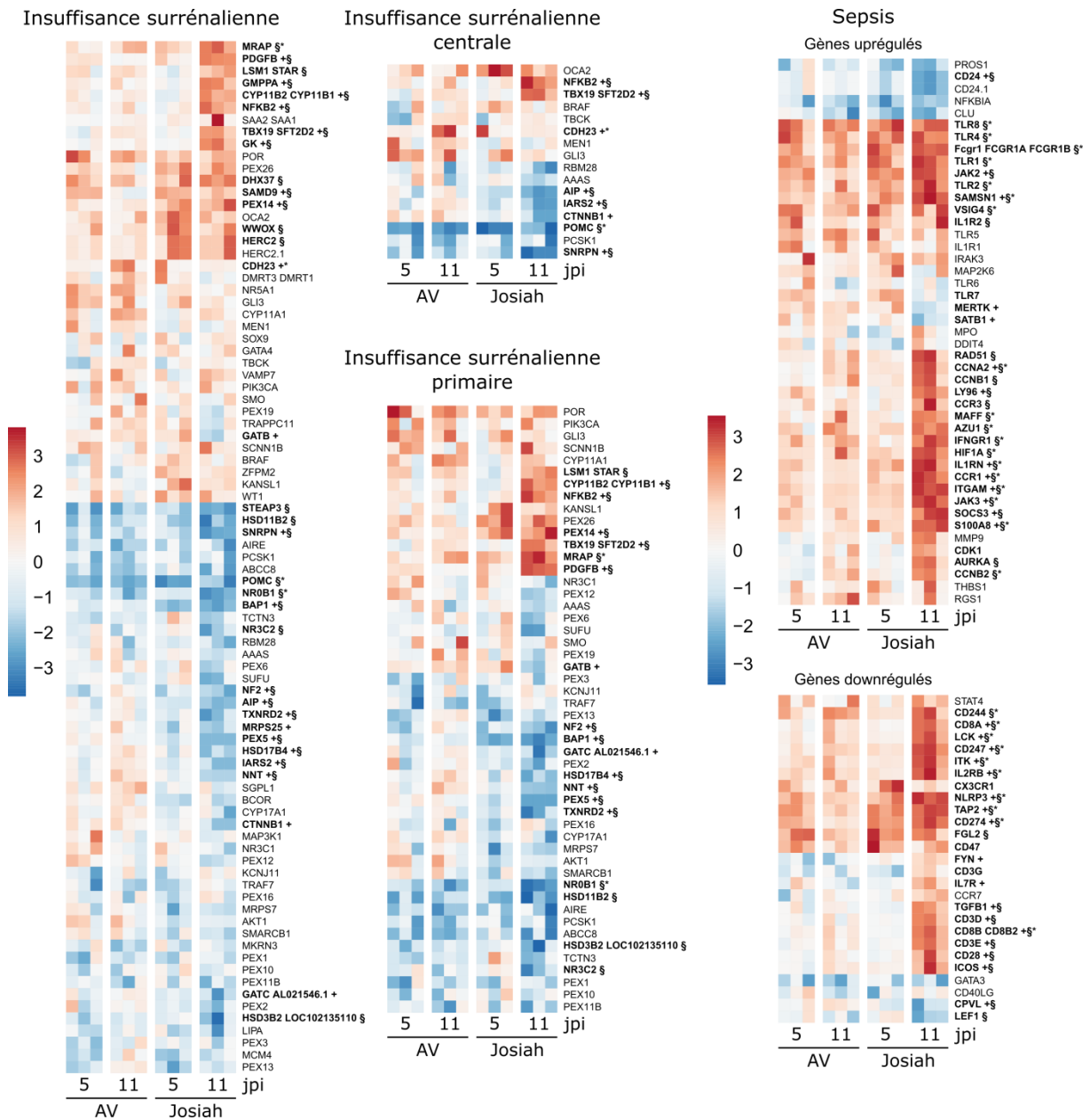
### *3.C.iii. La pathologie surrénalienne*

Le niveau d'infection des glandes surrénales, ainsi que leur rôle central dans le maintien de la tension artérielle, qui est une constante défaillante lors de la FL létale, nous ont amené à vouloir vérifier si la fonction surrénalienne était atteinte lors de l'infection. C'est pourquoi nous avons choisi des listes de gènes dont l'expression est associée à l'insuffisance surrénalienne, qui se manifeste par un déficit de sécrétion d'hormones stéroïdes (essentiellement du cortisol) par les glandes surrénales <sup>307</sup>. Les causes d'une insuffisance surrénalienne peuvent être centrales ou locales (primaires), nous avons donc choisi deux listes de gènes dont l'expression est associée à l'insuffisance surrénalienne centrale causée par un déficit d'ACTH (hormone corticotrope) <sup>308</sup> et à l'insuffisance surrénalienne causée par un dysfonctionnement primaire interne aux glandes surrénales <sup>309</sup>, respectivement. Il n'est cependant pas précisé par l'équipe qui a fourni ces listes de gènes lesquels étaient DE+ et DE- lors de l'insuffisance surrénalienne. Nous avons conservé la comparaison avec les gènes du sepsis également.

Chez les singes infectés par LASV Josiah à 11 jpi, un certain nombre de gènes de la liste de l'insuffisance surrénalienne sont significativement DE (cf. [Figure 68](#)). Parmi les gènes DE+, on identifie des gènes clés de la fonction endocrine des glandes surrénales, dont MRAP qui est impliqué dans la voie de signalisation induite par l'ACTH, et CYP11B1/2 qui est une enzyme centrale pour la biosynthèse des glucocortisol et des minéralocorticoïdes (aldostérone). On identifie aussi des gènes jouant un rôle dans l'immunité antivirale (NFKB2, WWOX, SAMD9) et dans la réparation tissulaire (PDGFB, SAMD9). Parmi les gènes DE- on identifie également plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse des corticoïdes (HSD3B2, POMC) et dans la régulation de leur sécrétion (HSD11B2, NR0B1, NR3C2). Ces régulations d'expression génique ne semble pas toutes aller dans le même sens biologique, nous ne pouvons donc



pas conclure à une insuffisance surrénalienne avec ces simples données, et encore moins à déterminer sa potentielle origine.

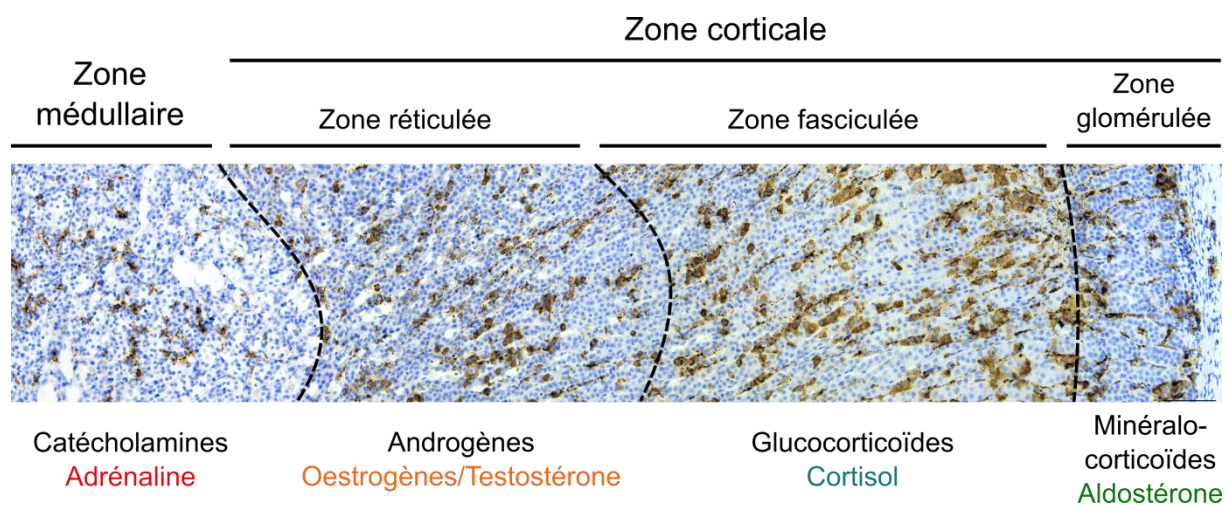


**Figure 68.** Analyse comparative de l'infection par LASV avec l'insuffisance surrénalienne et le sepsis dans les glandes surrénales. Niveau d'expression différentiel de groupes de gènes décrits pour être positivement régulés lors de l'insuffisance surrénalienne globale, centrale ou primaire (gauche) et positivement ou négativement régulés lors du sepsis (droite), comparativement à l'expression dans les glandes surrénales des singes Mock. Les valeurs de chaque gène sont centrées par rapport à la moyenne du groupe Mock (non présenté) et normalisées par l'écart-type. Les moyennes de chaque condition (Mock, AV<sub>J5</sub>, AV<sub>J11</sub>, Josiah<sub>J5</sub> et Josiah<sub>J11</sub>) ont été comparées par ANOVA et les gènes en gras présentent une différence statistique au sein d'au moins un des groupes sur les cinq. \* :  $p(\text{AV}_{J11} \text{ vs Mock}) < 0,05$  ; § :  $p(\text{Josiah}_{J11} \text{ vs Mock}) < 0,05$  ; + :  $p(\text{AV}_{J11} \text{ vs Josiah}_{J11}) < 0,05$ .

Les gènes associés au sepsis montrent quant à eux un profil similaire à ce qui a été observé dans les autres organes, avec la majorité des gènes étant DE+ lors de la FL, indépendamment du fait qu'ils soient DE+ ou DE- lors du sepsis. Parmi les gènes DE+, 26/46 le sont également dans les surrénales des singes infectés par LASV Josiah à 11 jpi.

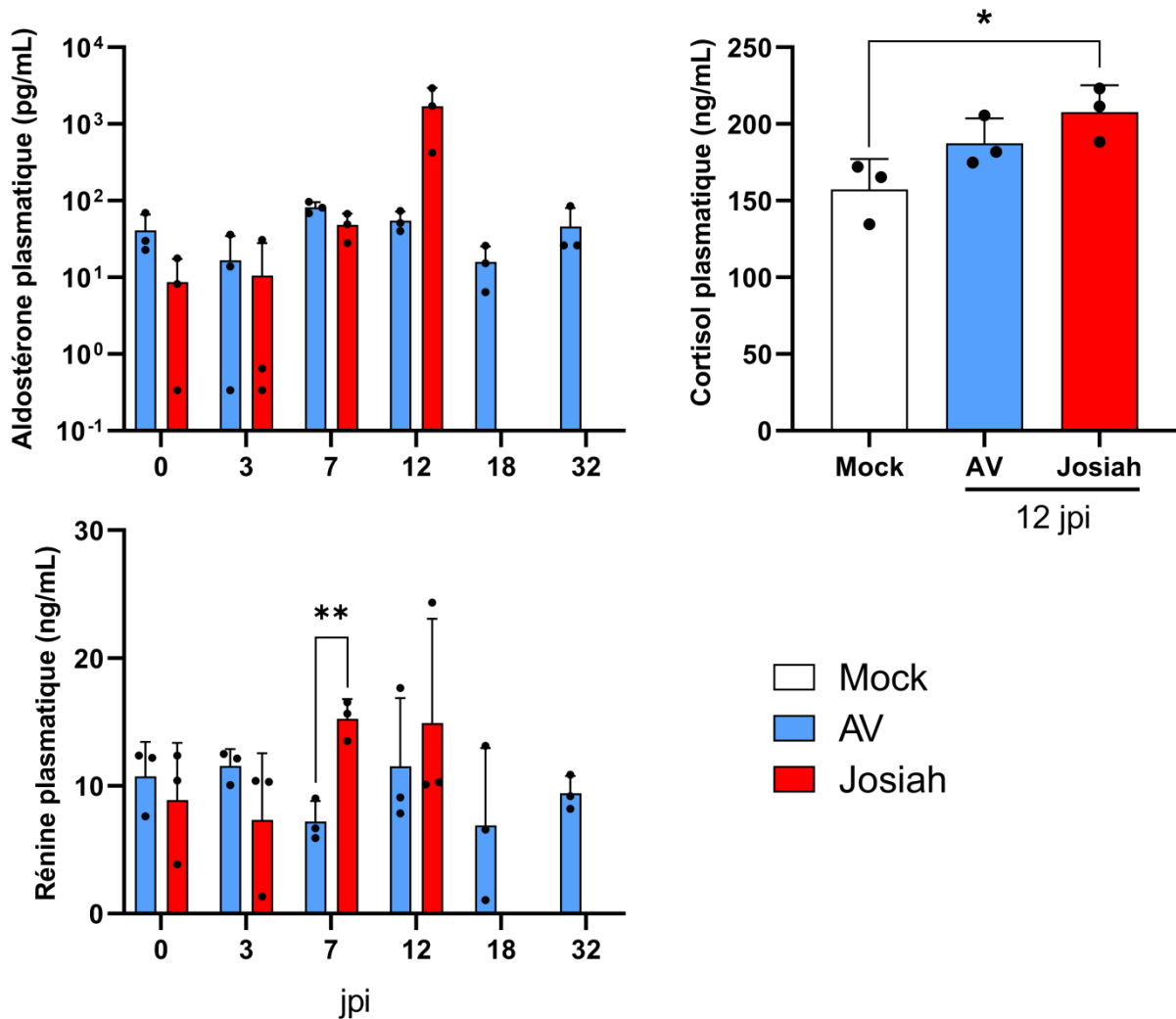
#### *Dosage des hormones corticoïdes*

L'histologie des glandes surrénales ainsi que les différentes zones impliquées dans la sécrétion hormonale sont décrites dans la **Figure 69**. On y remarque aussi la présence de cellules surrénaliennes infectées dans toutes les zones des glandes surrénales.



**Figure 69. Description des zones fonctionnelles de la glande surrénale.** Hybridation *in situ* des ARN viraux de LASV grâce à l'utilisation de sondes spécifiques des séquences de la NP LASV Josiah. Les légendes au-dessus de l'image montrent les couches histologiques de la glande surrénale. Les légendes au-dessous de l'image renseignent sur les familles d'hormones sécrétées par chaque zone et précise le nom des hormones principales (en couleur).

Les résultats de transcriptomique ne permettant pas de conclure sur l'état de la fonction endocrine des glandes surrénales, nous avons également dosé les hormones corticoïdes impliquées dans l'homéostasie (cortisol) et dans la régulation de la tension artérielle (aldostérone) dans le plasma des animaux infectés au cours de la maladie. Par ailleurs, la sécrétion de l'aldostérone est contrôlée par l'axe de régulation rénine-angiotensine-aldostérone. La rénine est sécrétée par les cellules principales du rein en cas d'hypoperfusion, son augmentation a pour conséquence la hausse de la sécrétion d'aldostérone – qui est une hormone hypertensive – par les glandes surrénales. Le dosage de la rénine en parallèle de l'aldostérone permet de vérifier si les variations de sécrétion d'aldostérone sont induites de manière centralisée ou si la fonction de sécrétion est dérégulée depuis la glande elle-même.



**Figure 70. Niveaux plasmatiques d'hormones surrénaliennes et rénales lors de l'infection par LASV.** Dosages plasmatiques des hormones surrénaliennes (en haut) : évolution de l'aldostérone au cours de l'infection (à gauche) et niveaux de cortisol chez les singes contrôles, survivants et décédés au pic de la phase aiguë (à droite). Dosage plasmatique de la rénine au cours de l'infection (en bas). Les valeurs obtenues à 0 jpi proviennent de plasma prélevé avant l'infection, elles représentent donc les valeurs basales de chaque individu. Les valeurs de cortisol ont été comparées par ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Tukey. Pour l'aldostérone et la rénine, les conditions AV et Josiah ont été comparées par test t de Student. L'évolution temporelle au sein de chaque groupe a été vérifiée par ANOVA sur mesures répétées. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ .

On mesure une augmentation significative de la concentration plasmatique de rénine à 7 jpi chez les singes décédés comparé aux singes survivants (cf. [Figure 70](#)). Ce pic de rénine a pour conséquence une très forte augmentation de l'aldostérone plasmatique à 12 jpi chez les singes décédés uniquement. Ces observations témoignent d'une tentative de réaction physiologique induite par l'hypovolémie caractéristique de la FL fatale.

On mesure également une légère – mais significative – augmentation du cortisol plasmatique chez les singes décédés à 12 jpi par rapport aux singes contrôles.

## 1. Cibles virales précoces, dissémination et tropisme tardif

Notre étude a été spécialement organisée pour étudier les temps précoces (2 jpi) et la période d'incubation (5 jpi) de la FL, la majorité des études existantes effectuées sur des singes cynomolgus se limitant aux stades plus tardifs de l'infection <sup>196</sup>. Le modèle actuellement admis identifie les DC et les macrophages/monocytes comme étant les cibles précoces de l'infection par LASV <sup>204,310</sup> dans la muqueuse pulmonaire et qui, migrant dans les OLS, y acheminent par conséquent le virus. Les OLS sont des zones de réplication virale établies qui sont à l'origine de la forte augmentation de la virémie. La phase de dissémination vers les organes non lymphoïdes qui a lieu spécifiquement lors de l'infection létale n'est pour l'instant pas expliquée dans le détail. Bien que l'intensité de la virémie soit considérée comme un marqueur pronostic fort chez l'humain, elle n'est pour autant pas nulle chez environ deux tiers des individus qui survivent à l'infection <sup>237</sup>. C'est également le cas dans notre modèle de FL non létale, au cours de laquelle tous les singes atteignent une virémie plasmatique comprise entre  $10^2$  et  $10^4$  FFU/mL, contre une virémie à  $10^6$  FFU/mL dans le plasma des singes décédés <sup>198,277</sup>. Par conséquent le virus LASV circule aussi dans l'organisme des singes qui ne succombent pas à l'infection, et les tissus de certains organes connus pour être permissifs à l'infection par LASV AV *in vitro* sont naturellement au contact du virus, sans en être infectés.

### 1.A. Cibles précoces de l'infection et colonisation des OLS

Nos résultats semblent tout d'abord confirmer la nature des cellules précocement infectées, puisque la morphologie des cellules infectées présentes dans les OLS et leur localisation dans les zones afférentes dès 2 jpi permet de les classer parmi les cellules présentatrices d'antigènes (DC et macrophages). Il n'est par ailleurs pas surprenant de constater que ces cellules infectées sont plus présentes à 2 jpi dans les GGI des animaux que dans les GGM et qu'elles sont absentes dans la rate. En effet, l'injection sous-cutanée du virus est effectuée dans la cuisse des singes, les GGI sont donc les premiers ganglions drainant la lymphe – et les CPA – provenant des tissus infectés. La présence de foyers infectieux dans la peau à proximité du site d'injection à 2 jpi a pu être confirmée par HIS mais la piètre qualité des prélèvements ne nous a pas permis d'identifier ces cellules, bien qu'elles soient localisées dans le derme. Nous sommes toutefois parvenus à mettre en évidence des foyers d'infection dans l'épiderme avec LASV Josiah mais à un stade beaucoup plus tardif, à 11 jpi (cf. **Annexes**), ce qui confirme des données histologiques obtenues dans le cobaye <sup>189</sup> qui soulignent l'infection de l'épiderme associée à une dermatite tardive (entre 10 et 16 jpi). Nous ne disposons

pas d'anticorps fonctionnel contre les DC (bien que nous ayons essayé plusieurs clones de DC-SIGN, CD11c et CD11b) pour confirmer de manière certaine avec des doubles marquages leur infection, mais l'infection des macrophages/monocytes par les deux souches de LASV a été montrée à partir de 5 jpi dans les OLS. A ce stade de l'infection, encore très précoce, il est intéressant de noter qu'on a observé la présence de LASV AV et LASV Josiah dans les 5 organes lymphoïdes inclus dans notre étude : les GGI, les GGM, la rate, le GALT et le thymus (données manquantes pour AV). Ces organes ont des localisations assez variées dans l'organisme, ce qui permet de montrer la rapidité de la migration des CPA infectées vers les organes lymphoïdes des animaux. Il nous paraît raisonnable d'avancer qu'à 5 jpi, les CPA infectées ont atteint la grande majorité des tissus lymphoïdes de l'organisme des singes, et ce quelle que soit leur distance par rapport au site d'infection. Cette rapide dissémination implique une permissivité très forte des macrophages/monocytes et des DC à l'infection par LASV, puisqu'un pool conséquent de cellules infectées est nécessaire pour répandre le virus dans tous ces organes. Nous avons aussi identifié des neutrophiles positifs pour l'expression de la GP virale de Josiah dans les OLS et dans les poumons, ce qui à notre connaissance n'avait jamais été décrit auparavant. Toutefois, les neutrophiles ont une activité phagocytaire très forte, il est donc possible que la présence de matériel viral dans ces cellules soient en partie causée par la phagocytose d'autres cellules infectées. Enfin, nous avons mis en évidence l'infection des FRC dans les OLS de tous les singes, bien que ce tropisme soit beaucoup plus avancé chez les singes décédés que chez les survivants. Une unique étude avait précédemment montré l'infection des FRC par LASV Josiah chez le singe cynomolgus <sup>311</sup>, et ce tropisme particulier a également été mis en avant dans un modèle d'infection chronique par LCMV <sup>312,313</sup> chez la souris. Cette population cellulaire semble être particulièrement permissive aux virus causant des FHV, puisqu'il a été montré que les FRC sont massivement infectées par les Filovirus (EBOV et MARV) avec un effet cytopathique fort <sup>311,314,315</sup>. A l'inverse, un tel effet cytopathique n'a pas été mis en évidence lors de l'infection par LASV, qui ne s'accompagne pas non plus d'une déstructuration forte des zones lymphoïdes des OLS, contrairement à ce qui a pu être observé avec LCMV. Il est aujourd'hui admis que les FRC sont des actrices majeures de la mise en place de l'immunité adaptative, notamment grâce à leur rôle structural qui permet la zonation fonctionnelle des OLS et les mouvements cellulaires au cœur des follicules <sup>313</sup>, et également grâce à une activité importante de régulation des réponses des diverses cellules hématopoïétiques par la sécrétion de cytokines <sup>316-319</sup>. Une défaillance fonctionnelle de ces cellules peut engendrer une immunosuppression durable, le réseau fibroblastique étant essentiel pour l'adressage des LT, des LB et des DC vers les différentes zones des OLS où la réponse adaptative est initiée grâce à leurs interactions multiples <sup>320</sup>. Les expériences réalisées lors de cette thèse n'ont pas permis d'identifier de phénomène net de disparition des FRC, de déstructuration forte du réseau ou de dérégulation de leur fonction au cours de l'infection létale. Cela est en accord avec les données obtenues chez l'humain, qui

mettent en évidence la présence de foyers nécrotiques avec dépôt de fibrine dans la rate mais sans pour autant décrire une déstructuration forte du réseau <sup>178</sup> comme cela a pu être décrit lors de l'infection chronique et aiguë à LCMV notamment <sup>321</sup>. Cet axe nécessite toutefois d'être investigué plus en profondeur, que ce soit sur des modèles cellulaires de FRC ou bien grâce à des expériences d'HIS visant les ARNm de certaines cytokines spécifiquement sécrétées par les cellules stromales (CCL21, CXCL13).

## 1.B. Dissémination systémique

Comme indiqué précédemment, la question des mécanismes à l'œuvre lors de la dissémination n'est pas encore résolue, bien qu'une forte virémie semble jouer un rôle important dans le pantropisme observé uniquement dans les cas sévères de FL. Cela ne semble cependant pas suffisant pour justifier un modèle de « tout ou rien » qui serait caractérisé par un tropisme généralisé chez les singes décédés et un tropisme cantonné aux OLS chez les singes survivants, puisque des particules infectieuses circulent en quantité non négligeable dans le sang des survivants également ( $10^3$  FFU/mL en moyenne). Nos observations nous ont amené à formuler plusieurs hypothèses pour expliquer la différence de tropisme observée entre LASV AV et LASV Josiah.

### 1.B.i. Hypothèse de dissémination via les monocytes

Nous avons noté que dans le foie à 5 jpi, les premières cellules infectées lors de l'infection létale sont des cellules immunitaires présentes dans des infiltrats inflammatoires. Ces infiltrats contenant des cellules infectées sont également présents – bien que rares – dans le foie et les glandes surrénales des singes survivants à 11 jpi, sans toutefois qu'on y observe d'hépatocytes ou de cellules surrénaliennes atteintes par l'infection. Cela nous a conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle les premières cellules infectées au sein des organes non lymphoïdes seraient des cellules immunitaires – probablement des macrophages/monocytes ou des neutrophiles – infiltrées dans les tissus et préalablement infectés. La présence de monocytes circulants infectés dans les sinus hépatiques des singes survivants vient appuyer cette idée, mais il reste à expliquer pourquoi ils ne pénètrent pas les tissus. Nous avons déjà observé cette tendance dans une autre étude publiée en 2022 s'intéressant à la pathogenèse de deux souches de LASV issues des clades II et VII (baptisées L2 et L7 respectivement). Dans le foie des singes infectés par L2 et L7, des infiltrats inflammatoires contenant des cellules infectées et également de nombreux neutrophiles ont pu être observés, et seul un singe sur les trois infectés par L2 montrait un tropisme fort pour les hépatocytes <sup>322</sup>. Ce phénomène a encore été identifié dans les reins des singes infectés par L2, et une autre étude sur des singes cynomolgus a montré la présence de foci inflammatoires contenant de nombreuses cellules infectées dans le tronc cérébral des animaux <sup>196</sup>.

Cependant, une des interrogations principales soulevées par cette hypothèse est la cause de la diapédèse supposée des monocytes infectés dans les tissus périphériques

alors non infectés. En effet, si on part du postulat que ces cellules infiltrantes sont les premières à être infectées dans le tissu, on peut s'interroger sur la présence et la nature des signaux qui conduisent à leur recrutement dans les organes, en l'absence d'infection virale. On sait que la diapédèse des monocytes est essentiellement induite par la production de CCL2 dans les tissus et est médiée par CCR2<sup>323,324</sup>, or dans tous les organes périphériques où nous avons réalisé des analyses de transcriptome (foie, poumon, rein, glandes surrénales) on observe une augmentation significative de l'expression des gènes associés à CCL2 et CCR2 chez les animaux infectés par LASV Josiah au moment de la phase aiguë. Cette augmentation n'est pas observée chez les singes infectés par LASV AV, à l'exception du tissu pulmonaire. Cependant nous ne détectons pas de différence significative d'expression de ces gènes dans le transcriptome des organes aux temps plus précoces de l'infection (5 jpi). Il est en revanche très intéressant de voir que les gènes codant pour CCL2 et CCL8 (une autre chimiokine spécifique des monocytes) sont surexprimés dans les PBMC des singes infectés par LASV Josiah uniquement à partir de 2 jpi<sup>277</sup>. Cette surexpression s'intensifie chez les singes décédés à 4 jpi, tandis qu'elle apparaît également chez les singes survivants. Une expression normale de ces gènes dans les PBMC est retrouvée à 10 jpi dans les deux conditions d'infection. Le dosage de CCL2 dans les plasmas des singes, réalisé en parallèle par Luminex, montre une augmentation modérée de la quantité de cette cytokine par rapport aux singes Mock (~300 pg/mL contre ~150 pg/mL chez les Mock) dès 4 jpi chez tous les singes infectés, suivie d'une augmentation extrêmement forte qui intervient à partir de 10 jpi chez les singes décédés uniquement (jusqu'à ~3000 pg/mL au moment de la mort). Cette deuxième vague de sécrétion de CCL2 ne peut être imputée aux PBMC, qui ne surexpriment alors plus le gène associé, et il nous paraît aujourd'hui raisonnable d'avancer que ces taux très élevés de CCL2 sont la conséquence de son expression forte dans tous les tissus périphériques atteints par l'infection. Nous ne disposons pas des mesures plasmatiques de CCL8, mais sa dynamique d'expression dans les PBMC et les autres organes investigués est similaire à celle de CCL2. En effet, si l'expression du gène de CCL8 retrouve son niveau basal à 10 jpi dans les PBMC de tous les singes infectés, elle augmente fortement en parallèle dans le foie<sup>198</sup>, les poumons, les reins et les glandes surrénales des singes infectés par LASV Josiah spécifiquement. Cette surexpression est déjà observable à 5 jpi dans ces mêmes organes (à l'exception du poumon, dont les données sont manquantes) chez les singes décédés, tandis qu'on ne la décèle que dans les reins et les surrénales des singes survivants à cette date, de manière transitoire et moins intense. On peut donc supposer que les variations de taux plasmatique de CCL8 suivent de près celles de CCL2, bien que cela n'ait pas été vérifié.

Une des hypothèses consisterait à postuler que la hausse de CCL2 et CCL8 sécrétées par les PBMC dans le plasma permet dans un premier temps un fort recrutement de monocytes dans le sang depuis la moelle osseuse<sup>325</sup> et que ces

monocytes sont ensuite adressés aux tissus périphériques par le signal chimiotactique émis par ces derniers et détecté dans notre étude à partir du point à 5 jpi (CCL8 dans le foie, le rein et les glandes surrénales et CCL2 dans le rein uniquement à cette date)<sup>326</sup>. La mesure du taux de monocytes dans le sang des singes de notre étude a en effet mis en évidence une hausse importante et très précoce du nombre de monocytes chez les singes décédés spécifiquement (~700 / $\mu$ L contre ~400 / $\mu$ L chez les singes Mock et infectés par LASV AV)<sup>198</sup>. La concentration de monocytes circulants baisse drastiquement à partir de 4 jpi chez les singes infectés par LASV Josiah, ce qui pourrait être causé par le déplacement de ce pool de cellules vers les organes périphériques. Cette théorie semble être validée par nos données de déconvolution du transcriptome, qui montrent une augmentation de la proportion des monocytes dans les PBMC des singes infectés à partir de 2 jpi, modérée chez les survivants et forte (significative) chez les décédés, proportion qui se stabilise à la baisse chez tous les singes infectés au-delà de 4 jpi. En parallèle, la déconvolution du transcriptome du foie montre une légère augmentation des macrophages non inflammatoires – qui sont issus de la différenciation de monocytes – dès 5 jpi lors de l’infection létale, une tendance qui continue, s’intensifie et devient inflammatoire au cours de la phase aiguë. L’afflux de monocytes et de cellules dérivées (mDC) est également très significatif dans le poumon des singes infectés par LASV Josiah à 11 jpi (pas de données à 5 jpi). Ces données, également corroborées par les résultats des immunomarquages de CD68 dans les organes systémiques, vont dans le sens d’un changement de compartiment des monocytes intervenant à partir de 4 jpi, du sang vers les organes exprimant CCL2 et CCL8.

Nous n’avons pas vérifié le tropisme de LASV pour les cellules de la moelle osseuse au cours de cette étude, mais celui-ci a été démontré avec la souche Josiah<sup>196</sup> ainsi qu’avec d’autres Arénavirus comme LCMV<sup>327</sup>, ce qui laisse supposer qu’une partie des monocytes en provenance de la moelle osseuse peuvent être déjà atteints par l’infection. Il est également possible qu’ils soient infectés directement dans le sang où la présence du virus est forte, ou bien lors d’un transit via les OLS<sup>212</sup>. En réalisant la diapédèse pour se rendre dans les tissus exprimant les chimiokines adaptées, les monocytes permettraient au virus de traverser la barrière vasculaire et de se retrouver au contact de nouveaux types cellulaires dont certains, comme les hépatocytes, sont très permissifs à l’infection par LASV. Les différences nettes d’expression de CCL2 et CCL8 observées au sein des organes systémiques entre les singes survivants et les singes décédés expliqueraient, au moins partiellement, le contraste fort quant à la dissémination virale dans ces organes.

#### *1.B.ii. Hypothèse de dissémination par perméabilité vasculaire*

L’autre hypothèse crédible expliquant la dissémination du virus au sein de tous les organes non lymphoïdes fait intervenir la perméabilité vasculaire, induite de manière



directe par l'infection généralisée des cellules endothéliales par LASV, ou de manière indirecte par la signalisation cytokinique induite par l'infection systémique. Des taux élevés de TNF $\alpha$  ont notamment été fortement corrélés à la perméabilité vasculaire observée lors de la FHV causée par le virus de la Dengue<sup>328,329</sup>. C'est également le cas pour l'IL2, connue pour induire de la perméabilité vasculaire via l'angiopoïétine 2, lorsque sa concentration plasmatique est élevée<sup>330,331</sup>. Il se trouve que ces deux cytokines sont présentes à haute concentration dans le plasma des singes décédés uniquement, bien que ce signal intervienne tardivement (à partir de 10 jpi). Il a aussi été montré que la perméabilité vasculaire est fortement modulée par le facteur de croissance VEGF<sup>332,333</sup> et la sérine/thréonine kinase AKT1<sup>334,335</sup>, qui participent à la voie de signalisation PI3K/AKT mise en cause dans la perméabilisation de l'endothélium. L'activation de cette voie dans les cellules endothéliales est nécessaire à la diapédèse des monocytes/macrophages et des neutrophiles *in vivo*<sup>336</sup> et à la mise en place de l'inflammation. On précisera que des taux élevés de VEGF ont été mesurés dans le plasma des singes décédés au pic de la phase aiguë<sup>277</sup>. Au cours de notre étude, l'analyse différentielle des transcriptomes des environnements hépatocytaires à 11 jpi a montré une activation de la voie PI3K/AKT et de la signalisation du VEGF significativement plus élevée chez les singes infectés par LASV Josiah que chez ceux infectés par LASV AV. Dans les données de transcriptome obtenue à partir des organes totaux, la voie PI3K/AKT est activée dès 2 jpi dans le foie des singes décédés et on mesure une intensification de cette activation avec la progression de la maladie<sup>198</sup>.

Par ailleurs, l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la perméabilité vasculaire pourrait faciliter la dissémination virale dans les organes cibles et ainsi moduler le tropisme a déjà été soulevée<sup>337</sup>, mais reste cependant au stade de la supposition logique. On notera que lors de notre étude, l'activation de la signalisation du VEGF – corrélable avec la hausse de la perméabilité vasculaire – est apparue plus intense dans l'environnement proche des clusters d'hépatocytes infectés comparé à celui des hépatocytes non infectés des mêmes animaux, ce qui permet de faire un premier rapprochement entre hausse de la perméabilité vasculaire et infection des cellules cibles systémiques adjacentes.

L'infection des cellules endothéliales, observée uniquement dans le cas de l'infection létale dans notre étude, peut également participer à la perte d'intégrité de la barrière vasculaire. Ce phénomène a déjà été démontré pour d'autres virus ayant un tropisme pour les cellules endothéliales, notamment le SARS-CoV2<sup>338,339</sup> et des Hantavirus<sup>340</sup>, via la potentialisation de la voie de signalisation du VEGF pour ces derniers. D'une manière générale, il semble que la hausse de la perméabilité vasculaire induite directement par l'infection concerne essentiellement des virus fortement cytopathiques, qui créent par conséquent des porosités dans l'endothélium, ce qui ne semble pas être le cas pour LASV<sup>212</sup>. La permissivité des cellules endothéliales à l'infection par la souche AV a été démontrée *in vitro* sur un modèle de cellules

primaires – les HUVEC <sup>341</sup> – ce qui amène à s’interroger sur l’absence d’infection *in vivo* par cette souche virale, étant donné que des particules virales infectieuses circulent dans le sang et donc au contact de l’endothélium vasculaire. Cette étude a par ailleurs montré que l’infection des cellules endothéliales par LASV induisait la surexpression rapide de gènes de facteurs impliqués dans la voie de signalisation du VEGF (PIK3R3, PIK3CA, PIK3CD et AKT2) tandis que la synthèse des protéines AKT1 et AKT3 a également pu être mesurée par protéomique. Ces observations suggèrent que l’infection par LASV pourrait potentialiser la voie du VEGF dans les cellules endothéliales et ainsi intensifier la porosité vasculaire.

Pour mesurer les implications relatives des cytokines et de l’infection des cellules endothéliales dans la perméabilité vasculaire, il serait intéressant de recourir à des modèles de monocouches d’endothélium sur insert <sup>342</sup>, et de quantifier la perméabilité induite par le contact avec le plasma des singes décédés ou par l’infection du tissu par LASV.

### *1.B.iii. Bilan sur les mécanismes de dissémination*

La temporalité des phénomènes observés qui nous ont menés à la formulation des hypothèses de dissémination virale détaillées ci-dessus semble indiquer que s’ils agissent probablement de consort, la dissémination via les monocytes intervient nettement plus rapidement lors de l’infection systémique. En effet, l’adressage des monocytes vers les tissus périphériques commence dès 4-5 jpi, tandis que l’infection massive de l’endothélium par LASV Josiah ainsi que la sécrétion très forte de TNF $\alpha$ , d’IL2 et de VEGF ne sont détectées que vers 10-11 jpi. Selon nos observations, la potentielle perméabilité vasculaire induite par l’infection et les cytokines pourrait donc jouer un rôle d’intensification tardive de la dissémination virale dans les organes cibles.

Il reste cependant à comprendre ce qui cause la surexpression rapide des gènes de CCL2 et CCL8 dans les organes périphériques, en l’absence théorique de cellules infectées dans ces tissus. Il est possible que des cellules immunitaires résidentes détectent la présence virale et déclenchent en conséquence les cascades de signalisation menant à la sécrétion localisée de ces cytokines, attirant ainsi les premiers monocytes infectés dans les tissus. L’invasion des tissus par des cellules immunitaires infectées est sans doute à l’origine d’une intensification de la sécrétion de CCL2 et CCL8, ce qui attire encore plus de monocytes, potentiellement infectés, dans les tissus. De fait, ce phénomène semble capable de s’auto-amplifier en l’absence d’autres acteurs du contrôle de la sécrétion de cytokines.

## **1.C. Cibles tardives de l’infection par LASV**

La majorité des cibles cellulaires tardives que nous avons identifiées au cours de notre étude avaient précédemment été décrites chez le singe cynomolgus ou chez

l'humain <sup>178,196,198,322</sup> : cellules présentatrices d'antigènes, hépatocytes, cellules surrénaliennes et cellules endothéliales dans une grande variété d'organes (rein, système nerveux central, poumons, OLS...). Nous avons cependant identifié des cibles dans des organes pas encore décrits lors de la FL :

- **Le thymus** présentait une forte densité de cellules infectées, en particulier dans la zone médullaire, constituée de thymocytes et de nombreuses cellules épithéliales. La nature lymphocytaire des thymocytes ne les rend pas permissifs à l'infection par LASV, mais il est possible que les cellules épithéliales nourricières soient infectées. Des résultats comparables ont été décrits dans le cobaye <sup>189</sup>.
- Des cellules infectées éparses ont été détectées dans **le pancréas**, sans distinction entre les tissus endocrines (îlots de Langerhans) et exocrines (acini pancréatiques). La dispersion et la localisation de ces cellules au cœur du tissu permet de les caractériser comme des cellules endothéliales avec un bon degré de confiance.
- De la même manière que dans le pancréas, des cellules infectées ont été identifiées avec une disposition diffuse dans **le cœur**. Ces cellules sont toujours situées entre les fibres musculaires cardiaques, qui ne sont pas permissives à l'infection, et il s'agit sans doute là aussi de cellules de l'endothélium ou de monocytes, comme caractérisé chez le cobaye <sup>189</sup>.
- Les cellules épithéliales des microvillosités de **l'intestin grêle** ont démontré une forte permissivité à l'infection par LASV Josiah. Ce phénomène nouvellement décrit pourrait avoir une implication forte dans la pathologie de la FL. En effet, si l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale venait à être compromise à cause de l'infection virale, cela pourrait entraîner une invasion du milieu intérieur par le microbiote intestinal, ce qui pourrait être un facteur aggravant du syndrome septique déjà engagé par l'infection virale. Cela a été mis en évidence lors de l'infection létale de PNH par Ebola <sup>343</sup> et par le VIH <sup>344</sup> notamment, et nos résultats indiquent qu'un tel phénomène est envisageable avec LASV. Des expériences plus approfondies doivent être réalisées pour vérifier cette hypothèse et déterminer si une translocation bactérienne au travers de la muqueuse intestinale a bien lieu lors de la FL, à commencer par des colorations de Gram dans les différents tissus.
- L'infection persistante des tubes séminifères dans **les testicules** n'a jusqu'ici été décrite que chez le cobaye <sup>189</sup>, et elle a une implication forte pour la transmission virale entre individus. En effet la localisation de l'infection permet de supposer la présence du virus dans le sperme des animaux survivants, ce qui pourrait permettre une transmission par voie sexuelle. De récents résultats recueillis chez des patients guéris montrent

une persistance de LASV dans le sperme jusqu'à un an post-infection <sup>91</sup>. En revanche, nous n'avons pas identifié de génome viral dans les tissus ovariens, contrairement à ce qui a été observé chez l'humain <sup>178</sup> et le cobaye <sup>189</sup>.

## 2. Réponses immunitaires protectrices et délétères

### 2.A. La réponse T protectrice

L'importance de la réponse T relativement à la réponse B dans le contrôle de l'infection par LASV est établie, et de nombreux indices montrent l'implémentation d'une réponse T mémoire spécifique et robuste chez des patients remis de l'infection par LASV <sup>226,275</sup>, tandis que l'absence de cette réponse se traduit par une pathologie sévère <sup>229</sup>. Notre étude a permis de corrélérer pour la première fois la mise en place de la réponse Th1 avec la survie des animaux de manière dynamique. Nous avons mis en évidence l'existence de LT CD4+ et CD8+ répondant spécifiquement à la présence des antigènes viraux (sous forme de peptides) et apparaissant dans les PBMC à 11/12 jpi. Cette date correspond au moment de la mort des animaux infectés par LASV Josiah et constitue donc un point relativement tardif dans le développement de l'infection par LASV, ce qui laisse supposer que d'autres mécanismes plus précoces contribuent à la survie des animaux infectés par LASV AV. Lors de la première étude sur nos animaux, nous avons identifié une hausse de l'expression de CD69 et de perforine par les LT CD8+ et CD4+ des singes survivants dès 6 jpi, ce qui suggère que la réponse cytotoxique des LT se met en place de manière plus précoce que la réponse Th1 et participe sans doute au contrôle de l'infection <sup>198</sup>.

Dans les OLS, nous ne sommes pas parvenus à mettre en avant la même réponse Th1 que celle observée dans les PBMC, possiblement parce qu'elle est très minoritaire et que le grand nombre de cellules dans ces organes la dilue. Il se pourrait également qu'une fois les cellules activées elles changent rapidement de compartiment et rejoignent la circulation sanguine, où nous les avons détectées. Dans une étude réalisée en 2009 au laboratoire, la mise en contact des splénocytes des singes survivants avec du virus inactivé avait entraîné une forte prolifération des populations CD4+ et CD8+, suggérant une reconnaissance spécifique des épitopes <sup>197</sup>. L'évaluation de l'activation non spécifique des LT dans les OLS des animaux de notre étude n'a en revanche rien donné avant 11 jpi <sup>198</sup>. Un point de temps supplémentaire entre 5 et 11 jpi aurait sans doute été nécessaire pour mieux appréhender les mécanismes à l'œuvre dans les OLS.

Il convient de noter que même si elle est significative, l'activation de la réponse Th1 mesurée à 11/12 jpi dans les PBMC est peu intense. En revanche elle a été identifiée chez 7 singes sur 7 parmi le groupe des survivants, à la fois pour les LT CD4+ et les LT CD8+, ce qui laisse penser que le phénomène décrit est robuste. Il est intéressant de noter qu'aux temps plus tardifs et notamment au point terminal (28-32 jpi), l'activation gagne en intensité et devient nettement observable, que ce soit pour la

sécrétion d'IFN $\gamma$  ou pour l'activation générale des populations de LT CD4+ (CD40L) et de CD8+ (CD137). Ce constat est également vrai pour les populations de LT CD4+ des GGI et de la rate qui répondent à la stimulation peptidique par une hausse de l'expression de CD40L à 28 jpi. Cette réponse intense et tardive laisse penser qu'une réponse T mémoire pourrait être mise en œuvre, comme cela a été identifié chez des animaux vaccinés un an après immunisation <sup>274</sup> et chez des patients rétablis <sup>226</sup>. Pour compléter nos résultats, nous avons essayé de réaliser des expériences de stimulation peptidique centrées sur les réponses Th2 et T<sub>mém</sub> développées par nos animaux, mais nous avons fait face à des problèmes de viabilité cellulaire ne nous permettant pas d'exploiter les résultats. Les résultats de déconvolution du transcriptome des GGM ont par ailleurs permis de mettre en évidence une augmentation de la proportion de LT<sub>mém</sub> CD4+ au repos chez les survivants à 28 jpi.

Il est intéressant de noter que malgré leur position protégée au sein des virions, les épitopes de la NP participent au moins autant que ceux de la GP à l'immunogénicité totale mesurée lors de la réponse Th1, comme cela a pu être observé chez l'humain <sup>227</sup>. Cela souligne l'intérêt fort de faire intervenir la GP et la NP dans les constructions vaccinales, pour obtenir une réponse cellulaire T optimale.

Enfin, les données obtenues grâce à la déconvolution des transcriptomes de PBMC et d'OLS permettent de mettre en évidence une forte diminution de la proportion de LT CD8+ dans les PBMC au cours de la maladie, corélée à une forte augmentation de cette population dans la rate. Etant donné le jeu d'expressions différentielles entre les PBMC et la rate du gène de la chimiokine CXCL9 <sup>198</sup>, impliquée dans l'attraction des LT CD8+, il semble plausible que les populations de LT CD8+ présentes dans les PBMC soient rapatriées dans la rate tôt lors de l'infection. Dans les PBMC, les GGM et la rate, on observe en revanche une forte activation des LT CD4+ à 11 jpi, indépendamment de l'issue de l'infection. Cela pourrait indiquer que l'activation des LT CD4+ chez les singes décédés a bien lieu mais qu'elle est inhibée par d'autres mécanismes immunosuppresseurs, comme l'expression forte de CD279 (PD1) à leur surface <sup>198</sup> peut le laisser penser.

## **2.B. La réponse des cellules NK**

Notre étude a permis de donner des pistes d'investigation sur les cellules NK, en mettant en évidence quelques phénomènes d'intérêt encore non décrits. D'après nos observations, les cellules NK semblent avoir un rôle dual dans la pathologie. En effet, en partant des données de déconvolution du transcriptome, on identifie de manière claire que l'augmentation de la proportion de cellules NK activées dans les PBMC et les OLS est fortement corélée à la survie des animaux, ce qui laisse imaginer un rôle protecteur de l'activité cytotoxique des NK dans ces compartiments.

Au cours d'une récente étude *in silico*, réalisée à partir de près de 5000 transcriptomes de PBMC de patients sains ou atteints d'une des 16 maladies virales concernées par l'analyse (incluant Ebola, chikungunya et SARS-Cov2, ainsi que nombre de virus respiratoires), Zheng *et al.* ont réussi à établir des clusters de gènes fortement associés à la sévérité de la pathologie virale <sup>345</sup>. Leur modèle se veut indépendant de l'infection virale concernée, de l'âge du patient ou même de la zone géographique des cas cliniques. Parmi leurs résultats, ils ont notamment identifié une forte corrélation entre activation des cellules NK et pathologie bénigne, tandis qu'une absence d'activation de ces cellules était un prédicteur fort d'une pathologie virale sévère. Les résultats que nous avons obtenus semblent aller dans le même sens que les leurs.

A contrario, dans les organes non lymphoïdes pour lesquels nous avons fait l'analyse de déconvolution (foie, poumon, rein), la présence plus forte de cellules NK semble être plutôt associée à la FL létale, notamment dans le poumon, où nous avons aussi identifié une augmentation significative de cellules cytotoxiques qui ne sont pas des LT, donc très probablement des cellules NK. De plus, les analyses transcriptomiques dans les organes montrent une forte augmentation de l'expression des gènes associés à la cytotoxicité dans les tissus (granzymes A/B et perforine) des singes décédés. Toutefois, nous ne pouvons pas être sûrs que ces cellules participent à l'inflammation délétère dans les organes systémiques des singes décédés.

En effet, nous avons montré que les cellules NK des animaux infectés par LASV Josiah présentaient de manière significative des marqueurs d'exhaustion (TIM-3) et de dysfonction (CD16+/CD56-). Seule, l'expression de TIM-3 ne permet pas de conclure sur l'activité des NK qui l'expriment, celle-ci pouvant avoir plusieurs fonctions dépendamment du signal qui l'a provoquée <sup>346</sup>. Il apparaît toutefois que dans un contexte pro-inflammatoire, TIM-3 semble être associé au dysfonctionnement des cellules NK <sup>347</sup>. De plus, les populations de cellules NK CD16+ CD56- ont déjà été décrites comme dysfonctionnelles dans d'autres pathologies comme les infections chroniques par HIV <sup>284</sup> et par le virus de l'hépatite B <sup>285</sup> notamment. L'incapacité des cellules à dégranuler et par conséquent à avoir une activité cytotoxique a été observée. Il se pourrait que la dysfonction des NK identifiée chez les singes létalement infectés joue un rôle important dans l'absence de contrôle la virémie caractérisée chez ces animaux.

## 2.C. La réponse des cellules myéloïdes

Nous ne rediscuterons pas la dynamique des monocytes, déjà longuement décrite dans la partie *1.B.i.*

Les états d'activation des macrophages, évalués grâce à la déconvolution du transcriptome des PBMC et des OLS ont montré des variations intéressantes essentiellement dans les PBMC. Nous avons observé une forte augmentation de la

proportion des macrophages de type M2 chez tous les singes infectés, avec un pic à 4 jpi. Les macrophages M2 ont généralement une activité anti-inflammatoire <sup>348</sup> et l'analyse de Zheng *et al.* a permis d'associer leur présence avec une forte sévérité des infections virales <sup>345</sup>. Il est donc plutôt surprenant de les observer si nettement chez les singes infectés par LASV AV, même si leur population diminue fortement à 10 jpi chez ces animaux. Par ailleurs, il a été montré que les macrophages M2 pouvaient dériver de populations de précurseurs immunosuppresseurs, les M-MDSC, et que moyennant le maintien de l'expression de S100A9 dans ces cellules, elles conservaient également une activité immunosuppressive <sup>349</sup>. Or nous avons identifié la très forte surexpression du gène S100A9 dans les ZMS des singes décédés par rapport aux singes survivants, différence qui était également très marquée dans les PBMC des singes à 10 jpi <sup>198</sup>. Cela suggère la possibilité d'une immunosuppression active médiée par les MDSC et leurs cellules dérivées et présente spécifiquement chez les singes infectés par LASV Josiah.

Nous avons également pu noter une augmentation significative des DC activées dans les PBMC des singes survivants à 4 jpi, ce qui peut être mis en relation avec la régulation négative de l'activation des DC par les souches sévères de LASV.

### 3. Caractérisation de la pathologie dans les organes systémiques

#### 3.A. Caractérisation de l'inflammation

Nous avons mêlé deux approches différentes pour déterminer la nature de l'inflammation systémique qui accompagne la FL : les immunomarquages (avec numération) et la déconvolution dans les organes.

Il est apparu que la présence de neutrophiles était accrue dans tous les tissus non lymphoïdes des singes infectés par LASV Josiah où nous l'avons recherchée (poumon, foie, rein, glandes surrénales, cerveau), ainsi que dans les PBMC à 10 jpi et de manière dans la rate à 5 jpi (LASV AV et Josiah). Ces infiltrations neutrophiliques ne sont pas surprenantes étant donné que les neutrophiles sont recrutés aux sites d'infection de manière physiologique <sup>350</sup>, bien qu'elles puissent avoir des effets délétères lors de certaines infections, notamment dans le poumon <sup>351</sup>. Elles permettent toutefois de mettre en évidence la différence forte d'inflammation dans les organes systémiques entre les animaux survivants et décédés.

Si le rein des singes infectés par LASV Josiah ne présente que peu d'infiltrations de cellules immunitaires, ce n'est pas le cas du foie et du poumon, qui présentent tous deux des infiltrations importantes de LT, de monocytes/macrophages et dans une moindre mesure de cellules NK. L'adressage des LT vers les tissus enflammés a notamment été associé à la sévérité de la FL chez l'humain <sup>229</sup>. De manière intéressante, il n'y a pas d'inflammation due aux LB, mais en revanche la quantité de plasmocytes augmente. Spécifiquement dans le tissu pulmonaire, on identifie un afflux de mDC et de plaquettes lors de l'infection létale.

L'état inflammatoire dans les organes (foie, poumon, rein et glandes surrénales) est également mis en évidence par la très forte expression différentielle des ISG, des gènes associés à la réponse des LT et des gènes de cytokines chez les singes décédés, à 11 jpi surtout. Ces observations laissent imaginer un très fort taux de cytokines (pro- et anti-inflammatoires) circulant au cœur des tissus, ce qui peut avoir un impact sur la perméabilité vasculaire, comme discuté plus tôt dans la partie *1.B.ii.* Par ailleurs, tout dans notre étude porte à croire que la tempête cytokinique, caractéristique des FHV en général et discutée dans le cas de la FL, a bien lieu dans le sang <sup>198</sup> et les organes lors de l'infection létale.

Enfin, nous avons mis en évidence l'apparition de nodules microgliaux dans le cerveau des singes infectés par LASV Josiah, un phénomène que nous avons déjà décrit lors de l'infection par les souches L2 et L7 de LASV, et ce même chez le survivant de l'étude <sup>322</sup>. Les nodules microgliaux ont été documentés dans une panoplie d'infections aiguës <sup>352</sup>, chroniques <sup>353</sup> ou de maladies du système nerveux central <sup>354</sup>, et sont aussi associés aux encéphalites <sup>355</sup>. Nous avons par ailleurs identifié des zones d'interaction entre les nodules microgliaux et les LT, alors que les nodules microgliaux ont été identifiés comme des environnements favorables pour l'action pathogène des LT menant à l'encéphalite <sup>356</sup>. Ces structures pourraient donc avoir une importance dans l'apparition des symptômes neurologiques parfois observés lors de l'infection par LASV.

### **3.B. Synthèse des phénomènes pathologiques observés**

Nous avons cherché à caractériser les faisceaux de symptômes observés dans les différents organes en les rapprochant de syndromes connus et bien décrits, à savoir la LPA et le COVID-19 dans le poumon, l'IRA dans le rein et l'insuffisance surrénalienne dans les glandes surrénales. Si l'approche a eu du succès dans le poumon, où nous avons trouvé des similitudes fortes entre la FL létale et la LPA d'une part et la FL létale et le COVID-19 d'autre part, nous n'avons pas pu corrélérer les profils transcriptionnels rénaux et surrénaux avec l'IRA et l'insuffisance surrénalienne. Il apparaît que les pathologies rénales et surrénales ne sont pas si marquées que ça, en tout cas en regard de la dérégulation de la fonction de ces organes.

On assiste à une augmentation de la proportion d'aérocytes (endothélium) dans le poumon des singes infectés par LASV Josiah, possiblement en réponse à la baisse de la diffusion gazeuse engendrée par la régression simultanée de l'épithélium (pneumocytes). L'interface spécialisée aérocytes/pneumocytes est cruciale pour la diffusion gazeuse. Lors du SDRA et de l'œdème pulmonaire, des mécanismes de protection permettent au liquide de s'accumuler dans les régions épaisses, préservant ainsi ces régions fines nécessaires aux échanges <sup>357</sup>, signalant leur importance physiologique. La proximité du syndrome pulmonaire avec celui observé lors de l'infection létale par le SARS-CoV2 laisse supposer qu'une assistance respiratoire pourrait être utile pour les patients présentant un FL très sévère.



Nous avons également comparé les transcriptomes de ces organes au cours de l'infection aiguë avec le profil transcriptionnel du sepsis dans les PBMC. Le bien fondé de cette dernière comparaison peut être questionné, mais nous avons fait l'hypothèse que le profil transcriptionnel observé dans les PBMC lors du sepsis était au moins partiellement conservé dans les autres organes, étant donné le nombre de gènes associés à la réponse immunitaire qu'il comprend. De fait, le profil transcriptionnel des gènes surexprimés dans le poumon, le rein et les glandes surrénales lors de la FL récapitule précisément celui du sepsis, alors que ce n'est pas du tout le cas pour les gènes sous-exprimés. Cela peut signifier que si on a bien affaire à une pathologie très proche du sepsis, d'autres dérégulations pathologiques semblent être à l'œuvre dans les organes de manière concomitante.

L'analyse de déconvolution du transcriptome du foie a permis d'identifier des variations dans les profils transcriptionnels des hépatocytes au cours de l'infection. En effet, nous avons détecté l'apparition des hépatocytes de type 5 dans le foie des animaux infectés à 11 jpi, et dès 5 jpi chez les animaux infectés par LASV Josiah. Il se trouve que le profil transcriptionnel des hépatocytes de type 5 comprend l'activation de la cascade du complément ainsi que l'activation de l'immunité tissulaire <sup>288</sup>. Ce changement transcriptionnel que nous avons observé semble donc être une réponse physiologique à l'infection.

Nous avons également noté la disparition des cellules principales du rein à 11 jpi chez les singes décédés, tandis que leur proportion augmente chez les survivants. Ces cellules sont sensibles à l'aldostérone et stimulent la réabsorption des ions Na<sup>+</sup> en présence de cette hormone. Or nous avons mesuré une hyponatrémie très forte chez les animaux décédés <sup>277</sup>, l'absence de ces cellules pourrait en être une des causes. Par ailleurs nous avons mis en évidence une augmentation de la concentration de rénine plasmatique au cours de l'infection létale. Cette sécrétion (par les péricytes et les cellules juxtaglomérulaires rénales) se fait généralement en réponse à une hypoperfusion/hypotension détectée par les barorécepteurs ou à une hyponatrémie <sup>358</sup>, et a pour conséquence une augmentation de la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales. La forte concentration d'aldostérone que nous avons détectée dans le plasma des singes décédés n'est donc pas le fait d'une dérégulation causée par le fort taux d'infection des glandes surrénales, mais bien la conséquence physiologique de l'hypovolémie et l'hypoperfusion caractéristique du choc terminal hypotensif de la FL.

## 1. Expérimentations animales : infection, suivi biologique et prélèvements

### 1.A. Infection

Les expérimentations animales présentées dans cette étude ont dû être réalisées en trois fois, dû au nombre limité de cages individuelles de l'animalerie A4 du laboratoire P4 Jean Mérieux. Le protocole de ces expériences a été validé par le comité d'éthique sur l'expérimentation animale (CECCAPP, UMS3444/US, Lyon, France). Un total de 28 singes (*Macaca fascicularis*), provenant d'un élevage situé à l'île Maurice et hébergés au centre de primatologie Silabe (Simian Laboratory Europe, Niederhausbergen), ont été nécessaires pour la réalisation de cette étude.

Au jour 0 de l'expérience et après un temps d'acclimatation d'une semaine dans leurs cages, les animaux ont été anesthésiés au Zolétil 100, du sang leur a été prélevé puis ils ont reçu une dose infectieuse de 1000 FFU de LASV (souche AV ou souche Josiah) dilué dans 0,5 mL PBS en injection sous-cutanée dans la cuisse (quadriceps) droite. Les singes Mock ont également reçu une injection de PBS de 0,5 mL sans virus.

### 1.B. Suivi biologique

Quotidiennement, l'état de santé des singes était évalué par des experts animaliers et un score était établi sur la base de plusieurs critères (température, perte de poids, prise de nourriture et d'eau, déshydratation, saignements, pétéchies, difficultés respiratoires, états des selles, réactivité). Le score limite de 15 entraînait automatiquement l'euthanasie de l'animal concerné, selon les règles établies par le comité d'éthique. De plus, un point limite de température corporelle était fixé à 35,3°C, en dessous duquel l'euthanasie était décidée. Dans le cas où les animaux n'atteignaient pas ce score, ils étaient euthanasiés aux jours programmés par le protocole (2, 5 et 11 jpi) ou au point terminal de l'expérience, entre 28 et 32 jpi.

### 1.C. Prélèvements biologiques

#### 1.C.i. Prélèvements lors du suivi

Aux jours 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21 et 24 post-infection, les animaux étaient anesthésiés au Zolétil 100 puis des prélèvements de sang étaient effectués. Chaque jour de prélèvement, le sang des singes dilué au 1/2 en milieu RPMI complet (10% SVF, 1% acides aminés non essentiels, 1% Hepes, 1% pyruvate de sodium, 0,5% Pénicilline/Streptomycine) était centrifugé pendant 40 minutes à 400 G à la surface d'un milieu de séparation des lymphocytes (MSL, Eurobio) dilué à 90% en PBS. Le

plasma (conservé à -80°C) et les anneaux de PBMC ont été récupérés, les cellules ont été culottées (10 min à 1300 RPM) puis resuspendues et incubées en tampon ACK (pour la lyse des globules rouges) pendant 8 min. Après centrifugation, le tampon était éliminé, les cellules lavées en milieu RPMI complet, puis une partie d'entre elles ont été resuspendues en milieu de congélation (90% SVF, 10% DMSO) et immédiatement congelées à -80°C puis conservées à -150°C. L'autre partie des cellules étaient utilisées pour l'extraction d'ARN (RNeasy mini kit, Qiagen) et l'étude transcriptomique des PBMC.

### *1.C.ii. Prélèvements à l'autopsie*

Les animaux étaient euthanasiés par injection intracardiaque de 5 mL de Doléthol puis autopsiés pour le prélèvement de différents échantillons biologiques :

- Le sang des singes, prélevé en intracardiaque, était traité selon les étapes détaillées dans la partie *1.C.i.* pour isoler les PBMC qui étaient ensuite conservées à -150°C.
- Les organes destinés à l'histologie étaient découpés en morceaux de moins d'un cm d'épaisseur, puis immergés pendant 14 jours dans de la formaline 10%, laquelle était renouvelée après 7 jours. Après cette période, les organes étaient sortis du laboratoire P4 et transférés en éthanol 70%.
- Les organes destinés à l'extraction des ARN en vue de générer les transcriptomes étaient entièrement immergés pendant un minimum de 12h dans du RNAlater (Qiagen), qui était ensuite retiré des tubes avant congélation des organes à -80°C jusqu'à extraction.
- Les GGI, GGM et rate étaient broyées à l'aide d'un piston plat dans une boîte de Pétri contenant du milieu RPMI complet. Les broyats étaient ensuite filtrés à l'aide d'un tamis cellulaire 70 µm (Biologix) puis centrifugés et resuspendus en tampon ACK pendant 8 min pour lyser les globules rouges. Après centrifugation, le tampon était éliminé, les cellules lavées en milieu RPMI complet, puis une partie d'entre elles ont été resuspendues en milieu de congélation (90% SVF, 10% DMSO) et immédiatement congelées à -80°C puis conservées à -150°C. L'autre partie des cellules étaient utilisées pour l'extraction d'ARN (RNeasy mini kit, Qiagen) et l'étude transcriptomique des OLS.

## **2. Caractérisation des réponses immunitaires cellulaires**

### **2.A. Stimulation avec les peptides viraux**

Les cellules (PBMC, splénocytes ou cellules de GGI et GGM) étaient décongelées en milieu RPMI complet, lavées à deux reprises et resuspendues dans le même milieu de culture. Après numération en lames de Malassez, 2.000.000 de cellules (dans 1,2 mL de RPMI complet) de chaque animal étaient réparties en quatre puits dans une plaque

*deep-well* avec couvercle respirant et incubées pendant 4 heures à 37°C. Après ce délai, 12 µL d'un mélange contenant de la Bréfeldine A, des anticorps de co-stimulation CD28 et CD49d et un pool de peptides viraux (d'une longueur de 11-13 acides aminés et recouvrant l'intégralité de la séquence de la protéine virale) ou les substances contrôles, ont été ajoutés dans les puits contenant les cellules. Pour chaque animal, un puits était stimulé avec les peptides de la NP (LASV AV ou LASV Josiah respectivement), un avec les peptides de la GP (LASV AV ou LASV Josiah respectivement), un avec de l'entérotoxine A (SEA, Sigma-Aldrich, contrôle positif) et le dernier avec du PBS (contrôle négatif non stimulé). Les cellules étaient ensuite incubées pendant 14h sur la nuit puis immunomarquées pour la cytométrie en flux.

## **2.B. Marquages de cytométrie en flux**

Après stimulation peptidique ou simplement après décongélation et lavage en RPMI complet (expériences sur les LB et les cellules NK), les cellules ont été incubées avec du Live/Dead (Invitrogen) pendant 15 min puis avec les anticorps de surface pendant 30 min sur la glace et à l'obscurité, et transférées en tube de cytométrie pendant l'incubation. Les cellules ont ensuite été lavées avec du tampon de lavage (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% SVF) puis fixées et perméabilisées dans 1 mL de tampon Fix/Perm (FoxP3 staining kit, Miltenyi) pendant 30 min sur la glace et à l'obscurité. Après ajout du tampon de lavage, le Fix/Perm a été éliminé et un second lavage des cellules a été réalisé avec du Wash Buffer (FoxP3 staining kit, Miltenyi). Puis 20 µL de solution de blocage (FcR blocking reagent, Miltenyi) ont été ajoutés dans chaque tube et après une incubation de 5 min, les anticorps ciblant des épitopes intracellulaires ont été ajoutés et les cellules ont été incubées pendant 30 min sur la glace à l'obscurité. Après un dernier lavage en Wash Buffer, les cellules ont été resuspendues dans 150 µL de tampon de fixation (BD Stabilizing Fixative, BD Biosciences) et vortexées en attendant d'être passées au cytomètre en flux. Un cytomètre Gallios (Beckman-Coulter) a été utilisé pour les analyses.

## **3. Histologie**

### **3.A. Préparation des échantillons**

Les échantillons d'organes étaient déshydratés dans des bains successifs d'éthanol (70%, 80%, 90% et 100%) et de xylène avant d'être inclus en paraffine liquide (Leica), grâce à un automate STP120 (Microm-Microtech). Ils étaient ensuite enrobés dans des blocs de paraffine grâce à une station d'enrobage TES99 (Tech-Inter) puis stockés à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à la découpe.

Les coupes d'organes, d'une épaisseur de 3 µm (10 µm pour la MCL), ont été réalisées à partir des blocs grâce à un microtome RM2125 RTS (Leica) puis montées sur des lames SuperFrost Plus (VWR) et séchées à l'air libre à température ambiante (sous vide pour la MCL).

### **3.B. Immunomarquages en multiplex**

Les lames ont été immunomarquées en multiplex de manière automatisée grâce à un BOND-MAX (Leica) en utilisant les réactifs du kit Opal 6-plex Detection Kit (Akoya Biosciences), selon le protocole prévu par le fournisseur. Brièvement, les lames ont reçu un prétraitement en trois étapes : chauffage des lames à 60°C pendant une heure, déparaffinage en BOND Dewax Solution (Leica) et lavages en BOND Wash Solution. Après cela, les lames ont suivi 6 cycles de coloration différents selon la séquence suivante :

- Démasquage 15 min à 98°C en BOND Epitope Retrieval (1 ou 2 selon les prétests réalisés pour chaque anticorps),
- Lavages avec la BOND Wash Solution,
- Incubation 30 min à température ambiante (TA) avec l'anticorps primaire dilué (à une concentration déterminée par des prétests réalisés pour chaque anticorps) en Antibody Diluent/Block (Akoya Biosciences),
- Lavages avec la BOND Wash Solution,
- Incubation 10 min à TA avec l'Opal anti-mouse/rabbit HRP (Akoya Biosciences),
- Lavages avec la BOND Wash Solution,
- Incubation 10 min à TA avec le fluorophore Opal (Opal 520, 540, 570, 620, 650 et 690, Akoya Biosciences) dilué en Plus Automation Amplification Diluent (Akoya Biosciences),
- Lavages avec la BOND Wash Solution.

Après le dernier cycle d'immunodétection, les lames ont été incubées 15 min à TA avec du Spectral DAPI (Akoya Biosciences), puis montées sous lamelles en milieu ImmuMount (ThermoFisher) en dehors de l'automate.

Les lames ont été imagées grâce à une méthode de déconvolution spectrale sur un microscope confocal LSM 980 (Zeiss), et les images ont été traitées grâce au logiciel d'analyse QuPath.

### **3.C. Hybridation *in situ***

Les lames ont été incubées une heure à 60°C dans une étuve sèche, puis déparaffinées grâce à des bains successifs d'éthanol 100% (2 min, x2) et de xylène (2 min, x2) et enfin séchées à l'air ambiant. L'hybridation *in situ* des lames a été réalisée grâce au kit RNAscope 2.5 HD Detection Kit BROWN (ACD Bio). Les lames ont d'abord été incubées pendant 10 min avec quelques gouttes de RNAscope Hydrogen Peroxide (ACD Bio), lavées à l'eau distillée puis démasquées dans la solution de Target Retrieval (ACD Bio) lors d'un cycle dans le Retriever 2100 (Aptum). Après immersion dans un bain d'éthanol 100% et séchage à l'air ambiant, les organes ont été encerclés

grâce à un stylo hydrophobe ImmEdge Pen (Vector Laboratories) et à nouveau séchées à l'air ambiant. Les organes ont ensuite été incubés dans la Protease Plus (ACD Bio) pendant 30 min à 40°C, lavés dans l'eau distillée, puis incubés avec la sonde d'hybridation (recouvrant le segment S de LASV AV ou LASV Josiah) pendant 2 heures à 40°C et enfin lavés au Wash Buffer (ACD Bio). Les lames ont ensuite été incubées avec les différentes solutions d'amplification (ACD Bio) selon la séquence suivante :

- Amp 1, 30 min 40°C,
- Lavage dans le Wash Buffer 2 min à TA,
- Amp 2, 15 min à 40°C,
- Lavage dans le Wash Buffer 2 min à TA,
- Amp 3, 30 min à 40°C,
- Lavage dans le Wash Buffer 2 min à TA,
- Amp 4, 15 min à 40°C,
- Lavage dans le Wash Buffer 2 min à TA,
- Amp 5, 30 min à 40°C,
- Lavage dans le Wash Buffer 2 min à TA,
- Amp 6, 15 min à 40°C,

Le chromophore DAB a ensuite été reconstitué (DAB-A + DAB-B) et 120 µL ont été appliqués sur chaque lame pendant 10 min à TA. Après lavage à l'eau distillée, les organes ont été contre-colorés dans une solution d'hématoxyline de Gill à 50% pendant 2 min à TA, puis lavés à l'eau distillée et immergés dans de l'eau ammoniacquée 0,02% pendant 10 secondes avant un nouveau lavage à l'eau distillée. Enfin, les lames ont été déshydratées dans des bains d'éthanol 100% et de xylène et montées sous lamelle en milieu Eukitt (Sigma).

Les organes ont été imagés à l'aide d'un microscope Leica DMIL équipé d'une caméra DMC6200 (Leica) et du logiciel LASX.

### **3.D. Immunohistochimie pour la MCL et immunofluorescence**

Le traitement des étapes préparatoires pour les lames destinées à la MCL était particulier et nécessitait une grande propreté et beaucoup de précautions expérimentales pour limiter les contaminations. Systématiquement et à chaque étape, tous les outils et surfaces entrant en contact avec les organes étaient au préalable désinfectés à l'éthanol 70% et traités au RNase Away (ThermoFisher) : lame de microtome, aiguilles montées, scalpels, pinces, cuves d'incubation des lames. A la découpe, plusieurs couches de tissu étaient retirées avant de prélever les coupes d'intérêt. De plus, toutes les phases de séchage ou de stockage des lames étaient réalisées sous une cloche à vide plutôt qu'à l'air libre. Les courants d'air été limités au maximum dans la zone de découpe et l'opérateur portait un masque chirurgical.

Les lames ont été déparaffinées grâce à des bains successifs d'éthanol 100% (2 min, x2) et de xylène (2 min, x2), séchées à l'air ambiant, puis elles ont été démasquées dans du tampon citrate (Sigma-Aldrich) lors d'un cycle dans le Retriever 2100 (Aptum). Après lavages à l'eau distillée et au PBS, les organes ont été encerclés avec un stylo hydrophobe ImmEdge Pen (Vector Laboratories) et incubés pendant 30 min à TA dans une solution de PBS-BSA 3% (Sigma-Aldrich) dans une chambre humide. Les organes ont ensuite été mis au contact des anticorps primaires dilués en PBS-BSA 3% et incubés en chambre humide à 4°C sur la nuit, avant d'être lavées à l'eau distillée et au PBS le lendemain. La suite du protocole différait ensuite pour les techniques d'immunohistochimie (3.D.i.) et d'immunofluorescence (3.D.ii.).

### *3.D.i. Immunohistochimie pour la MCL*

Après incubation en peroxyde d'hydrogène 0,3% (Sigma-Aldrich) pendant 20 min à TA et lavages à l'eau et au PBS, les lames ont été incubées dans la N-Histofine anti-mouse/rabbit HRP (Nichirei Biosciences) pendant 30 min en chambre humide à TA et à nouveau lavées à l'eau distillée. Les sections ont ensuite été incubées avec de l'AEC (Sigma-Aldrich) pendant 10 min à TA, lavées à l'eau, déshydratées avec des bains successifs d'éthanol 100% et de xylène, et conservées sous vide jusqu'au transport dans les locaux de ViroScan3D (Faculté de Médecine Lyon Est, 8 avenue Rockefeller, 69003) où la MCL a été réalisée.

### *3.D.ii. Immunofluorescence*

Les lames ont ensuite été incubées dans l'anticorps secondaire anti-mouse/anti-rabbit Alexa 488/555 (ThermoFisher) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> en PBS-BSA 3% pendant 30 min à TA en chambre humide. Après lavage à l'eau distillée, les organes étaient montés sous lamelle en milieu Prolong Diamond contenant du DAPI (ThermoFisher).

## **4. Transcriptomique**

### **4.A. Transcriptomique sur organes totaux**

A la décongélation des organes (foie, poumon, rein, glandes surrénales) qui avaient été traités avec du RNAlater, 21 mg ont été prélevés au scalpel, broyés avec des billes métalliques et inactivés avec 600 µL buffer RLT 1% β-mercaptoéthanol (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). 600 µL d'éthanol 70% étaient ajoutés au mélange avant que les échantillons soient sortis du laboratoire P4. Pour les cellules de GGI et les splénocytes, 10 millions de cellules ont été inactivées selon la même procédure (sans broyage) directement après isolement. Les ARN étaient ensuite extraits sur colonne de silice en suivant le protocole du RNeasy Mini Kit (avec DNase Qiagen), élués dans 50 µL d'eau et conservés à -80°C avant transport en carboglace vers les locaux de ViroScan3D (Faculté de Médecine Lyon Est, 8 avenue Rockefeller, 69003) qui était responsable du séquençage. Le contrôle qualité et le séquençage des ARN a ensuite été

réalisé selon la procédure décrite dans la section Methods > Transcriptomic analysis de l'article publié par Baillet *et al*<sup>198</sup>.

#### **4.B. Microdissection au laser (MCL)**

Juste avant la microdissection, les lames étaient à nouveau déshydratées dans des bains successifs d'éthanol 100% (5 min, x2) et de xylène (5 min, x2) et conservées sous une cloche à vide avant d'être microdisséquées. La MCL a été réalisée à l'aide d'une installation PixCell II (Arcturus Engineering) et de capsules Arcturus CapSure (Macro LCM Caps, Applied Biosystems). Les régions d'intérêt avaient été marquées par immunohistochimie pour faciliter la MCL (CD68 pour la ZMS et GP-LASV pour les hépatocytes), et un minimum de 800 pulses étaient effectués sur chaque capsule par condition d'intérêt. Après vérification au microscope du succès du prélèvement, le matériel microdisséqué était lysé avec du RLT (RNeasy Micro Kit, Qiagen) et les ARN étaient isolés sur colonne de silice, digérés avec de la DNase I et élués dans l'eau selon le protocole du kit RNeasy Micro Kit (Qiagen). Le contrôle qualité et le séquençage des ARN a ensuite été réalisé selon la procédure décrite dans la section Methods > Transcriptomic analysis de l'article publié par Baillet *et al*<sup>198</sup>.

#### **4.C. Analyses des données de transcriptomique**

Les analyses de transcriptomique ont été réalisées par le Hub de Bioinformatique et de Biostatistiques de l'Institut Pasteur.

##### *4.C.i. Transcriptomique sur organes*

Les analyses de transcriptomique sur organes (totaux et MCL) ont été réalisées selon la procédure décrite dans la section Methods > Transcriptomic analysis de l'article publié par Baillet *et al*<sup>198</sup>.

##### *4.C.ii. Déconvolution du transcriptome*

La déconvolution du transcriptome a été réalisée en utilisant le package CIBERSORT sur R, avec la signature LM22 – établie par Newman et al<sup>278</sup> – pour les PBMC, les GGI et les GGM et les signatures issues des études de MacParland et al<sup>288</sup>, Travaglini et al<sup>290</sup> et Stewart et al<sup>292</sup>, respectivement pour le foie, le poumon et le rein.



1. Stenglein, M. D. *et al.* Identification, Characterization, and *In Vitro* Culture of Highly Divergent Arenaviruses from Boa Constrictors and Annulated Tree Boas: Candidate Etiological Agents for Snake Inclusion Body Disease. *mBio* **3**, e00180-12 (2012).
2. Radoshitzky, S. R. *et al.* Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* **160**, 1851–1874 (2015).
3. Hetzel, U. *et al.* Isolation, Identification, and Characterization of Novel Arenaviruses, the Etiological Agents of Boid Inclusion Body Disease. *J. Virol.* **87**, 10918–10935 (2013).
4. Bodewes, R. *et al.* Detection of novel divergent arenaviruses in boid snakes with inclusion body disease in The Netherlands. *J. Gen. Virol.* **94**, 1206–1210 (2013).
5. Hepojoki, J. *et al.* Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease. *J. Virol.* **89**, 8657–8660 (2015).
6. Hepojoki, J. *et al.* Characterization of Haartman Institute snake virus-1 (HISV-1) and HISV-like viruses—The representatives of genus Hartmanivirus, family Arenaviridae. *PLOS Pathog.* **14**, e1007415 (2018).
7. Shi, M. *et al.* The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* **556**, 197–202 (2018).
8. Pontremoli, C., Forni, D. & Sironi, M. Arenavirus genomics: novel insights into viral diversity, origin, and evolution. *Curr. Opin. Virol.* **34**, 18–28 (2019).
9. Current ICTV Taxonomy Release | ICTV. <https://ictv.global/taxonomy>.
10. Gonzalez, J. P., Emonet, S., Lamballerie, X. de & Charrel, R. Arenaviruses. in *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission* (eds. Childs, J. E., Mackenzie, J. S. & Richt, J. A.) vol. 315 253–288 (Springer Berlin Heidelberg, 2007).
11. Gonzalez, J.-P. *et al.* Evolutionary biology of a Lassa virus complex. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **175**, 157–159 (1986).
12. 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**, 301–316 (1997).
13. Stepan, S. J. & Schenk, J. J. Muroid rodent phylogenetics: 900-species tree reveals increasing diversification rates. *PLOS ONE* **12**, e0183070 (2017).
14. Forni, D. *et al.* Ancient Evolution of Mammarenaviruses: Adaptation via Changes in the L Protein and No Evidence for Host–Virus Codivergence. *Genome Biol. Evol.* **10**, 863–874 (2018).
15. Irwin, N. R., Bayerlová, M., Missa, O. & Martínková, N. Complex patterns of host switching in New World arenaviruses: HOST SWITCHING IN NEW WORLD ARENAVIRUSES. *Mol. Ecol.* **21**, 4137–4150 (2012).
16. Grande-Pérez, A., Sierra, S., Castro, M. G., Domingo, E. & Lowenstein, P. R. Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: Systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with

- large increases in mutant spectrum complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12938–12943 (2002).
17. Ellenberg, P., Linero, F. N. & Scolaro, L. A. Superinfection exclusion in BHK-21 cells persistently infected with Junin virus. *J. Gen. Virol.* **88**, 2730–2739 (2007).
  18. Lukashevich, I. S. *et al.* A Live Attenuated Vaccine for Lassa Fever Made by Reassortment of Lassa and Mopeia Viruses. *J. Virol.* **79**, 13934–13942 (2005).
  19. Moshkoff, D. A., Salvato, M. S. & Lukashevich, I. S. Molecular characterization of a reassortant virus derived from Lassa and Mopeia viruses. *Virus Genes* **34**, 169–176 (2007).
  20. Tauraso, N. & Shelokov, A. Protection Against Junin Virus by Immunization with Live Tacaribe Virus. *Exp. Biol. Med.* **119**, 608–611 (1965).
  21. Coto, C. E., Damonte, E. B., Calello, M. A. & Weissenbacher, M. C. Protection of Guinea Pigs Inoculated with Tacaribe Virus against Lethal Doses of Junin Virus. *J. Infect. Dis.* **141**, 389–393 (1980).
  22. Samoilovich, S. R., Calello, M. A., Laguens, R. P. & Weissenbacher, M. C. Long-term protection against Argentine hemorrhagic fever in Tacaribe virus infected marmosets: Virologic and histopathologic findings. *J. Med. Virol.* **24**, 229–236 (1988).
  23. López, N. *et al.* Homologous and heterologous glycoproteins induce protection against Junin virus challenge in guinea pigs. *Microbiology* **81**, 1273–1281 (2000).
  24. 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).
  25. Charrel, R. N., de Lamballerie, X. & Fulhorst, C. F. The Whitewater Arroyo Virus: Natural Evidence for Genetic Recombination among Tacaribe Serocomplex Viruses (Family Arenaviridae). *Virology* **283**, 161–166 (2001).
  26. Archer, A. M. & Rico-Hesse, R. High Genetic Divergence and Recombination in Arenaviruses from the Americas. *Virology* **304**, 274–281 (2002).
  27. Emonet, S., Lemasson, J.-J., Gonzalez, J.-P., de Lamballerie, X. & Charrel, R. N. Phylogeny and evolution of old world arenaviruses. *Virology* **350**, 251–257 (2006).
  28. Palacios, G. *et al.* A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases. *N. Engl. J. Med.* **358**, 991–998 (2008).
  29. Grande-Pérez, A., Martin, V., Moreno, H. & de la Torre, J. C. Arenavirus Quasispecies and Their Biological Implications. in *Quasispecies: From Theory to Experimental Systems* (eds. Domingo, E. & Schuster, P.) vol. 392 231–275 (Springer International Publishing, 2015).
  30. Richmond, J. K. & Baglolle, D. J. Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. **327**, 5 (2003).
  31. Raabe, V. *et al.* Lassa Virus Infection: a Summary for Clinicians. *Int. J. Infect. Dis.* **119**, 187–200 (2022).
  32. Sewlall, N. H. *et al.* Clinical Features and Patient Management of Lujo Hemorrhagic Fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3233 (2014).
  33. Simulundu, E. *et al.* Lujo viral hemorrhagic fever: considering diagnostic capacity and preparedness in the wake of recent Ebola and Zika virus outbreaks: Lujo VHF Diagnosis and Outbreak Preparedness. *Rev. Med. Virol.* **26**, 446–454 (2016).

34. Patterson, M., Grant, A. & Paessler, S. Epidemiology and pathogenesis of Bolivian hemorrhagic fever. *Curr. Opin. Virol.* **5**, 82–90 (2014).
35. de Manzione, N. *et al.* Venezuelan Hemorrhagic Fever: Clinical and Epidemiological Studies of 165 Cases. *Clin. Infect. Dis.* **26**, 308–313 (1998).
36. Silva-Ramos, C. R., Montoya-Ruíz, C., Faccini-Martínez, Á. A. & Rodas, J. D. An updated review and current challenges of Guanarito virus infection, Venezuelan hemorrhagic fever. *Arch. Virol.* **167**, 1727–1738 (2022).
37. Weissenbacher, M. C., Guerrero, L. B. D. & Boxaca, M. C. Experimental biology and pathogenesis of Junin virus infection in animals and man. 9.
38. Enria, D. A., Briggiler, A. M. & Sánchez, Z. Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* **78**, 132–139 (2008).
39. Nastri, A. C. *et al.* Understanding Sabiá virus infections (Brazilian mammarenavirus). *Travel Med. Infect. Dis.* **48**, 102351 (2022).
40. de Mello Malta, F. *et al.* Sabiá Virus-Like Mammarenavirus in Patient with Fatal Hemorrhagic Fever, Brazil, 2020. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 1332–1334 (2020).
41. Delgado, S. *et al.* Chapare Virus, a Newly Discovered Arenavirus Isolated from a Fatal Hemorrhagic Fever Case in Bolivia. *PLoS Pathog.* **4**, e1000047 (2008).
42. Loayza Mafayle, R. *et al.* Chapare Hemorrhagic Fever and Virus Detection in Rodents in Bolivia in 2019. *N. Engl. J. Med.* **386**, 2283–2294 (2022).
43. Fatal Illnesses Associated With a New World Arenavirus --- California, 1999–2000. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4931a1.htm>.
44. Silva-Ramos, C. R., Faccini-Martínez, Á. A., Calixto, O.-J. & Hidalgo, M. Bolivian hemorrhagic fever: A narrative review. *Travel Med. Infect. Dis.* **40**, 102001 (2021).
45. Lassa fever – United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/lassa-fever-united-kingdom-of-great-britain-and-northern-ireland>.
46. Wolf, T., Ellwanger, R., Goetsch, U., Wetzstein, N. & Gottschalk, R. Fifty years of imported Lassa fever: a systematic review of primary and secondary cases. *J. Travel Med.* **27**, taaa035 (2020).
47. Frame, J. D., Baldwin, J. M., Gocke, D. J. & TROUPt, M. Lassa Fever, a New Virus Disease of Man from West Africa: I. Clinical description and pathological findings. 7.
48. Monath, T. P. A short history of Lassa fever: the first 10–15 years after discovery. *Curr. Opin. Virol.* **37**, 77–83 (2019).
49. 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**, 761–763 (1984).
50. Gregg, M. B., Goff, P. A., Monath, T. P., Campbell, C. C. & Fraser, D. W. Lassa Fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970–1972: I. Epidemiologic Studies\*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**, 1131–1139 (1974).
51. Lukashevich, I. S., Clegg, J. C. S. & 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**, 210–217 (1993).
52. Salu, O. B. *et al.* Molecular confirmation and phylogeny of Lassa fever virus in Benin Republic 2014–2016. *Afr. J. Lab. Med.* **8**, (2019).

53. Yadouleton, A. *et al.* Lassa fever in Benin: description of the 2014 and 2016 epidemics and genetic characterization of a new Lassa virus. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 1761–1770 (2020).
54. Atkin, S. *et al.* The first case of Lassa fever imported from Mali to the United Kingdom, February 2009. *Eurosurveillance* **14**, (2009).
55. Sogoba, N. *et al.* Lassa Virus Seroprevalence in Sibirilia Commune, Bougouni District, Southern Mali. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 657–663 (2016).
56. Mateo, M. *et al.* Fatal Case of Lassa Fever, Bangolo District, Côte d’Ivoire, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 4 (2019).
57. Patassi, A. A. *et al.* Emergence of Lassa Fever Disease in Northern Togo: Report of Two Cases in Oti District in 2016. *Case Rep. Infect. Dis.* **2017**, 1–5 (2017).
58. 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**, 78–79 (1985).
59. Klitting, R. *et al.* Predicting the evolution of the Lassa virus endemic area and population at risk over the next decades. *Nat. Commun.* **13**, 5596 (2022).
60. Lassa Fever | CDC. <https://www.cdc.gov/vhf/lassa/index.html>.
61. Nigeria Centre for Disease Control. <https://ncdc.gov.ng/diseases/sitreps/?cat=5&name=An%20update%20of%20Lassa%20fever%20outbreak%20in%20Nigeria>.
62. Lassa Fever Research and Development (R&D) Roadmap. [https://www.who.int/publications/m/item/lassa-fever-research-and-development-\(r-d\)-roadmap](https://www.who.int/publications/m/item/lassa-fever-research-and-development-(r-d)-roadmap).
63. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts. <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>.
64. Lassa fever. [https://www.who.int/health-topics/lassa-fever#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/lassa-fever#tab=tab_1).
65. 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**, 437–444 (1987).
66. Kenmoe, S. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of Lassa virus in humans, rodents and other mammals in sub-Saharan Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14**, e0008589 (2020).
67. Buba, M. I. *et al.* Mortality Among Confirmed Lassa Fever Cases During the 2015–2016 Outbreak in Nigeria. *Am. J. Public Health* **108**, 262–264 (2018).
68. Garry, R. F. Lassa fever — the road ahead. *Nat. Rev. Microbiol.* (2022) doi:10.1038/s41579-022-00789-8.
69. Kernéis, S. *et al.* Prevalence and Risk Factors of Lassa Seropositivity in Inhabitants of the Forest Region of Guinea: A Cross-Sectional Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e548 (2009).
70. Clark, J. *et al.* Domestic risk factors for increased rodent abundance in a Lassa fever endemic region of rural Upper Guinea. *Sci. Rep.* **11**, 20698 (2021).
71. Akhmetzhanov, A. R., Asai, Y. & Nishiura, H. Quantifying the seasonal drivers of transmission for Lassa fever in Nigeria. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **374**, 20180268 (2019).

72. Sylvester Chibueze, I., Kurotimipa Frank, O. & Matthew Chidozie, O. Lassa fever in Nigeria: Social and Ecological Risk Factors Exacerbating Transmission and Sustainable Management Strategies. *Int. J. Trop. Dis.* **5**, (2022).
73. Happi, A. N. *et al.* Increased Prevalence of Lassa Fever Virus-Positive Rodents and Diversity of Infected Species Found during Human Lassa Fever Epidemics in Nigeria. *Microbiol. Spectr.* **10**, e00366-22 (2022).
74. Tobin, E. A., Asogun, D. A., Happi, C. T., Ogbaini, E. & Gunther, S. Risk factors for Lassa fever in endemic communities of Edo State, Nigeria. (2014).
75. Gobir, A. A. *et al.* Knowledge of Lassa Fever Disease and Its Risk Factors Among Rural People in a Nigerian Community. in *The 5th African Conference on Emerging Infectious Diseases* 9 (MDPI, 2020). doi:10.3390/proceedings2020045009.
76. Lalis, A. & Wirth, T. Mice and Men: an Evolutionary History of Lassa Fever. in *Biodiversity and Evolution* 189–212 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-1-78548-277-9.50011-5.
77. Olayemi, A. *et al.* New Hosts of The Lassa Virus. *Sci. Rep.* **6**, 25280 (2016).
78. Agbonlahor, D. E. *et al.* Prevalence of Lassa virus among rodents trapped in three South-South States of Nigeria. *J Vector Borne Dis* **5** (2017).
79. Olayemi, A. *et al.* Widespread arenavirus occurrence and seroprevalence in small mammals, Nigeria. *Parasit. Vectors* **11**, 416 (2018).
80. Fichet-Calvet, E., Becker-Ziaja, B., Koivogui, L. & Günther, S. Lassa Serology in Natural Populations of Rodents and Horizontal Transmission. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **14**, 665–674 (2014).
81. Mylne, A. Q. N. *et al.* Mapping the zoonotic niche of Lassa fever in Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **109**, 483–492 (2015).
82. 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).
83. Safronetz, D. *et al.* Temporal analysis of Lassa virus infection and transmission in experimentally infected *Mastomys natalensis*. *PNAS Nexus* **1**, pgac114 (2022).
84. Hoffmann, C. *et al.* Arenavirus persistence in the multimammate rat, *Mastomys natalensis*. (2022).
85. Wozniak, D. M. *et al.* Inoculation route-dependent Lassa virus dissemination and shedding dynamics in the natural reservoir – *Mastomys natalensis*. *Emerg. Microbes Infect.* **10**, 2313–2325 (2021).
86. Fichet-Calvet, E. *et al.* Fluctuation of Abundance and Lassa Virus Prevalence in *Mastomys natalensis* in Guinea, West Africa. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **7**, 119–128 (2007).
87. Wood, R., Bangura, U., Mariën, J., Douno, M. & Fichet-Calvet, E. Detection of Lassa virus in wild rodent feces: Implications for Lassa fever burden within households in the endemic region of Faranah, Guinea. *One Health* **13**, 100317 (2021).
88. 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).
89. Pinneo, L. *et al.* A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March-April 1972. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **22**, 773–779 (1973).

90. Fisher-Hoch, S. P. *et al.* Review of cases of nosocomial Lassa fever in Nigeria: the high price of poor medical practice. *BMJ* **311**, 857–859 (1995).
91. Thielebein, A. *et al.* Virus persistence after recovery from acute Lassa fever in Nigeria: a 2-year interim analysis of a prospective longitudinal cohort study. *Lancet Microbe* **3**, e32–e40 (2022).
92. Kafetzopoulou, L. E. *et al.* Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science* **363**, 74–77 (2019).
93. 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).
94. Abidemi, A., Owolabi, K. M. & Pindza, E. Modelling the transmission dynamics of Lassa fever with nonlinear incidence rate and vertical transmission. *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* **597**, 127259 (2022).
95. 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).
96. Bowen, M. D. *et al.* Genetic Diversity among Lassa Virus Strains. *J. Virol.* **74**, 6992–7004 (2000).
97. Manning, J. T., Forrester, N. & Paessler, S. Lassa virus isolates from Mali and the Ivory Coast represent an emerging fifth lineage. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
98. Gunther, S. Imported Lassa Fever in Germany: Molecular Characterization of a New Lassa Virus Strain. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 466–476 (2000).
99. Whitmer, S. L. M. *et al.* New Lineage of Lassa Virus, Togo, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 599–602 (2018).
100. Leung, W.-C. & Rawls, W. E. Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus. *Virology* **81**, 174–176 (1977).
101. Arenaviridae. in *Fenner's Veterinary Virology* 425–434 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-800946-8.00023-4.
102. Lukashevich, I. S., Stelmakh, T. A., Golubev, V. P., Stchesljenok, E. P. & Lemeshko, N. N. Ribonucleic acids of Machupo and Lassa viruses. 15 (1984).
103. Auperin, D. D., Sasso, D. R. & McCormick, J. B. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genome RNA. *Virology* **154**, 155–167 (1986).
104. Iwasaki, M., Cubitt, B., Sullivan, B. M. & de la Torre, J. C. The High Degree of Sequence Plasticity of the Arenavirus Noncoding Intergenic Region (IGR) Enables the Use of a Nonviral Universal Synthetic IGR To Attenuate Arenaviruses. *J. Virol.* **90**, 3187–3197 (2016).
105. Pinschewer, D. D., Perez, M. & de la Torre, J. C. Dual Role of the Lymphocytic Choriomeningitis Virus Intergenic Region in Transcription Termination and Virus Propagation. *J. Virol.* **79**, 4519–4526 (2005).
106. Martínez-Sobrido, L. & de la Torre, J. Reporter-Expressing, Replicating-Competent Recombinant Arenaviruses. *Viruses* **8**, 197 (2016).
107. 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**, 38748–38756 (2011).

108. Vezza, A. C., Gard, G. P., Compans, R. W. & Bishop, D. H. Structural components of the arenavirus Pichinde. *J. Virol.* **23**, 776–786 (1977).
109. 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**, 185–198 (1992).
110. Nilsson-Payant, B. E. *et al.* Reduced Nucleoprotein Availability Impairs Negative-Sense RNA Virus Replication and Promotes Host Recognition. *J. Virol.* **95**, e02274-20 (2021).
111. Qi, X. *et al.* Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* **468**, 779–783 (2010).
112. Hastie, K. M., Kimberlin, C. R., Zandonatti, M. A., MacRae, I. J. & Saphire, E. O. Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2396–2401 (2011).
113. Jiang, X. *et al.* Structures of Arenaviral Nucleoproteins with Triphosphate dsRNA Reveal a Unique Mechanism of Immune Suppression. *J. Biol. Chem.* **288**, 16949–16959 (2013).
114. Carnec, X. *et al.* Lassa Virus Nucleoprotein Mutants Generated by Reverse Genetics Induce a Robust Type I Interferon Response in Human Dendritic Cells and Macrophages. *J. Virol.* **85**, 12093–12097 (2011).
115. 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**, 13923–13927 (2014).
116. Yekwa, E. *et al.* Arenaviridae *exoribonuclease presents genomic RNA edition capacity*. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/541698> (2019) doi:10.1101/541698.
117. 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.* **108**, 19365–19370 (2011).
118. Knopp, K. A., Ngo, T., Gershon, P. D. & Buchmeier, M. J. Single Nucleoprotein Residue Modulates Arenavirus Replication Complex Formation. *mBio* **6**, e00524-15 (2015).
119. Katz, M. *et al.* Structure and receptor recognition by the Lassa virus spike complex. *Nature* **603**, 174–179 (2022).
120. Hastie, K. M. & Saphire, E. O. Lassa virus glycoprotein: stopping a moving target. *Curr. Opin. Virol.* **31**, 52–58 (2018).
121. Eichler, R., Lenz, O., Strecker, T. & Garten, W. Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length. *FEBS Lett.* **538**, 203–206 (2003).
122. Cohen-Dvashi, H., Cohen, N., Israeli, H. & Diskin, R. Molecular Mechanism for LAMP1 Recognition by Lassa Virus. *J. Virol.* **89**, 7584–7592 (2015).
123. Li, S. *et al.* Acidic pH-Induced Conformations and LAMP1 Binding of the Lassa Virus Glycoprotein Spike. *PLOS Pathog.* **12**, e1005418 (2016).
124. Eschli, B. *et al.* Identification of an N-Terminal Trimeric Coiled-Coil Core within Arenavirus Glycoprotein 2 Permits Assignment to Class I Viral Fusion Proteins. *J. Virol.* **80**, 5897–5907 (2006).
125. Abraham, J., Corbett, K. D., Farzan, M., Choe, H. & Harrison, S. C. Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 438–444 (2010).

126. Smelt, S. C. *et al.* Differences in Affinity of Binding of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Strains to the Cellular Receptor  $\alpha$ -Dystroglycan Correlate with Viral Tropism and Disease Kinetics. *J. Virol.* **75**, 448–457 (2001).
127. Cao, W. *et al.* Identification of  $\alpha$ -Dystroglycan as a Receptor for Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Lassa Fever Virus. *Science* **282**, 2079–2081 (1998).
128. Rojek, J. M., Spiropoulou, C. F., Campbell, K. P. & Kunz, S. Old World and Clade C New World Arenaviruses Mimic the Molecular Mechanism of Receptor Recognition Used by  $\alpha$ -Dystroglycan's Host-Derived Ligands. *J. Virol.* **81**, 5685–5695 (2007).
129. Watanabe, Y. *et al.* Structure of the Lassa virus glycan shield provides a model for immunological resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 7320–7325 (2018).
130. Sommerstein, R. *et al.* Arenavirus Glycan Shield Promotes Neutralizing Antibody Evasion and Protracted Infection. *PLoS Pathog.* **11**, e1005276 (2015).
131. Hass, M., Gölnitz, U., Müller, S., Becker-Ziaja, B. & Günther, S. Replicon System for Lassa Virus. *J. Virol.* **78**, 13793–13803 (2004).
132. Brunotte, L. *et al.* Domain Structure of Lassa Virus L Protein. *J. Virol.* **85**, 324–333 (2011).
133. Peng, R. *et al.* Structural insight into arenavirus replication machinery. *Nature* **579**, 615–619 (2020).
134. 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).
135. Lehmann, M. *et al.* Role of the C Terminus of Lassa Virus L Protein in Viral mRNA Synthesis. *J. Virol.* **88**, 8713–8717 (2014).
136. te Velthuis, A. J. W. Common and unique features of viral RNA-dependent polymerases. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4403–4420 (2014).
137. Xu, X. *et al.* Cryo-EM structures of Lassa and Machupo virus polymerases complexed with cognate regulatory Z proteins identify targets for antivirals. *Nat. Microbiol.* **6**, 921–931 (2021).
138. Fehling, S., Lennartz, F. & Strecker, T. Multifunctional Nature of the Arenavirus RING Finger Protein Z. *Viruses* **4**, 2973–3011 (2012).
139. 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**, 3631–3641 (2011).
140. Capul, A. A. *et al.* Arenavirus Z-Glycoprotein Association Requires Z Myristoylation but Not Functional RING or Late Domains. *J. Virol.* **81**, 9451–9460 (2007).
141. Iwasaki, M. & de la Torre, J. C. A Highly Conserved Leucine in Mammarenavirus Matrix Z Protein Is Required for Z Interaction with the Virus L Polymerase and Z Stability in Cells Harboring an Active Viral Ribonucleoprotein. *J. Virol.* **92**, e02256-17 (2018).
142. Strecker, T. *et al.* The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *J. Virol.* **3**, 93 (2006).
143. Strecker, T. *et al.* Lassa Virus Z Protein Is a Matrix Protein Sufficient for the Release of Virus-Like Particles. *J. Virol.* **77**, 10700–10705 (2003).
144. Hastie, K. M. *et al.* Crystal Structure of the Oligomeric Form of Lassa Virus Matrix Protein Z. *J. Virol.* **90**, 4556–4562 (2016).



145. Campbell Dwyer, E. J., Lai, H., MacDonald, R. C., Salvato, M. S. & Borden, K. L. B. 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**, 3293–3300 (2000).
146. 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 1 1Edited by D. Draper. *J. Mol. Biol.* **312**, 609–623 (2001).
147. Volpon, L., Osborne, M. J., Capul, A. A., de la Torre, J. C. & Borden, K. L. B. Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 5441–5446 (2010).
148. Imperiali, M., Spörri, R., Hewitt, J. & Oxenius, A. Post-translational modification of  $\alpha$ -dystroglycan is not critical for lymphocytic choriomeningitis virus receptor function in vivo. *J. Gen. Virol.* **89**, 2713–2722 (2008).
149. Shimojima, M., Ströher, 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).
150. Fedeli, C. *et al.* Axl Can Serve as Entry Factor for Lassa Virus Depending on the Functional Glycosylation of Dystroglycan. *J. Virol.* **92**, e01613-17 (2018).
151. Rojek, J. M. *et al.* Binding of Lassa virus perturbs extracellular matrix-induced signal transduction via dystroglycan: LASV binding perturbs receptor signalling. *Cell. Microbiol.* **14**, 1122–1134 (2012).
152. Imperiali, M. *et al.* O Mannosylation of  $\alpha$ -Dystroglycan Is Essential for Lymphocytic Choriomeningitis Virus Receptor Function. *J. Virol.* **79**, 14297–14308 (2005).
153. Hara, Y. *et al.* Like-acetylglucosaminyltransferase (LARGE)-dependent modification of dystroglycan at Thr-317/319 is required for laminin binding and arenavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17426–17431 (2011).
154. Kunz, S. *et al.* Posttranslational Modification of  $\alpha$ -Dystroglycan, the Cellular Receptor for Arenaviruses, by the Glycosyltransferase LARGE Is Critical for Virus Binding. *J. VIROL* **79**, 15 (2005).
155. Andersen, K. G. *et al.* Genome-wide scans provide evidence for positive selection of genes implicated in Lassa fever. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **367**, 868–877 (2012).
156. 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).
157. McLay, L., Liang, Y. & Ly, H. Comparative analysis of disease pathogenesis and molecular mechanisms of New World and Old World arenavirus infections. *J. Gen. Virol.* **95**, 1–15 (2014).
158. Jae, L. T. *et al.* Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch. *Science* **344**, 1506–1510 (2014).
159. Hulseberg, C. E., Fénéant, L., Szymańska, K. M. & White, J. M. Lamp1 Increases the Efficiency of Lassa Virus Infection by Promoting Fusion in Less Acidic Endosomal Compartments. *mBio* **9**, e01818-17 (2018).
160. Raaben, M. *et al.* NRP2 and CD63 Are Host Factors for Lujo Virus Cell Entry. *Cell Host Microbe* **22**, 688-696.e5 (2017).

161. Radoshitzky, S. R. *et al.* Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* **446**, 92–96 (2007).
162. Martinez, M. G., Cordo, S. M. & Candurra, N. A. Characterization of Junín arenavirus cell entry. *J. Gen. Virol.* **88**, 1776–1784 (2007).
163. Klitting, R. *et al.* Lassa Virus Genetics. in (Springer Berlin Heidelberg, 2020). doi:10.1007/82\_2020\_212.
164. Hass, M. *et al.* Mutational Analysis of the Lassa Virus Promoter. *J. Virol.* **80**, 12414–12419 (2006).
165. Burri, D. J. *et al.* Molecular Characterization of the Processing of Arenavirus Envelope Glycoprotein Precursors by Subtilisin Kexin Isozyme-1/Site-1 Protease. *J. Virol.* **86**, 4935–4946 (2012).
166. Klaus, J. P. *et al.* The Intracellular Cargo Receptor ERGIC-53 Is Required for the Production of Infectious Arenavirus, Coronavirus, and Filovirus Particles. *Cell Host Microbe* **14**, 522–534 (2013).
167. Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H. & Yasuda, J. Cellular Factors Required for Lassa Virus Budding. *J. Virol.* **80**, 4191–4195 (2006).
168. McCormick, J. B. *et al.* A Case-Control Study of the Clinical Diagnosis and Course of Lassa Fever. *J. Infect. Dis.* **155**, 445–455 (1987).
169. 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.* **18**, 684–695 (2018).
170. McCormick, B. & Samba, J. A. Acute Sensorineural Deafness in Lassa Fever. 4.
171. Fisher-Hoch, S. P., McCormick, J. B., Sasso, D. & Craven, R. B. Hematologic dysfunction in Lassa fever. *J. Med. Virol.* **26**, 127–135 (1988).
172. Kayem, N. D. *et al.* Lassa fever in pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **114**, 385–396 (2020).
173. Walker, D. H. *et al.* Pathologic and Virologic Study of Fatal Lassa Fever in Man. **107**, 8 (1982).
174. Duvignaud, A. *et al.* Lassa fever outcomes and prognostic factors in Nigeria (LASCOPE): a prospective cohort study. *Lancet Glob. Health* **9**, e469–e478 (2021).
175. Edington, G. M. & White, H. A. The pathology of lassa fever. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**, 381–389 (1972).
176. Winn, W. C. & Walker, D. H. The pathology of human Lassa fever. *Bull. World Health Organ.* **11** (1975).
177. Johnson, K. M. *et al.* Lassa Virus Hepatitis: a Study of Fatal Lassa Fever in Humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 401–407 (1986).
178. Shieh, W.-J. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Lassa Fever: Novel Immunohistochemical Findings in Fatal Cases and Clinico-pathologic Correlation. *Clin. Infect. Dis.* **74**, 1821–1830 (2022).
179. 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**, 934–938 (2016).
180. Yun, N. E. *et al.* Functional Interferon System Is Required for Clearance of Lassa Virus. *J. Virol.* **86**, 3389–3392 (2012).

181. 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).
182. Oestereich, L. *et al.* Chimeric Mice with Competent Hematopoietic Immunity Reproduce Key Features of Severe Lassa Fever. *PLOS Pathog.* **12**, e1005656 (2016).
183. Yun, N. E. *et al.* Mice Lacking Functional STAT1 Are Highly Susceptible to Lethal Infection with Lassa Virus. *J. Virol.* **87**, 10908–10911 (2013).
184. Yun, N. E. *et al.* Animal Model of Sensorineural Hearing Loss Associated with Lassa Virus Infection. *J. Virol.* **90**, 2920–2927 (2016).
185. Flatz, L. *et al.* T Cell-Dependence of Lassa Fever Pathogenesis. *PLoS Pathog.* **6**, e1000836 (2010).
186. Jahrling, P. B., Smith, S., Hesse, R. A. & Rhoderick, J. B. Pathogenesis of Lassa virus infection in guinea pigs. *Infect. Immun.* **37**, 771–778 (1982).
187. Cashman, K. A. *et al.* Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model. *Antiviral Res.* **90**, 70–79 (2011).
188. Walker, D. H., Wulff, H., Lange, J. V. & Murphy, F. A. Comparative pathology of Lassa virus infection in monkeys, guinea-pigs, and *Mastomys natalensis*. 12.
189. Bell, T. M. *et al.* Temporal Progression of Lesions in Guinea Pigs Infected With Lassa Virus. *Vet. Pathol.* **54**, 549–562 (2017).
190. Gary, J. M. *et al.* Lassa Virus Targeting of Anterior Uvea and Endothelium of Cornea and Conjunctiva in Eye of Guinea Pig Model. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 865–874 (2019).
191. Carrion, R. *et al.* Lassa Virus Infection in Experimentally Infected Marmosets: Liver Pathology and Immunophenotypic Alterations in Target Tissues. *J. Virol.* **81**, 6482–6490 (2007).
192. Walker, D. H., Wulff, H. & Murphy, F. A. Experimental Lassa Virus Infection in the Squirrel Monkey. **80**, 18 (1975).
193. Evseev, A. A., Dvoretzkaia, V. I., Bogatikov, G. V., Pshenichnov, V. A. & Mustafin, R. M. Experimental Lassa fever in hamadryas baboons. *Vopr. Virusol.* **36**, 150–152 (1991).
194. Peters, C. J. *et al.* Experimental Studies of Arenaviral Hemorrhagic Fevers. in *Arenaviruses* (ed. Oldstone, M. B. A.) vol. 134 5–68 (Springer Berlin Heidelberg, 1987).
195. DePaoli, A., Callis, R. T. & Jahrling, P. B. Pathology of Lassa Virus Infection in the Rhesus Monkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 1038–1045 (1982).
196. Hensley, L. E. *et al.* Pathogenesis of lassa fever in cynomolgus macaques. *Virol. J.* **8**, 205 (2011).
197. 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**, 5890–5903 (2009).
198. Baillet, N. *et al.* Systemic viral spreading and defective host responses are associated with fatal Lassa fever in macaques. *Commun. Biol.* **4**, 27 (2021).
199. Cross, R. W. *et al.* A recombinant VSV-vectored vaccine rapidly protects nonhuman primates against heterologous lethal Lassa fever. *Cell Rep.* **40**, 111094 (2022).
200. Mateo, M. *et al.* Vaccines inducing immunity to Lassa virus glycoprotein and nucleoprotein protect macaques after a single shot. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaaw3163 (2019).

201. 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).
202. Warner, N., Jokinen, J., Beier, J., Sokoloski, K. & Lukashevich, I. Mammarenaviral Infection Is Dependent on Directional Exposure to and Release from Polarized Intestinal Epithelia. *Viruses* **10**, 75 (2018).
203. Baize, S. *et al.* Lassa Virus Infection of Human Dendritic Cells and Macrophages Is Productive but Fails to Activate Cells. *J. Immunol.* **172**, 2861–2869 (2004).
204. Baize, S. *et al.* Role of interferons in the control of Lassa virus replication in human dendritic cells and macrophages. *Microbes Infect.* **8**, 1194–1202 (2006).
205. Günther, S. *et al.* Lassa Fever Encephalopathy: Lassa Virus in Cerebrospinal Fluid but Not in Serum. *J. Infect. Dis.* **184**, 345–349 (2001).
206. Fisher-Hoch, S. P. *et al.* Physiological and Immunologic Disturbances Associated with Shock in a Primate Model of Lassa Fever. *J. Infect. Dis.* **155**, 465–474 (1987).
207. Mahanty, S. & Bray, M. Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 487–498 (2004).
208. 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).
209. Quintin, J., Cheng, S.-C., van der Meer, J. W. & Netea, M. G. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **29**, 1–7 (2014).
210. Netea, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 375–388 (2020).
211. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
212. 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**, 552–560 (1999).
213. Schaeffer, J. *et al.* Lassa virus activates myeloid dendritic cells but suppresses their ability to stimulate T cells. *PLOS Pathog.* **14**, e1007430 (2018).
214. 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).
215. Pannetier, D., Faure, C., Georges-Courbot, M.-C., Deubel, V. & Baize, S. Human Macrophages, but Not Dendritic Cells, Are Activated and Produce Alpha/Beta Interferons in Response to Mopeia Virus Infection. *J. Virol.* **78**, 10516–10524 (2004).
216. Schaeffer, J. *et al.* Non-Pathogenic Mopeia Virus Induces More Robust Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells than Lassa Virus. *Viruses* **11**, 287 (2019).
217. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513–545 (2014).
218. Radoshitzky, S. R. *et al.* Infectious Lassa Virus, but Not Filoviruses, Is Restricted by BST-2/Tetherin. *J. Virol.* **84**, 10569–10580 (2010).

219. Sen, E. S. & Ramanan, A. V. Cytokine Storm Syndrome Associated with Hemorrhagic Fever and Other Viruses. in *Cytokine Storm Syndrome* (eds. Cron, R. Q. & Behrens, E. M.) 277–297 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-030-22094-5\_16.
220. Prescott, J. B. *et al.* Immunobiology of Ebola and Lassa virus infections. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 195–207 (2017).
221. Schmitz, H. *et al.* Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever. *Microbes Infect.* **4**, 43–50 (2002).
222. 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).
223. 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: Innate immunity. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1822–1832 (2012).
224. 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).
225. Ali, A. *et al.* Natural killer cell immunosuppressive function requires CXCR3-dependent redistribution within lymphoid tissues. *J. Clin. Invest.* **131**, e146686 (2021).
226. 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).
227. ter Meulen, J. *et al.* Characterization of Human CD4<sup>+</sup> T-Cell Clones Recognizing Conserved and Variable Epitopes of the Lassa Virus Nucleoprotein. *J. Virol.* **74**, 2186–2192 (2000).
228. 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<sup>+</sup> T-cell clones. *Virology* **321**, 134–143 (2004).
229. Port, J. R. *et al.* Severe Human Lassa Fever Is Characterized by Nonspecific T-Cell Activation and Lymphocyte Homing to Inflamed Tissues. *J. Virol.* **94**, e01367-20 (2020).
230. Boesen, A., Sundar, K. & Coico, R. Lassa Fever Virus Peptides Predicted by Computational Analysis Induce Epitope-Specific Cytotoxic-T-Lymphocyte Responses in HLA-A2.1 Transgenic Mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **12**, 1223–1230 (2005).
231. Fisher-Hoch, S. P., Hutwagner, L., Brown, B. & McCormick, J. B. Effective Vaccine for Lassa Fever. *J. Virol.* **74**, 6777–6783 (2000).
232. 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**, 8293–8306 (2011).
233. 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. (Berl.)* **189**, 225–229 (2001).
234. Lloyd, G., Barber, G. N., Clegg, J. C. S. & Kelly, P. Identification of Lassa Fever virus infection with recombinant nucleocapsid protein antigen. *The Lancet* **334**, 1222 (1989).
235. Jahrling, P. B. *et al.* Lassa Virus Infection of Rhesus Monkeys: Pathogenesis and Treatment with Ribavirin. *J. Infect. Dis.* **141**, 580–589 (1980).

236. 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**, 380–384 (1985).
237. Johnson, K. M. *et al.* Clinical Virology of Lassa Fever in Hospitalized Patients. *J. Infect. Dis.* **155**, 456–464 (1987).
238. 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**, 677–679 (1970).
239. 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).
240. 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).
241. 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**, 528–533 (1984).
242. 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**, 12696–12703 (2007).
243. Pythoud, C. *et al.* Arenavirus Nucleoprotein Targets Interferon Regulatory Factor-Activating Kinase IKK $\epsilon$ . *J. Virol.* **86**, 7728–7738 (2012).
244. Rodrigo, W. W. S. I. *et al.* Arenavirus Nucleoproteins Prevent Activation of Nuclear Factor Kappa B. *J. Virol.* **86**, 8185–8197 (2012).
245. 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**, 2944–2955 (2015).
246. Huang, Q., Liu, X., Brisse, M., Ly, H. & Liang, Y. Effect of Strain Variations on Lassa Virus Z Protein-Mediated Human RIG-I Inhibition. *Viruses* **12**, 907 (2020).
247. Zhu, X. *et al.* Effects of N-Linked Glycan on Lassa Virus Envelope Glycoprotein Cleavage, Infectivity, and Immune Response. *Virol. Sin.* **36**, 774–783 (2021).
248. Ölschläger, S. *et al.* Improved Detection of Lassa Virus by Reverse Transcription-PCR Targeting the 5' Region of S RNA. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 2009–2013 (2010).
249. 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).
250. Meunier, D. M. Y., McCormick, J. B., Georges, A. J., Georges, M. C. & Gonzalez, J. P. Comparison of Lassa, Mobala and Ippy virus reactions to immunofluorescent test. *Lancet* (1985).
251. Hartnett, J. N. *et al.* Current and emerging strategies for the diagnosis, prevention and treatment of Lassa fever. *Future Virol.* **10**, 559–584 (2015).
252. Witkowski, J. T., Robins, R. K., Sidwell, R. W. & Simon, L. N. Design, synthesis, and broad spectrum antiviral activity of 1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide and related nucleosides. *J. Med. Chem.* **15**, 1150–1154 (1972).
253. Houlihan, C. & Behrens, R. Lassa fever. *BMJ* j2986 (2017) doi:10.1136/bmj.j2986.

254. Stephen, Edward L. & Jahrling, Peter B. EXPERIMENTAL LASSA FEVER VIRUS INFECTION SUCCESSFULLY TREATED WITH RIBAVIRIN. *The Lancet* **313**, 268–269 (1979).
255. 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**, 420–427 (1984).
256. Lingas, G., Rosenke, K., Safronetz, D. & Guedj, J. Lassa viral dynamics in non-human primates treated with favipiravir or ribavirin. *PLOS Comput. Biol.* **17**, e1008535 (2021).
257. McCormick, J. B. *et al.* Lassa Fever. *N. Engl. J. Med.* **314**, 20–26 (1986).
258. Eberhardt, K. A. *et al.* Ribavirin for the treatment of Lassa fever: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* **87**, 15–20 (2019).
259. Furuta, Y., Komeno, T. & Nakamura, T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **93**, 449–463 (2017).
260. Oestereich, L. *et al.* Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Res.* **105**, 17–21 (2014).
261. Reynard, S. *et al.* Early control of viral load by favipiravir promotes survival to Ebola virus challenge and prevents cytokine storm in non-human primates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **15**, e0009300 (2021).
262. Rosenke, K. *et al.* Use of Favipiravir to Treat Lassa Virus Infection in Macaques. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1696–1699 (2018).
263. Raabe, V. N. *et al.* Favipiravir and Ribavirin Treatment of Epidemiologically Linked Cases of Lassa Fever. *Clin. Infect. Dis.* **65**, 855–859 (2017).
264. Robinson, J. E. *et al.* Most neutralizing human monoclonal antibodies target novel epitopes requiring both Lassa virus glycoprotein subunits. *Nat. Commun.* **7**, 11544 (2016).
265. Cross, R. W. *et al.* Treatment of Lassa virus infection in outbred guinea pigs with first-in-class human monoclonal antibodies. *Antiviral Res.* **133**, 218–222 (2016).
266. Mire, C. E. *et al.* Human-monoclonal-antibody therapy protects nonhuman primates against advanced Lassa fever. *Nat. Med.* **23**, 1146–1149 (2017).
267. Murphy, H. L. & Ly, H. Pathogenicity and virulence mechanisms of Lassa virus and its animal modeling, diagnostic, prophylactic, and therapeutic developments. *Virulence* **12**, 2989–3014 (2021).
268. A Clinical Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of rVSVΔG-LASV-GPC Vaccine in Adults in Good General Health - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04794218>.
269. A Trial to Evaluate the Optimal Dose of MV-LASV (V182-001) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04055454>.
270. Marzi, A., Feldmann, F., Geisbert, T. W., Feldmann, H. & Safronetz, D. Vesicular Stomatitis Virus-based Vaccines against Lassa and Ebola Viruses. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, (2015).
271. 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).

272. Stein, D. R. *et al.* A recombinant vesicular stomatitis-based Lassa fever vaccine elicits rapid and long-term protection from lethal Lassa virus infection in guinea pigs. *Npj Vaccines* **4**, 8 (2019).
273. Cross, R. W. *et al.* Quadrivalent VesiculoVax vaccine protects nonhuman primates from viral-induced hemorrhagic fever and death. *J. Clin. Invest.* **130**, 539–551 (2019).
274. Mateo, M. *et al.* A single-shot Lassa vaccine induces long-term immunity and protects cynomolgus monkeys against heterologous strains. *Sci. Transl. Med.* **13**, eabf6348 (2021).
275. Sullivan, B. M. *et al.* High crossreactivity of human T cell responses between Lassa virus lineages. *PLOS Pathog.* **16**, e1008352 (2020).
276. Carnec, X. *et al.* A Vaccine Platform against Arenaviruses Based on a Recombinant Hyperattenuated Mopeia Virus Expressing Heterologous Glycoproteins. *J. Virol.* **92**, e02230-17 (2018).
277. Baillet, N. Pathologie comparée de la fièvre de Lassa chez le singe cynomolgus : mécanismes pathogéniques précoces, réponses immunitaires et marqueurs d’infection. (Université de Lyon, 2018).
278. Newman, A. M. *et al.* Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat. Methods* **12**, 453–457 (2015).
279. Nirmal, A. J. *et al.* Immune Cell Gene Signatures for Profiling the Microenvironment of Solid Tumors. *Cancer Immunol. Res.* **6**, 1388–1400 (2018).
280. Vallania, F. *et al.* Leveraging heterogeneity across multiple datasets increases cell-mixture deconvolution accuracy and reduces biological and technical biases. *Nat. Commun.* **9**, 4735 (2018).
281. Woolsey, C. *et al.* *Bundibugyo ebolavirus* Survival Is Associated with Early Activation of Adaptive Immunity and Reduced Myeloid-Derived Suppressor Cell Signaling. *mBio* **12**, (2021).
282. CIBERSORT. <https://cibersort.stanford.edu/>.
283. CIBERSORTx. <https://cibersortx.stanford.edu/>.
284. Mavilio, D. *et al.* Characterization of CD56<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 2886–2891 (2005).
285. Wijaya, R. S. *et al.* Expansion of dysfunctional CD56-CD16+ NK cells in chronic hepatitis B patients. *Liver Int.* **41**, 969–981 (2021).
286. Espina, V. *et al.* Laser-capture microdissection. *Nat. Protoc.* **1**, 586–603 (2006).
287. Altieri, B. *et al.* *Cell Atlas at Single-Nuclei Resolution of the Adult Human Adrenal Gland and Adrenocortical Adenomas.*  
<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.08.27.505530> (2022)  
doi:10.1101/2022.08.27.505530.
288. MacParland, S. A. *et al.* Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat. Commun.* **9**, 4383 (2018).
289. Human Liver Atlas. <http://shiny.baderlab.org/HumanLiverAtlas/>.
290. Travaglini, K. J. *et al.* A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* **587**, 619–625 (2020).
291. Gillich, A. *et al.* Capillary cell-type specialization in the alveolus. *Nature* **586**, 785–789 (2020).



292. Stewart, B. J. *et al.* Spatiotemporal immune zonation of the human kidney. *Science* **365**, 1461–1466 (2019).
293. Kidney Cell Atlas. <https://www.kidneycellatlas.org/>.
294. Almansa, R. *et al.* Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis. *J. Infect.* **70**, 445–456 (2015).
295. Sweeney, T. E. *et al.* A community approach to mortality prediction in sepsis via gene expression analysis. *Nat. Commun.* **9**, 694 (2018).
296. Cazalis, M.-A. *et al.* Early and dynamic changes in gene expression in septic shock patients: a genome-wide approach. *Intensive Care Med. Exp.* **2**, 20 (2014).
297. Stanski, N. L. & Wong, H. R. Prognostic and predictive enrichment in sepsis. *Nat. Rev. Nephrol.* **16**, 20–31 (2020).
298. Davenport, E. E. *et al.* Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* **4**, 259–271 (2016).
299. Barcella, M. *et al.* Identification of a transcriptome profile associated with improvement of organ function in septic shock patients after early supportive therapy. *Crit. Care* **22**, 312 (2018).
300. Bauer, M. *et al.* A Transcriptomic Biomarker to Quantify Systemic Inflammation in Sepsis — A Prospective Multicenter Phase II Diagnostic Study. *EBioMedicine* **6**, 114–125 (2016).
301. Acosta-Herrera, M. *et al.* Lung Transcriptomics during Protective Ventilatory Support in Sepsis-Induced Acute Lung Injury. *PLOS ONE* **10**, e0132296 (2015).
302. BLANCO\_MELO\_COVID19\_SARS\_COV\_2\_POS\_PATIENT\_LUNG\_TISSUE\_DN. [http://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/cards/BLANCO\\_MELO\\_COVID19\\_SARS\\_COV\\_2\\_POS\\_PATIENT\\_LUNG\\_TISSUE\\_DN.html](http://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/cards/BLANCO_MELO_COVID19_SARS_COV_2_POS_PATIENT_LUNG_TISSUE_DN.html).
303. BLANCO\_MELO\_COVID19\_SARS\_COV\_2\_POS\_PATIENT\_LUNG\_TISSUE\_UP. [http://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/cards/BLANCO\\_MELO\\_COVID19\\_SARS\\_COV\\_2\\_POS\\_PATIENT\\_LUNG\\_TISSUE\\_UP.html](http://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/cards/BLANCO_MELO_COVID19_SARS_COV_2_POS_PATIENT_LUNG_TISSUE_UP.html).
304. Blanco-Melo, D. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* **181**, 1036-1045.e9 (2020).
305. Hulsen, T., de Vlieg, J. & Alkema, W. BioVenn – a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9**, 488 (2008).
306. HP\_ACUTE\_KIDNEY\_INJURY. [https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HP\\_ACUTE\\_KIDNEY\\_INJURY.html](https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HP_ACUTE_KIDNEY_INJURY.html).
307. HP\_ADRENAL\_INSUFFICIENCY. [https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HP\\_ADRENAL\\_INSUFFICIENCY.html](https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HP_ADRENAL_INSUFFICIENCY.html).
308. HP\_CENTRAL\_ADRENAL\_INSUFFICIENCY. [https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HP\\_CENTRAL\\_ADRENAL\\_INSUFFICIENCY.html](https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HP_CENTRAL_ADRENAL_INSUFFICIENCY.html).
309. HP\_PRIMARY\_ADRENAL\_INSUFFICIENCY. [https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HP\\_PRIMARY\\_ADRENAL\\_INSUFFICIENCY.html](https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/human/geneset/HP_PRIMARY_ADRENAL_INSUFFICIENCY.html).

310. Mahanty, S. *et al.* Cutting Edge: Impairment of Dendritic Cells and Adaptive Immunity by Ebola and Lassa Viruses. *J. Immunol.* **170**, 2797–2801 (2003).
311. Steele, K. E., Anderson, A. O. & Mohamadzadeh, M. Fibroblastic reticular cell infection by hemorrhagic fever viruses. *Immunotherapy* **1**, 187–197 (2009).
312. Mueller, S. N. *et al.* Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 15430–15435 (2007).
313. Scandella, E. *et al.* Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat. Immunol.* **9**, 667–675 (2008).
314. Davis, K. J. *et al.* Pathology of experimental Ebola virus infection in African green monkeys. Involvement of fibroblastic reticular cells. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **121**, 805–819 (1997).
315. Steele, K., Crise, B., Kuehne, A. & Kell, W. Ebola Virus Glycoprotein Demonstrates Differential Cellular Localization in Infected Cell Types of Nonhuman Primates and Guinea Pigs. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **125**, 625–630 (2001).
316. Mueller, S. N. *et al.* Regulation of Homeostatic Chemokine Expression and Cell Trafficking During Immune Responses. *Science* **317**, 670–674 (2007).
317. Steele, K. E., Anderson, A. O. & Mohamadzadeh, M. Fibroblastic reticular cells and their role in viral hemorrhagic fevers. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **7**, 423–435 (2009).
318. Mueller, S. N. & Germain, R. N. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 618–629 (2009).
319. Alexandre, Y. O. & Mueller, S. N. Stromal cell networks coordinate immune response generation and maintenance. *Immunol. Rev.* **283**, 77–85 (2018).
320. Bajénoff, M. *et al.* Stromal Cell Networks Regulate Lymphocyte Entry, Migration, and Territoriality in Lymph Nodes. *Immunity* **25**, 989–1001 (2006).
321. Alexandre, Y. O. *et al.* Systemic Inflammation Suppresses Lymphoid Tissue Remodeling and B Cell Immunity during Concomitant Local Infection. *Cell Rep.* **33**, 108567 (2020).
322. Mateo, M. *et al.* Pathogenesis of recent Lassa virus isolates from lineages II and VII in cynomolgus monkeys. *Virulence* **13**, 654–669 (2022).
323. Vestweber, D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol. Rev.* **218**, 178–196 (2007).
324. Kamei, M. & Carman, C. V. New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes: *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 43–52 (2010).
325. Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317 (2006).
326. Gschwandtner, M., Derler, R. & Midwood, K. S. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front. Immunol.* **10**, 2759 (2019).
327. Binder, D., Fehr, J., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. Virus-induced Transient Bone Marrow Aplasia: Major Role of Interferon- $\alpha$  during Acute Infection with the Noncytotoxic Lymphocytic Choriomeningitis Virus. **14**.

328. Appanna, R., Sekaran, S. D., Lum, L. C. S., Ponnampalavanar, S. A. & Wang, S. M. Cytokine Factors Present in Dengue Patient Sera Induces Alterations of Junctional Proteins in Human Endothelial Cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **87**, 936–942 (2012).
329. Phanthanawiboon, S. *et al.* Acute Systemic Infection with Dengue Virus Leads to Vascular Leakage and Death through Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Tie2/Angiopoietin Signaling in Mice Lacking Type I and II Interferon Receptors. *PLOS ONE* **11**, e0148564 (2016).
330. Cotran, R. S. *et al.* Endothelial activation during interleukin 2 immunotherapy. A possible mechanism for the vascular leak syndrome. *J. Immunol.* **140**, 1883 (1988).
331. Gallagher, D. C. *et al.* Angiopoietin 2 Is a Potential Mediator of High-Dose Interleukin 2-Induced Vascular Leak. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2115–2120 (2007).
332. Gavard, J., Patel, V. & Gutkind, J. S. Angiopoietin-1 Prevents VEGF-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through mDia. *Dev. Cell* **14**, 25–36 (2008).
333. Shibuya, M. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* **312**, 549–560 (2006).
334. Chen, J. *et al.* Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat. Med.* **11**, 1188–1196 (2005).
335. Gao, F. *et al.* Akt1 promotes stimuli-induced endothelial-barrier protection through FoxO-mediated tight-junction protein turnover. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3917–3933 (2016).
336. Di Lorenzo, A., Fernández-Hernando, C., Cirino, G. & Sessa, W. C. Akt1 is critical for acute inflammation and histamine-mediated vascular leakage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 14552–14557 (2009).
337. Puerta-Guardo, H. *et al.* Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep.* **26**, 1598-1613.e8 (2019).
338. Prasad, M., Leon, M., Lerman, L. O. & Lerman, A. Viral Endothelial Dysfunction: A Unifying Mechanism for COVID-19. *Mayo Clin. Proc.* **96**, 3099–3108 (2021).
339. Liu, F. *et al.* SARS-CoV-2 Infects Endothelial Cells In Vivo and In Vitro. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 701278 (2021).
340. Gavrilovskaya, I. N., Gorbunova, E. E., Mackow, N. A. & Mackow, E. R. Hantaviruses Direct Endothelial Cell Permeability by Sensitizing Cells to the Vascular Permeability Factor VEGF, while Angiopoietin 1 and Sphingosine 1-Phosphate Inhibit Hantavirus-Directed Permeability. *J. Virol.* **82**, 5797–5806 (2008).
341. Merabet, O. *et al.* Infection of Human Endothelial Cells with Lassa Virus Induces Early but Transient Activation and Low Type I IFN Response Compared to the Closely-Related Nonpathogenic Mopeia Virus. *Viruses* **14**, 652 (2022).
342. Bednarek, R. In Vitro Methods for Measuring the Permeability of Cell Monolayers. *Methods Protoc.* **5**, 17 (2022).
343. Reisler, R. *et al.* Ebola Virus Causes Intestinal Tract Architectural Disruption and Bacterial Invasion in Non-Human Primates. *Viruses* **10**, 513 (2018).
344. Nazli, A. *et al.* Exposure to HIV-1 Directly Impairs Mucosal Epithelial Barrier Integrity Allowing Microbial Translocation. *PLoS Pathog.* **6**, e1000852 (2010).
345. Zheng, H. *et al.* Multi-cohort analysis of host immune response identifies conserved protective and detrimental modules associated with severity across viruses. *Immunity* **54**, 753-768.e5 (2021).

346. So, E. C. *et al.* NK cell expression of Tim-3: First impressions matter. *Immunobiology* **224**, 362–370 (2019).
347. Zheng, Y. *et al.* TNF- $\alpha$ -induced Tim-3 expression marks the dysfunction of infiltrating natural killer cells in human esophageal cancer. *J. Transl. Med.* **17**, 165 (2019).
348. Yunna, C., Mengru, H., Lei, W. & Weidong, C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* **877**, 173090 (2020).
349. Kwak, T. *et al.* Distinct Populations of Immune-Suppressive Macrophages Differentiate from Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer. *Cell Rep.* **33**, 108571 (2020).
350. Margraf, A., Lowell, C. A. & Zarbock, A. Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. *Blood* **139**, 2130–2144 (2022).
351. Corry, J. *et al.* Infiltration of inflammatory macrophages and neutrophils and widespread pyroptosis in lung drive influenza lethality in nonhuman primates. *PLOS Pathog.* **18**, e1010395 (2022).
352. Al-Dalahmah, O. *et al.* Neuronophagia and microglial nodules in a SARS-CoV-2 patient with cerebellar hemorrhage. *Acta Neuropathol. Commun.* **8**, 147 (2020).
353. Nobuloni, M. *et al.* Etiology of microglial nodules in brains of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Neurovirol.* **6**, 46–50 (2000).
354. Singh, S. *et al.* Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **125**, 595–608 (2013).
355. Chen, Z., Zhong, D. & Li, G. The role of microglia in viral encephalitis: a review. *J. Neuroinflammation* **16**, 76 (2019).
356. Tröscher, A. R. *et al.* Microglial nodules provide the environment for pathogenic T cells in human encephalitis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **137**, 619–635 (2019).
357. Szidon, J. P., Pietra, G. G. & Fishman, A. P. The Alveolar-Capillary Membrane and Pulmonary Edema. *N. Engl. J. Med.* **286**, 1200–1204 (1972).
358. Kurtz, A. Control of Renin Synthesis and Secretion. *Am. J. Hypertens.* **25**, 839–847 (2012).

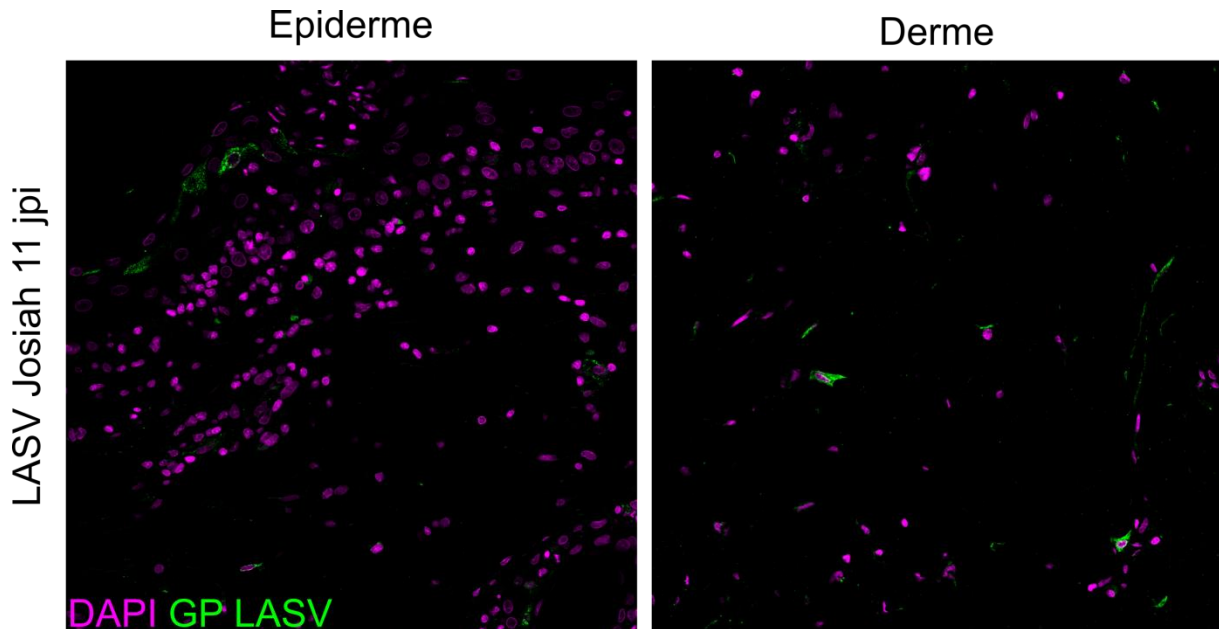


Figure 71. Mise en évidence cellules infectées dans l'épiderme et le derme au site d'injection.

Publications au sein de l'équipe principale survenues pendant le doctorat :

Pathogenesis of recent Lassa virus isolates from lineages II and VII in cynomolgus monkeys, *Virulence*, 2022.

Mathieu Mateo\*, **Jimmy Hortion\***, Emeline Perthame, Caroline Picard, Stéphanie Reynard, Alexandra Journeaux, Clara Germain, Xavier Carnec, Nicolas Baillet, Virginie Borges Cardoso, Natalia Pietrosevoli, Audrey Vallve, Stéphane Barron, Ophélie Jourjon, Oriane Lacroix, Aurélie Duthey, Manon Dirheimer, Mailys Daniau, Catherine Legras-Lachuer, Gregory Jouvion, Caroline Carbonnelle, Hervé Raoul, Sylvain Baize.

**A single-shot Lassa vaccine induces long-term immunity and protects cynomolgus monkeys against heterologous strains**, Science Translational Medicine, 2021.

Mathieu Mateo, Stéphanie Reynard, Alexandra Journeaux, Clara Germain, **Jimmy Hortion**, Xavier Carnec, Caroline Picard, Nicolas Baillet, Virginie Borges Cardoso, Othmann Merabet, Audrey Vallve, Stéphane Barron, Ophélie Jourjon, Oriane Lacroix, Aurélie Duthey, Manon Dirheimer, Gregory Jouvion, Pierre-Henri Moreau, Lyne Fellmann, Caroline Carbonnelle, Hervé Raoul, Frédéric Tangy, Sylvain Baize.

**Systemic viral spreading and defective host responses are associated with fatal Lassa fever in macaques**, Communications Biology, 2021.

Nicolas Baillet, Stéphanie Reynard, Emeline Perthame, **Jimmy Hortion**, Alexandra Journeaux, Mathieu Mateo, Xavier Carnec, Justine Schaeffer, Caroline Picard, Laura Barrot, Stéphane Barron, Audrey Vallve, Aurélie Duthey, Frédéric Jacquot, Cathy Boehringer, Grégory Jouvion, Natalia Pietrosevoli, Rachel Legendre, Marie-Agnès Dillies, Richard Allan, Catherine Legras-Lachuer, Caroline Carbonnelle, Hervé Raoul, Sylvain Baize.

**A Vaccine Platform against Arenaviruses Based on a Recombinant Hyperattenuated Mopeia Virus Expressing Heterologous Glycoproteins**, Journal of Virology, 2018.

Xavier Carnec, Mathieu Mateo, Audrey Page, Stéphanie Reynard, **Jimmy Hortion**, Caroline Picard, Elsie Yekwa, Laura Barrot, Stéphane Barron, Audrey Vallve, Hervé Raoul, Caroline Carbonnelle, François Ferron, Sylvain Baize.

**Publications au sein de l'équipe secondaire survenues pendant le doctorat :**

**High Dengue Burden and Circulation of 4 Virus Serotypes among Children with Undifferentiated Fever, Kenya, 2014–2017**, *Emerging Infectious Diseases*, 2020.

Melisa M. Shah, Bryson A. Ndenga, Francis M. Mutuku, David M. Vu, Elysse N. Grossi-Soyster, Victoria Okuta, Charles O. Ronga, Philip K. Chebii, Priscilla Maina, Zainab Jembe, Carren M. Bosire, Jael S. Amugongo, Malaya K. Sahoo, ChunHong Huang, Jenna Weber, Sean V. Edgerton, **Jimmy Hortion**, Shannon N. Bennett, Benjamin A. Pinsky, A. Desiree LaBeaud.

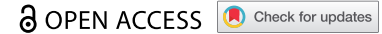
**Evidence of transovarial transmission of Chikungunya and Dengue viruses in field-caught mosquitoes in Kenya**, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2020.

Claire J. Heath, Elysse N. Grossi-Soyster, Bryson A. Ndenga, Francis M. Mutuku, Malaya K. Sahoo, Harun N. Ngugi, Joel O. Mbakaya, Peter Siema, Uriel Kitron, Nayer Zahiri, **Jimmy Hortion**, Jesse J. Waggoner, Charles H. King, Benjamin A. Pinsky, A. Desiree LaBeaud.

**Acute Flavivirus and Alphavirus Infections among Children in Two Different Areas of Kenya, 2015**, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2019.

**Jimmy Hortion**, Francis M. Mutuku, Ana L. Eyherabide, David M. Vu, Derek B. Boothroyd, Elysse N. Grossi-Soyster, Charles H. King, Bryson A. Ndenga, A. Desiree LaBeaud.

RESEARCH PAPER



## Pathogenesis of recent Lassa virus isolates from lineages II and VII in cynomolgus monkeys

Mathieu Mateo<sup>a,b,\*</sup>, Jimmy Hortion<sup>a,b,\*</sup>, Emeline Perthame<sup>c</sup>, Caroline Picard<sup>a,b</sup>, Stéphanie Reynard<sup>a,b</sup>, Alexandra Journeaux<sup>a,b</sup>, Clara Germain<sup>a,b</sup>, Xavier Carnec<sup>a,b</sup>, Nicolas Baillet<sup>a,b</sup>, Virginie Borges-Cardoso<sup>a,b</sup>, Natalia Pietrosevoli<sup>c</sup>, Audrey Vallve<sup>d</sup>, Stéphane Barron<sup>d</sup>, Ophélie Jourjon<sup>d</sup>, Orianne Lacroix<sup>d</sup>, Aurélie Duthey<sup>d</sup>, Manon Dirheimer<sup>e</sup>, Mailys Daniau<sup>f</sup>, Catherine Legras-Lachuer<sup>f</sup>, Gregory Jouvion<sup>g,h</sup>, Caroline Carbonnelle<sup>d</sup>, Hervé Raoul<sup>d</sup>, and Sylvain Baize<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Unité de Biologie des Infections Virales Emergentes, Institut Pasteur, Lyon, France; <sup>b</sup> Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Université de Lyon, INSERM U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR5308, Lyon France; <sup>c</sup>Bioinformatics and Biostatistics Hub, Institut Pasteur, Université de Paris, Paris, France; <sup>d</sup>Laboratoire P4 INSERM–Jean Mérieux, INSERM US003, 69007 Lyon, France; <sup>e</sup>INSERM, Délégation Régionale Auvergne Rhône-Alpes, Bron, France; <sup>f</sup>ViroScan3D SAS, Trévoux, France; <sup>g</sup>Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'Histologie et d'Anatomie Pathologique, Maisons-Alfort, France; <sup>h</sup>Dynamic Research Group, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, USC ANSES, Université Paris Est Créteil, Maisons-Alfort, France

### ABSTRACT

The area of Lassa virus (LASV) circulation is expanding, with the emergence of highly pathogenic new LASV lineages. Benin recently became an endemic country for LASV and has seen the emergence of a new LASV lineage (VII). The first two outbreaks in 2014 and 2016 showed a relatively high mortality rate compared to other outbreaks. We infected cynomolgus monkeys with two strains belonging to lineage II and lineage VII that were isolated from deceased patients during the 2016 outbreak in Benin. The lineage VII strain (L7) caused uniform mortality. Death was associated with uncontrolled viral replication, unbalanced inflammatory responses characterized by increased concentrations of pro- and anti-inflammatory mediators, and the absence of efficient immune responses, resembling the pathogenesis associated with the prototypic Josiah strain in monkeys. The lineage II strain (L2) showed apparently lower virulence than its counterpart, with a prolonged time to death and a lower mortality rate. Prolonged survival was associated with better control of viral replication, a moderate inflammatory response, and efficient T-cell responses. Transcriptomic analyses also highlighted important differences in the immune responses associated with the outcome. Both strains caused strong inflammation in several organs. Notably, meningitis and encephalitis were observed in the cerebral cortex and cerebellum in all monkeys, independently of the outcome. Due to their apparently high pathogenicity, emerging strains from lineage VII should be considered in preclinical vaccine testing. Lineage II would also be beneficial in pathogenesis studies to study the entire spectrum of Lassa fever severity.

### ARTICLE HISTORY

Received 14 January 2022  
Revised 10 March 2022  
Accepted 28 March 2022

### KEYWORDS

Lassa virus; cynomolgus monkeys; pathogenesis; immune responses; viral hemorrhagic fevers


## Introduction

LASV is a mammalian Old-World arenavirus that causes Lassa fever, a hemorrhagic fever that leads to thousands of deaths each year and for which there is still no approved vaccine or treatment. All of West Africa is at risk of Lassa fever. Originally endemic to Nigeria, Sierra Leone, Liberia, and Guinea [1], LASV has recently emerged in additional countries, such as Mali, Côte d'Ivoire, Togo, and Benin [2–6]. Contamination generally occurs after contact with infected material from rodent reservoirs [7,8], which are believed to account for most human infections [9].

After an incubation period of one to three weeks, infected individuals first develop nonspecific signs and symptoms, such as fever and headache [10,11]. Other symptoms may appear during the first week, such as pharyngitis, cough, myalgia, abdominal pain, conjunctivitis, nausea, diarrhea, and vomiting. Survivors experience these symptoms during one to two further weeks before recovering but may develop long-term sequelae, including hearing deficits [12]. In severe cases, patients develop new symptoms after approximately one week, including edema, pleural and pericardial effusion, conjunctival and gingival bleeding,

**CONTACT** Sylvain Baize  [sylvain.baize@pasteur.fr](mailto:sylvain.baize@pasteur.fr)

\*These authors contributed equally to this work.

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2022 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



respiratory distress, and encephalopathy. Up to 50% of patients with severe cases then die from multi-organ failure and shock [10].

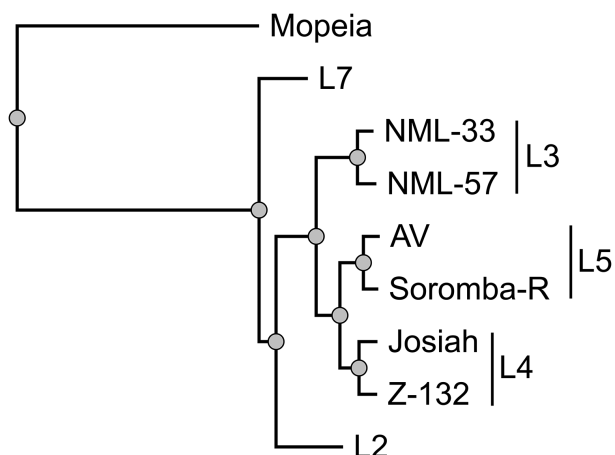
The pathogenesis of Lassa fever in humans can be fully recapitulated in cynomolgus monkeys and this model has been instrumental in our understanding of the pathophysiology of this disease. The prototypic Josiah strain causes uniform lethality in cynomolgus monkeys [13,14]. After a short incubation period of three to six days, animals develop clinical signs, such as stress, fatigue, fever, and dehydration. Over the following days, animals usually develop other clinical signs, including bleeding, edema, and respiratory distress, and die within two weeks after infection. A similar disease is observed in monkeys infected with the strain Z-132, which belongs to the same lineage (lineage IV) as LASV Josiah [15]. Non-fatal infections can also be reproduced in cynomolgus monkeys infected with the lineage V strains Soromba-R and AV [13,15]. More recently, Stein et al. studied the pathophysiology in cynomolgus monkeys of two strains from lineage III isolated from patients during the 2018 Nigerian outbreak that show different pathogenicity [16].

LASV presents an incredibly high diversity, with at least 7 different lineages based on their genetic differences. Many known or uncharacterized LASV strains co-circulate in the rodent reservoir, leading to the spillover of several strains during a single outbreak, possibly presenting differences in pathogenicity and antigenicity [9]. Their study in animal models is therefore essential to understand the pathophysiology associated with each strain and to developing better countermeasures. This is particularly important for the development of LASV vaccines, which should offer cross-protection against the breadth of LASV strains circulating in West Africa [9,17]. We recently showed the efficacy of a Measles-based LASV vaccine against two strains from lineage II and VII that were isolated from deceased patients during the Benin 2016 outbreak [6,18]. Here, we describe the pathophysiology associated with these two strains in unvaccinated cynomolgus monkeys in more detail.

## Results

### LASV virus isolation

The lineage II strain BEN-16081 was isolated on Vero E6 cells from a blood specimen of a 32-year-old female merchant traveling from Lagos who died in a Porto Novo hospital in January 2016 [6]. The lineage VII strain BEN-16131 was isolated on Vero E6 cells from



**Figure 1.** Phylogenetic analysis of the LASV strains tested in cynomolgus monkeys. The tree was inferred using the PhyML Smart Model Selection [21] general time-reversible plus gamma plus proportion of invariable sites model, performed on the L gene of the different LASV strains. The L gene of the Mopeia virus strain an 20410 was used to root the tree, as the sequence of the Z-132 strain is not publicly available, we used the sequence of Z-148, which is genetically similar [15]. The LASV lineage is indicated on the right.

a blood sample of a 25 year-old female merchant working in Tchaourou who died in April 2016. Strain BEN-16081 is called L2 and strain BEN-16131 is called L7 in this study. After isolation on Vero E6 cells, a pre-stock was produced on Vero E6 cells by infecting cells at a multiplicity of infection of .01. Viruses were collected three days later and cleared supernatants were titrated by focus forming assays, reaching titers of  $3 \times 10^7$  FFU/mL for L2 and  $8.5 \times 10^6$  FFU/mL for L7. We performed a phylogenetic analysis on the L gene of several LASV strains tested in cynomolgus monkeys, the gold standard for the study of LASV pathogenesis in animal models. This analysis included two strains from lineage IV (Josiah [14] and Z-132 [15]) two strains from lineage V (AV [13,19] and Soromba-R [15]), and two strains from lineage III (NML-33 and NML-57 [16]), in addition to the aforementioned strains L2 and L7. Strain 0043/LV/14 from lineage II was not included in the analysis, as the sequence is not available [20]. As expected, strains belonging to the same lineages clustered together on a phylogenetic tree (Figure 1). Among all strains, L2 and L7 were the most phylogenetically distant from the prototypic strain, Josiah.

### Pathogenesis of the L2 and L7 strains in cynomolgus monkeys

Two groups of three monkeys were infected by a subcutaneous injection of 3,000 FFU of LASV strain L7 or L2 diluted in 500  $\mu$ L of PBS. Clinical

manifestations were then monitored on a daily basis and sampling was performed every three days for the first two weeks and then once a week for the following two weeks. As previously reported [18], all animals experienced weight loss and decreased tonus between day 3 and day 9 (Table 1), accompanied by fever for two animals in each group. Between days 10 and 15, L7-infected animals developed more pronounced clinical signs, including apathy, shivering, and hypothermia, and all had to be euthanized between day 12 and day 15. Animal L2.1 showed epistaxis and diarrhea after day 10 and was euthanized on day 12. The two other animals only showed low tonus and dehydration. Animal L2.3 survived until day 20, showing balance issues and apathy on the day of euthanasia. Animal L2.2 survived until the end of the protocol and did not show any clinical signs after day 15.

As previously described [18], all animals showed increased plasma concentrations of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) between day 9 and day 15 or the day of death, as well as increased plasma concentrations of C-reactive

protein (CRP) between day 3 and day 15 or the day of death. All animals experienced marked lymphopenia between day 3 and day 12, affecting CD4+ and CD8+ T cells, as well as B cells and NK cells (Table 1 and Figure S1). After day 12, the number of circulating T and B cells, NK cells, monocytes, and granulocytes increased in the surviving L2.2 animal (Figure S1).

As previously reported [18], viremia was detected in all L7-infected animals as early as day 6 post-challenge and increased until the time of death (Table 1). Viremia was detected on day 9 in the L2-infected animals and increased until the time of death in animal L2.1, which died on day 12 (Table 1). Viremia increased more slowly in animal L2.3, which survived until day 20, but reached titers above  $10^5$  FFU/mL. Viremia was only detected between day 9 and day 12 in animal L2.2, which survived the L2 infection (Table 1). At the time of necropsy, we collected several organs and measured the infectious titers in each (Sup. Table S1). We detected infectious virus in the lymph nodes, spleen, liver, lung, kidney, adrenal gland, bladder, brain, and cerebellum of all L7-infected animals, except in the mesenteric lymph nodes of L7.1 and in the cerebellum

**Table 1.** Clinical, virological, and immunological findings in LASV-challenged monkeys. for the plasma concentrations of alanine transferase (ALT), aspartate transferase (AST), and C-reactive protein (CRP), + indicates  $2 < \text{fold increase (FI)} < 5$ , ++  $5 < \text{FI} < 10$ , and +++  $\text{FI} > 10$ . the day of observation is indicated within the parentheses. for viremia, + indicates a plasma titer between  $10^2$  and  $10^4$  FFU/mL, ++ between  $10^4$  and  $10^5$  FFU/mL, and +++  $> 10^5$  FFU/mL. LASV strain-specific IgG titers were measured by ELISA and + corresponds to titers below 1/1000; ++ between 1/1000 and 1/4000, and +++  $> 1/4000$ . LASV strain-specific T-cell responses were measured by intracellular cytokine staining and the percentage of cytokine-positive (expressing IFN $\gamma$  and/or TNF $\alpha$ ) CD4+ and CD8+ T cells is indicated by + when between .1 and .2, ++ between .2 and .3, and +++  $> .3$ . the time of death corresponds to the day of euthanasia (clinical score above 15 or terminal endpoint), surviving animals were euthanized at the end of the protocol on day 28.

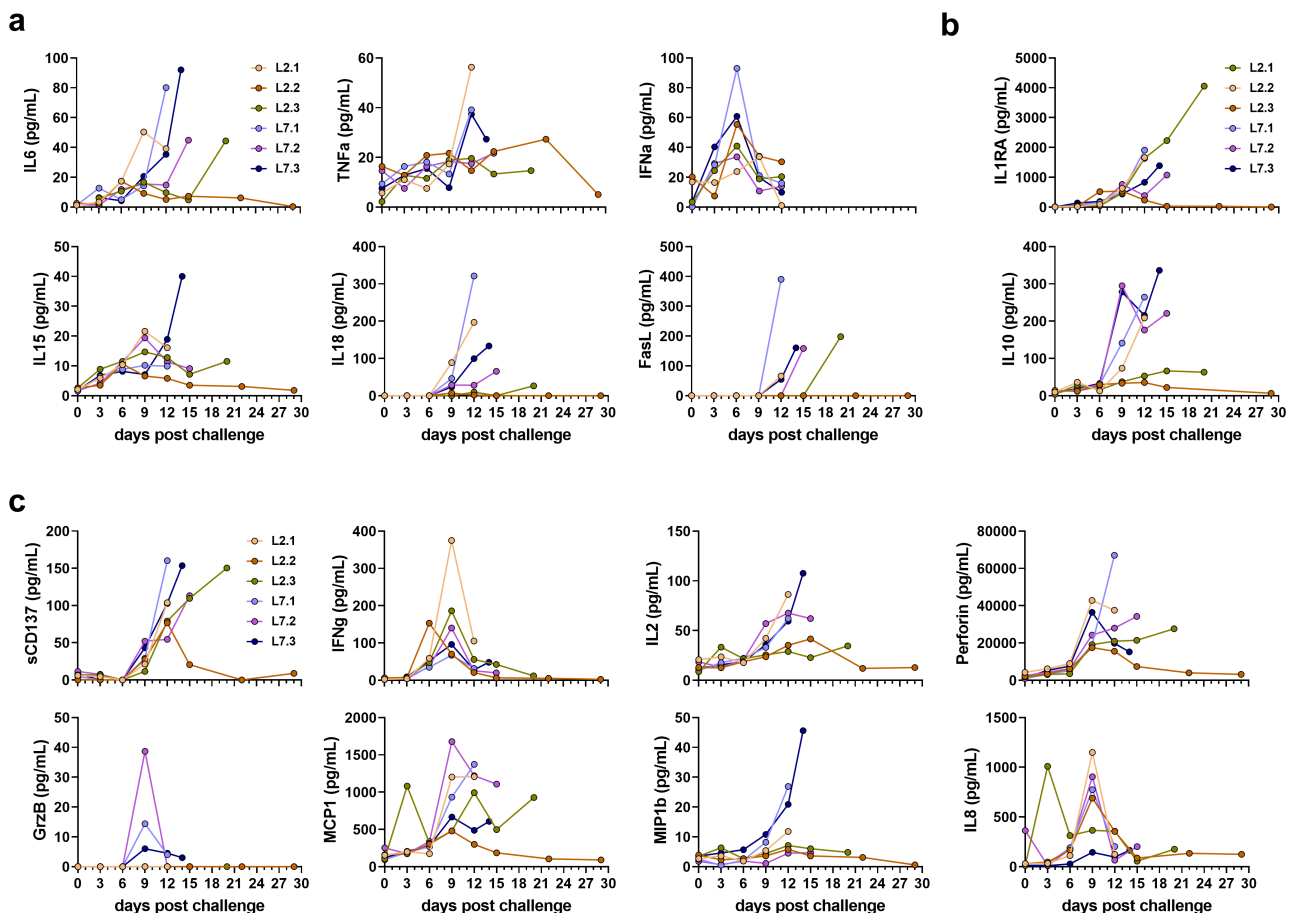
	Day 1-2	Day 3-9	Day 10-15	Day 16-21	Death
L7.1	Stress	Weight loss, low tonus, fever, ALT+++ (9), AST+++ (9), CRP+ (3), Lymphopenia, Viremia +, T CD4++++ (6)	Weight loss, hypothermia, ALT+++ (12), AST+++ (12), CRP++ (12), Lymphopenia, Viremia +, IgG ++		Day 12
L7.2	Stress	Weight loss, low tonus, fever, Lymphopenia, Viremia +, T CD8+ + (6), CD4+ + (6)	Apathy, shivering, prostration, pain, hypothermia (15), ALT +++ (12), AST +++ (12), CRP +++ (15), lymphopenia, viremia +, IgG ++, T CD8+ +		Day 15
L7.3	Sress	Weight loss, low tonus, ALT +, AST ++ (9), CRP +++ (3), Lymphopenia, viremia ++, IgG + (9), T CD8+ + (6), CD4 + + (6)	Apathy, shivering, hypothermia, ALT +++ (12), AST +++ (12), CRP +, +, +, Lymphopenia, neutropenia, Viremia +, IgG +		Day 14
L2.1	Stress	Weight loss, low tonus, fever, AST + (9), CRP +++ (3), Lymphopenia, viremia +	Nosebleed, diarrhea, AST ++ (12), CRP +, +, +, lymphopenia, Viremia +, IgG +		Day 12
L2.2	stress	Weight loss, low tonus, AST ++ (9), CRP + (9) Lymphopenia	Low tonus, dehydration, AST + (12), CRP +, +, +, lymphopenia, Viremia ++ (12), IgG +, +, +, (15), T CD8+ + (15), CD4+ + (15)	IgG +, +, +, T CD8+ +	Survived
L2.3	Stress	Weight loss, low tonus, fever, CRP + (6), lymphopenia,	Low tonus, dehydration, ALT ++ (15), AST ++ (15), CRP ++ (12),	Unsteadiness, apathy, viremia +, +, +, IgG +, +, +, (20)	Day 20

of L7.3. Organs from animal L2.1 also contained infectious virus in amounts comparable to those observed in the L7 animals. Infectious titers measured in the organs from L2.3 were relatively low relative to those observed for L2.1 and no virus was found in the bladder. Animal L2.2 only showed a very low infectious titer in the spleen, just above the limit of detection.

We also assessed the humoral and cellular responses in all animals (Table 1). As reported previously in more details [18], LASV-specific IgG were detected in all L7 animals at day 9 and in all L2 animals at day 12 and reached high titers at the time of death. TNF $\alpha$ -producing LASV-specific CD4 $^+$  T cells were detected in L7 animals at day 6 post challenge but were not detected later. L2 animals did not develop LASV-specific T cell responses except for the surviving animal who produced IFN $\gamma$ -producing LASV-specific T CD4 $^+$  and T CD8 $^+$  cells by day 15 post challenge, and the T CD8 $^+$  response was still detected at day 28.

### Cytokine and chemokine responses to LASV infection

We measured the plasma concentrations of several cytokines and chemokines in the days following challenge. Plasma concentrations of pro-inflammatory IL-6, IL-18, and FasL increased for all infected monkeys in the days preceding death, except for the surviving animal L2.2 (Figure 2). Concentrations of TNF $\alpha$  were also elevated at the time of death in the animals that died before day 14 but remained stable in the others. We observed a peak in the IFN $\alpha$  concentration for almost all animals on day 6 post-challenge. Elevated concentrations of IL-15 were also detected in the plasma of animal L7.3 at the time of death. The plasma concentrations of the anti-inflammatory cytokines IL-1RA and IL-10 increased steadily between day 9 and the time of death for all animals, except L2.2 (Figure 2). The increase in IL-10 plasma concentrations was also mod-



**Figure 2.** Quantification of soluble mediators in the plasma according to the time after LASV infection. Plasma concentrations of (a) pro-inflammatory cytokines, (b) anti-inflammatory cytokines, (c) T-cell response-related mediators, and (d) chemokines at various times post-challenge. IFN- $\alpha$  plasma concentrations were measured by ELISA. All other plasma concentrations were measured by Luminex assays.

est for L2.3, which survived until day 20, relative to that of the other animals, which died earlier. The plasma concentrations of several soluble mediators involved in cytotoxic activity and regulation of the immune response were also affected after challenge. The concentration of sCD137 increased for all animals between day 9 and the day of death, except for L2.2, which showed a peak on day 12, which then returned to the basal value (Figure 2). We also detected a peak in the release of IFN $\gamma$  on day 9 for all animals, except L2.2, for which the IFN $\gamma$  peaked earlier, on day 6 (Figure 2). The IL-2 concentrations rose until the time of death for all animals that died before day 15 but remained low for animals L2.2 and L2.3 (Figure 2). In animal L7.1, the concentration of perforin was the highest at the time of death, whereas perforin concentrations increased considerably by day 9 and then tended to stabilize or even decrease for the other animals (Figure 2). A modest and transient increase in the plasma concentration of granzyme B was only noted in the L7-infected animals on day 9 (Figure 2). The chemokines MCP-1 and IL-8 were released on day 3 at high concentrations in the plasma of L2.3, whereas these chemokines were released on day 9 and only transiently for IL-8 in the other animals (Figure 2).

### Transcriptomic profiles after LASV infection

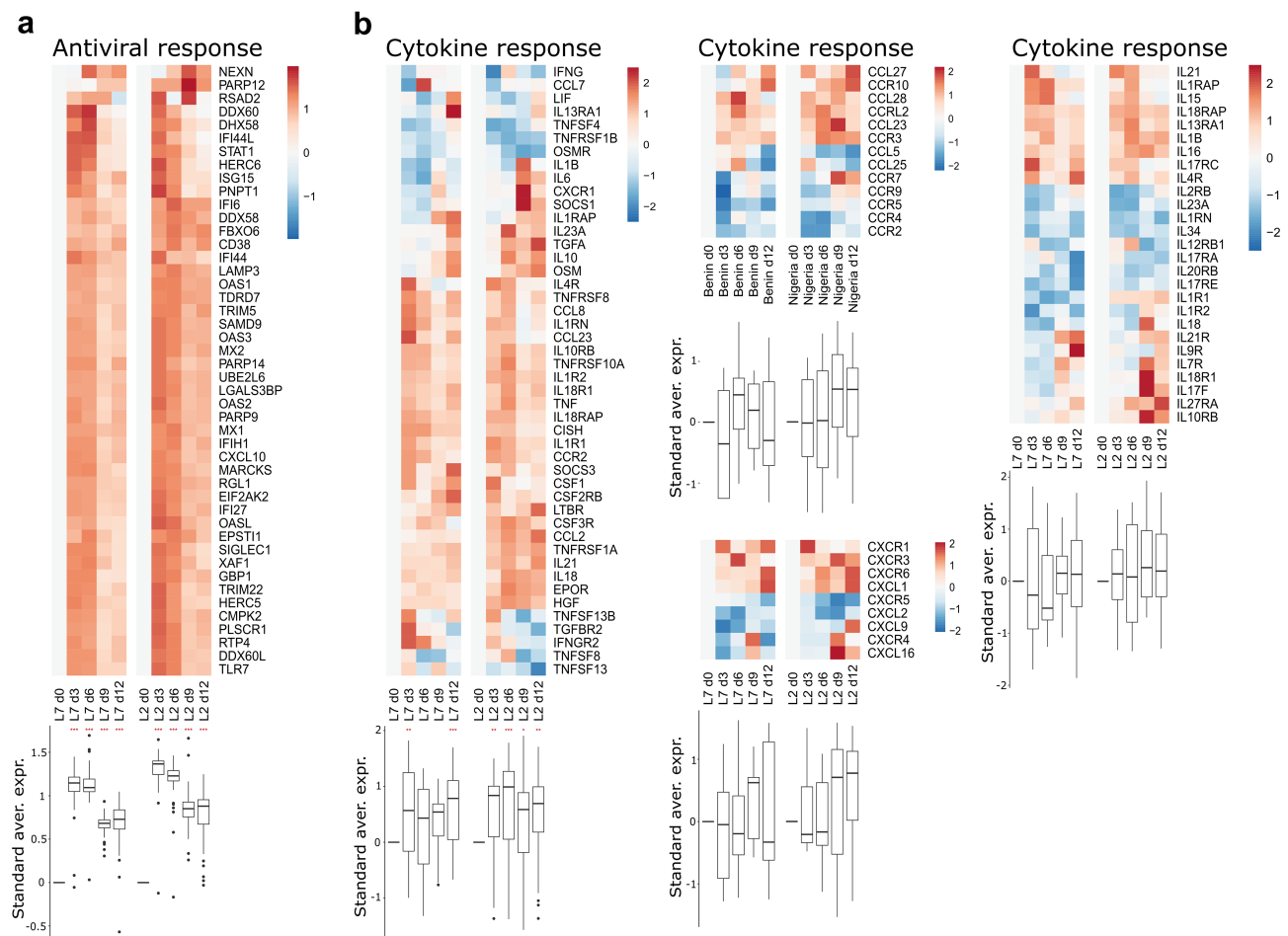
We performed RNA-seq on RNA extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected every three days for 12 days after challenge with each viral strain. We then analyzed the transcriptomic response using predefined gene sets corresponding to various responses. The differential expression of selected genes was evaluated relative to the expression on day 0, at the time of challenge (Figures 3 and 4). We detected strong upregulation of genes related to the antiviral response on days 3 and 6 in the PBMCs of animals infected with either strains L7 or L2 (Figure 3). Their expression tended to diminish by days 9 and 12, but was still significantly elevated relative to day 0. Many genes related to the cytokine response were also upregulated as soon as day 3 in both groups and the expression of many cytokines remained elevated until day 12 (Figure 3). The induction of certain cytokine genes was more pronounced in the L2- than L7-infected animals, notably *CCL2*, *IL21*, and *IL18*, for which upregulation was observed as soon as day 6 post-challenge (Figure 3, left panel). On day 9, expression of the genes *IL7R*, *IL18R1*, *IL17F*, *IL27RA*, and *IL10RB* was also higher relative to day 0 for the L2-infected animals than on day 9 for the L7-infected animals (Figure 3, right panel). In the L7 group, genes related

to the monocyte response were strongly upregulated on day 3 and their expression then diminished over time but remained significantly higher than on day 0 (Figure 4). In the L2 group, the monocyte gene set was less strongly upregulated, the upregulation peaked later, on day 6, and then many genes of this gene set were downregulated (Figure 4). Consequently, this gene set was no longer upregulated on day 9 and day 12 relative to day 0. Genes involved in the T cell-response were rapidly downregulated in both groups (Figure 4). In the L7-infected animals, downregulation was less marked on days 6 and 9 but still significantly different from their expression on day 12. In the L2-infected animals, we observed strong upregulation of the gene set on day 9 and the expression of many genes remained elevated up to day 12. Significant downregulation of the overall expression of genes involved in the B cell response was observed for both groups at every time point post-challenge and was particularly marked on day 6 (Figure 4).

### Histopathology of LASV L2 and L7 infection

A histopathological analysis was carried out in several lymphoid and systemic organs that are known to play a key role in Lassa pathogenesis. L7-infected monkeys showed similar pathology in most organs except the liver where slight differences were observed between different animals; we, therefore, present the data for only one animal in the figures (except for the liver). Similarly, the histological findings of fatally L2-infected animals were consistent; hence we show the data for one deceased animal in comparison to L2.2, which was the only non-fatal case of Lassa fever in this study. The control animals were historical controls from our previous studies [13].

Notably, fatally infected animals exhibited histologic lesions that reflected the respiratory distress noted clinically, with considerable thickening of the alveolar septum and advanced interstitial pneumonia, regardless of the strain they were infected with (Figure 5). Interestingly, animal L2.2 showed only minor septal thickening, although the alveolar space was still reduced relative to mock-infected animals. Furthermore, we observed signs of disruption of the lymphoid tissues of L7-infected animals (Figures 6 and S2). In the mesenteric lymph nodes, secondary lymphoid follicles were essentially unstructured, with little delimitation between the mantle and cortical sinus and almost no germinal center (Figure 6). The splenic marginal zone of these animals was also widely disrupted and sometimes entirely destroyed (Figure S2). Infections with L2 and L7 strains induced the



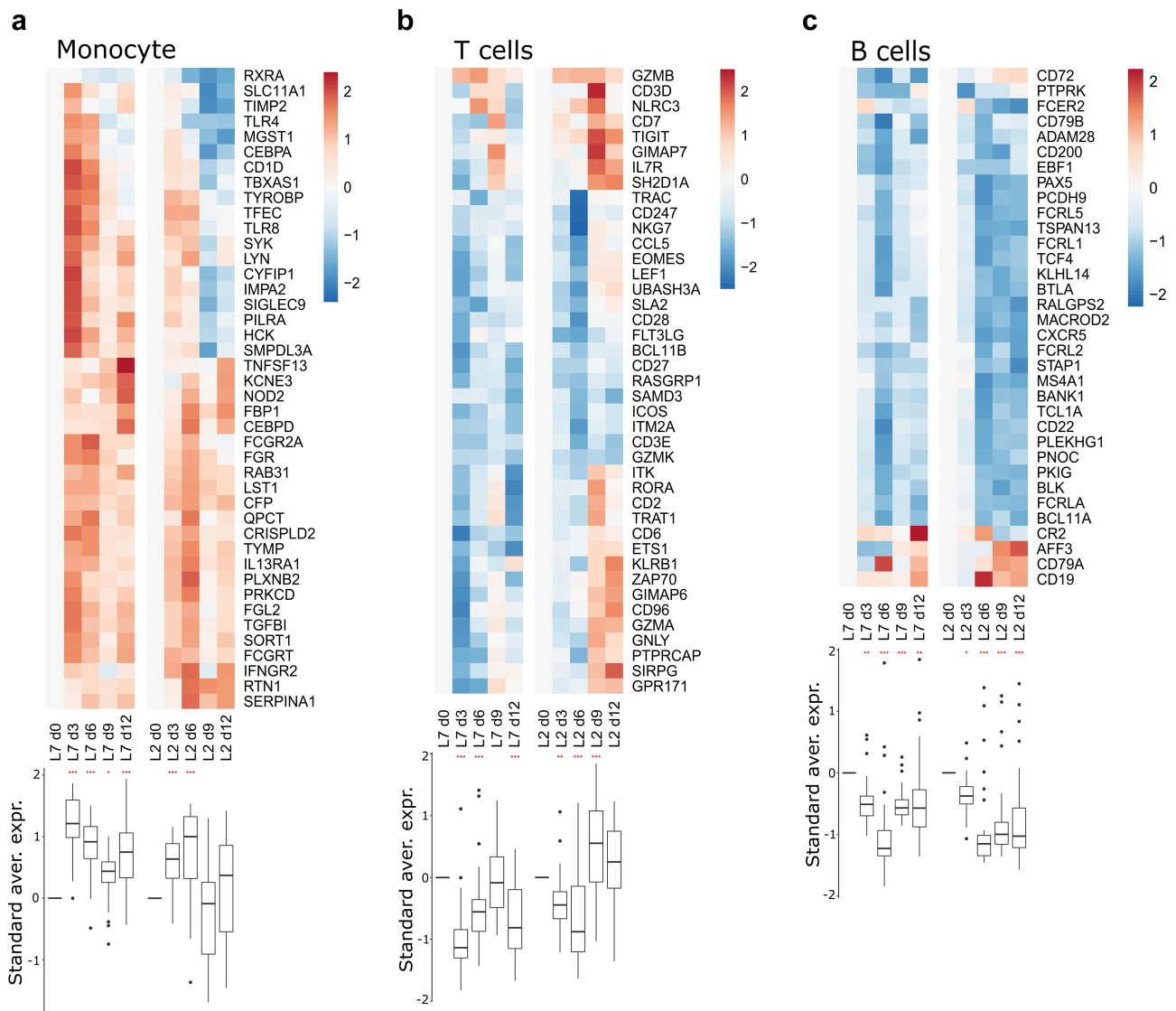
**Figure 3.** Transcriptomic analyses of PBMCs from infected animals. Gene expression heatmap of two gene sets: (a) antiviral response and (b) cytokine response. The standardized average expression (Standard aver. expr.) of the genes for each gene set was plotted against the time after challenge and normalized to day 0. For each gene set, a two-way ANOVA, adjusted for the viral strain and the day, was fitted to the standardized (centered and scaled) gene expression to summarize the global direction of regulation of the gene sets. Comparisons of average gene expression between day 0 and other days were performed using contrasts of the linear model (post-hoc Tukey HSD test). Red asterisks indicate significant differences from the expression on day 0 \* $P \leq .05$ , \*\* $P \leq .01$ , \*\*\* $P \leq .001$ .

appearance of tingible body macrophages in the lymphoid follicles of the lymph nodes and spleen (Figures 6 and S2). Hepatitis, nephritis, encephalitis, and meningitis were detected in all animals, including L2.2, as mononuclear cell infiltration was found in all organs, demonstrating a general inflammatory state caused by both strains of LASV. Finally, hepatic steatosis was identified in animals L7.1 and L2.1 (Figure 7).

We identified the infected cells in all organs we investigated for both L2 and L7. Hepatocytes showed a very wide range of infection patterns (Figure 7). Indeed, we detected no infected hepatocytes in L2.2 and L2.3 and only very small and sparse clusters of infected hepatocytes in L2.1, L7.2, and L7.3, whereas infection was widespread throughout the hepatic tissue in L7.1. Nevertheless, infected cells were identified within the periportal infiltrates of mononuclear cells

in L2-infected animals. Endothelial cells were very permissive to L7 infection, as identified in the kidneys (Figure 8) and lungs (Figure 5). As in the liver, we detected infected immune cells in the perivascular infiltrates of the kidney during L2 infection (Figure 7). In the spleen, L7-infected cells were found both in the lymphoid follicles (marginal zone, mantle, and germinal center) and the red pulp, whereas L2 infection appeared to remain limited to the marginal zone and germinal centers, and was only sparse in the red pulp (Figure S2). In the mesenteric lymph node, fatal L2 infection was characterized by a significant amount of viral material in the germinal centers, whereas the few infected cells were disseminated in the sinuses and in the medulla in other conditions (Figure 6).

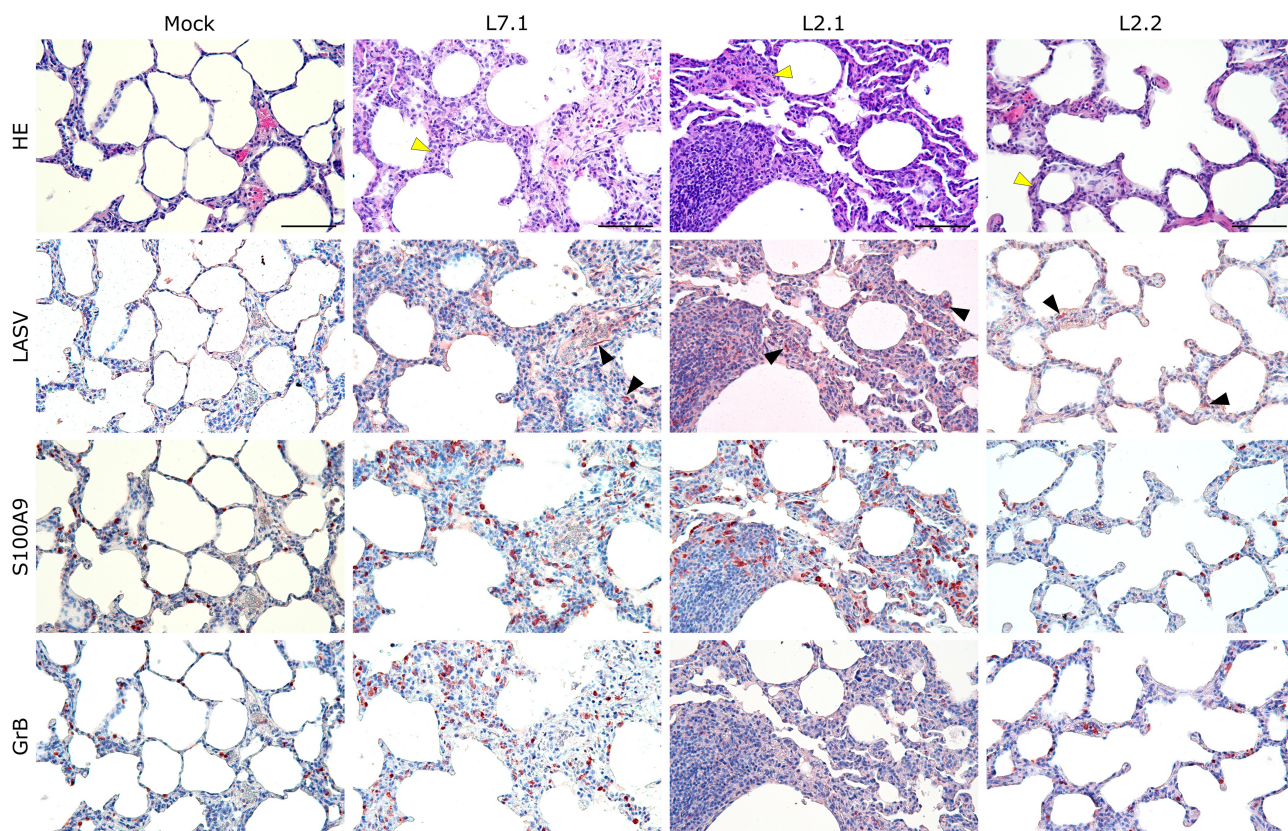
S100A9 immunostaining also showed widespread neutrophilic infiltration in the lungs, liver, kidneys,



**Figure 4.** Transcriptomic analyses of PBMCs from infected animals. Gene expression heatmap of three gene sets: (a) monocyte response, (b) T-cell response, and (c) B-cell response. The standardized average expression (Standard aver. expr.) of the genes for each gene set was plotted against the time after challenge and normalized to day 0. For each gene set, a two-way ANOVA, adjusted for the viral strain and day, was fitted to the standardized (centered and scaled) gene expression to summarize the global direction of regulation of the gene sets. Comparisons of average gene expression between day 0 and other days were performed using contrasts of the linear model (post-hoc Tukey HSD test). Red asterisks indicate significant differences from the expression on day 0 \* $P \leq .05$ , \*\* $P \leq .01$ , \*\*\* $P \leq .001$ .

and adrenal glands during fatal infection (Figures 6–8 and S3), which was not limited to the clusters of infiltrated immune cells but widespread throughout the functional areas of each organ. Conversely, the functional areas of systemic tissues of L2.2 remained mostly free of neutrophil invasion, although some neutrophils were found in perivascular infiltrates only. Many neutrophils were also detected in the sub-capsular and cortical sinuses of the lymph nodes of fatally infected animals, whereas L2.2 showed no sign of neutrophil infiltration in the lymph nodes, similar to the mock-infected animals (Figure 6). Deceased animals also

showed widespread neutrophil invasion of the splenic marginal zone and red pulp (Figure S2). We detected a considerable number of granzyme B-positive cells in the alveolar septum of L7-infected animals (Figure 5). All infected animals showed a moderate increase in the number of cytotoxic cells in all other organs except the adrenal glands, regardless of the tissue or strain. Importantly, microglial activation – detected by enhanced Iba-1 immunostaining and reduced size of the dendrites – in all layers of the brain and cerebellum was strong and similar in all infected animals (Figure 9). We identified microglial nodules both in



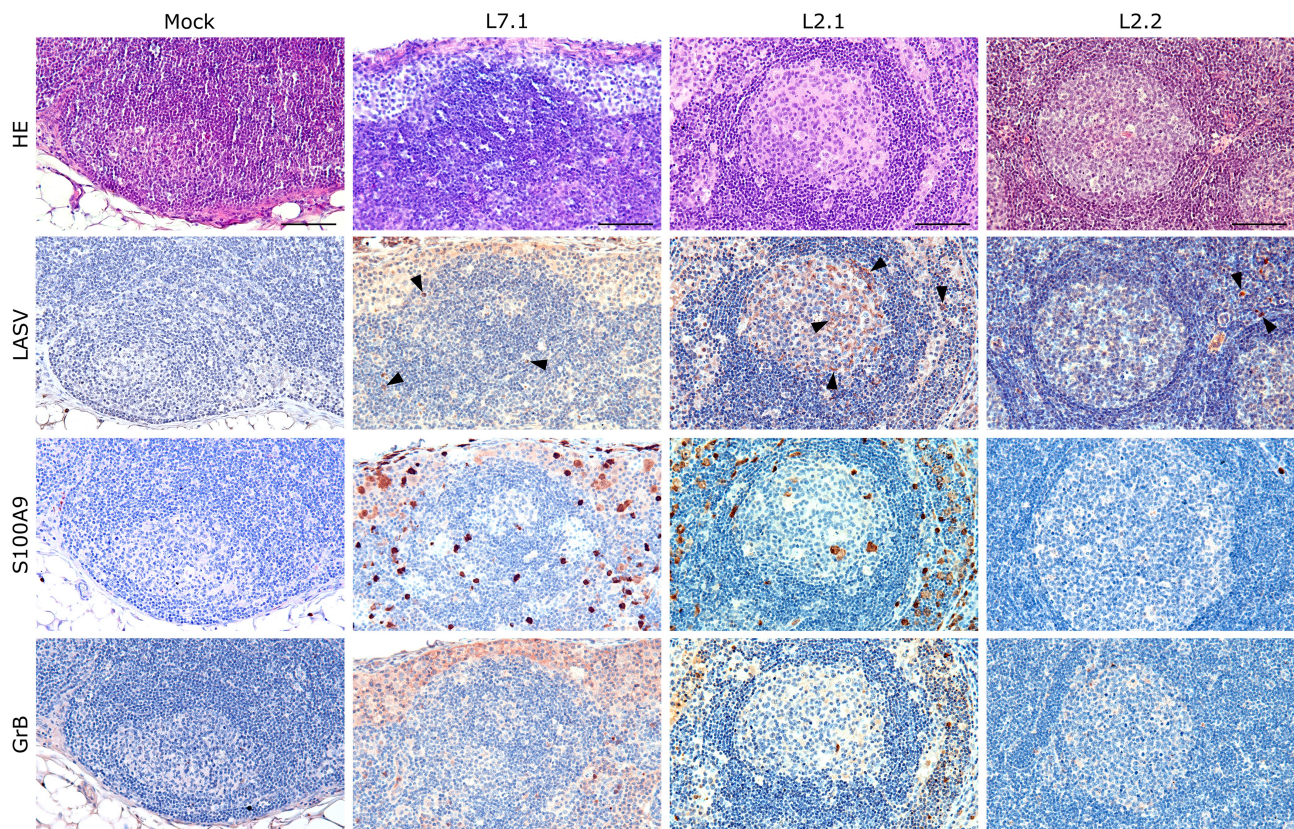
**Figure 5.** Comparative histopathology of the lung after challenge with L7 or L2 LASV strains. HE: hematoxylin-eosin coloration. Yellow arrowheads show severe (L7.1 and L2.1) or mild (L2.2) septal thickening. LASV: immunostaining of LASV glycoprotein-2c. Black arrowheads show infected cells. S100A9: immunostaining of neutrophils. GrB: immunostaining of cytotoxic cells. Scale bar: 100  $\mu$ m.

the white and gray matter of the brain (Figure 9, Brain, see magnifications) and in the molecular and granular layers, as well as in the white matter of the cerebellum (Figure 9, Cerebellum).

## Discussion

Here we describe the pathophysiology of two LASV strains, L2 and L7, in the cynomolgus monkey model. These two strains were isolated from samples collected from patients who died from Lassa fever during the 2016 outbreak in Benin [6]. In monkeys, these two strains showed different pathogenicity. L7-infected animals all died within 15 days, whereas one L2-infected animal survived the infection and another died only on day 20. Strain L7 appears to be as pathogenic as strains from lineage IV, Josiah and Z-132, which usually cause uniform lethality within 15 days in cynomolgus monkeys [13–15,18,22,23]. On the contrary, the pathogenicity of strain L2 is closer to that of strains Soromba-R and AV from lineage V in monkeys [4,24]. Indeed, the challenge of three macaques with  $10^4$  FFU of LASV Soromba-R led to one death on day 12, one

death on day 18, and a third animal survived the challenge [15]. Similarly, the challenge of three monkeys with  $10^3$  FFU of LASV AV led to heterogeneous mortality, with one animal dying on day 16, a second on day 21, and a third surviving the infection [19]. In a recent study, four infected monkeys all survived infection with a similar dose of LASV AV [13]. These observations suggest that strains from lineage V, which have, thus far, caused only two known human deaths [24,25], are less pathogenic than strains from other lineages. But it is not the case in all lineages. While L2 appeared less pathogenic than L7 in monkeys, LASV strain 0043/LV/14 from Lineage II is as pathogenic as strains from lineage IV and VII in monkeys, causing the death of infected animals within 15 days after a challenge with  $10^3$  FFU [20]. Very recently, cynomolgus monkeys were infected with  $10^4$  TCID<sub>50</sub> of two strains belonging to lineage III, isolated from patients during a 2018 Nigerian outbreak [16]. Strain NML-33 caused the death of the four infected monkeys within 14 days. Strain NML-57 only caused one death on day 16 and the other three animals survived the infection. These observations underscore the necessity to study



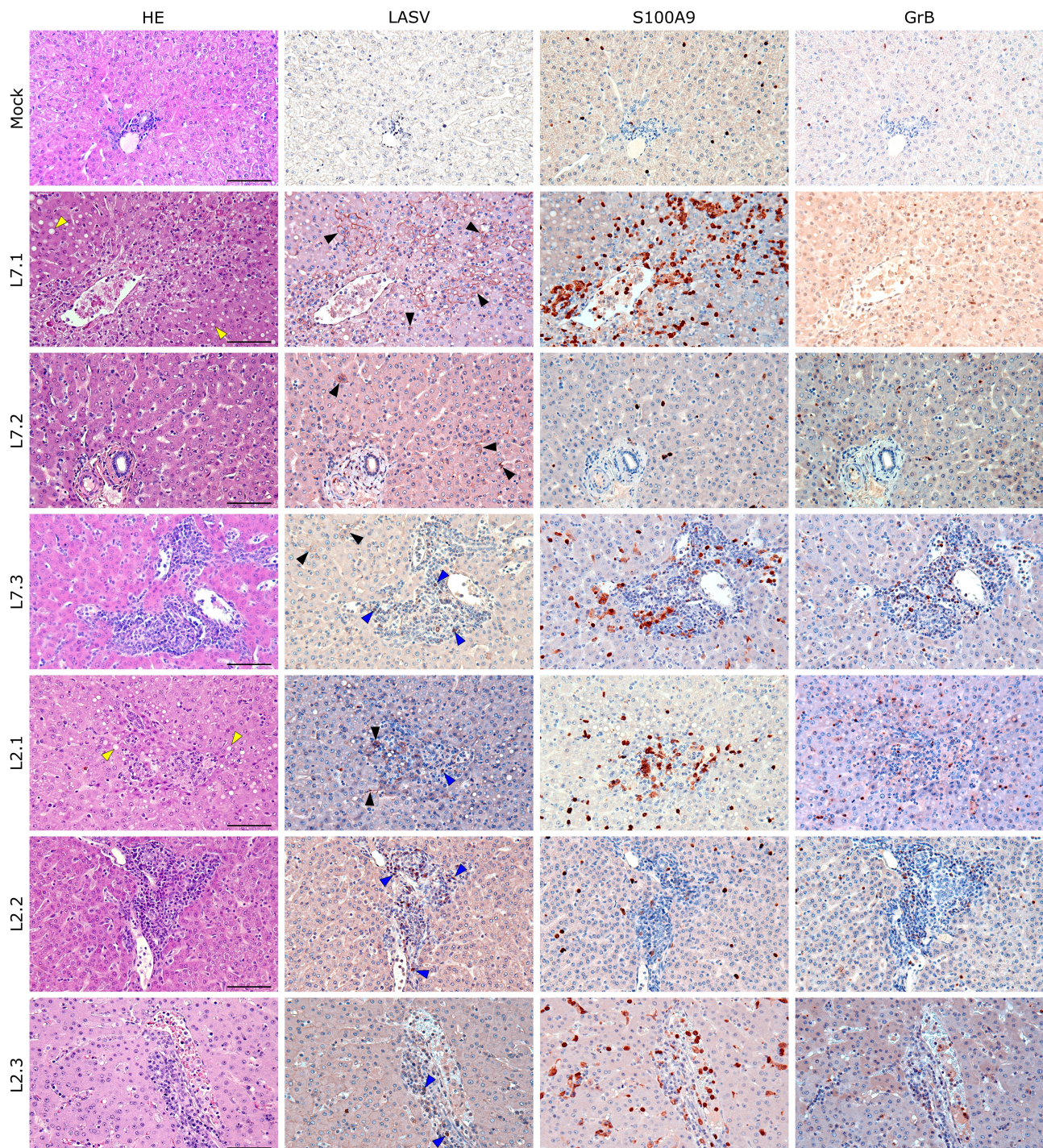
**Figure 6.** Comparative histopathology of a mesenteric lymph node after challenge with L7 or L2 LASV strains. HE: hematoxylin-eosin coloration. LASV: immunostaining of LASV glycoprotein-2c. Black arrowheads show infected cells in the mantle, the germinal center and the cortical sinus. S100A9: immunostaining of neutrophils. GrB: immunostaining of cytotoxic cells. Scale bar: 100  $\mu$ m.

a wide variety of LASV strains belonging to different lineages to understand the pathophysiology of Lassa fever and the various outcomes associated with an infection. This is particularly important, as recent analyses have demonstrated that many LASV strains belonging to different lineages can co-circulate during a single outbreak [9].

Independently of the outcome, all animals infected with L7 and L2 developed signs of disease and presented hallmarks of LASV infection between the day of challenge and day 9. These included stress, loss of weight and tonus, fever, an increase in AST and ALT levels, and lymphopenia. Viremia appeared earlier and increased more rapidly in L7-infected animals, suggesting that L7 and L2 may show different virulence. At the time of necropsy, the titers found in organs were higher overall in L7- than L2-infected animals. Histopathological analyses showed viral replication to be mostly restricted to endothelial cells, except for the liver, where hepatocytes were also infected. The health of L7-infected animals considerably declined after 10 days and they showed severe hypothermia at the time of death, as observed in Josiah-challenged animals

[13,23]. In the L2 group, animal L2.1, which died on day 12, showed epistaxis, which may indicate a coagulation disorder, as observed in NML-33-infected animals [16]. Animal L2.3 was euthanized on day 20 after showing serious balance issues, which may suggest neurological illness. Hearing deficits, a common complication of Lassa fever, have been described in Josiah-infected monkeys [26] and may explain, at least in part, the balance issues. We were not able to evaluate potential hearing deficits of infected monkeys in our BSL-4 facilities. At the time of necropsy, we observed a strong neuro-inflammation in all monkeys regardless of the strain or the outcome, characterized by meningitis, encephalitis, diffuse microglial activation and formation of microglial nodules in the brain and the cerebellum. Interestingly, the animal L2.2 that survived and had no detectable viremia after day 12 still exhibited histological signs of encephalopathy at the terminal point of the study, suggesting that neurological disorder can last for a prolonged time after recovery from LASV infection. Multifocal gliosis and inflammation of the brain and the cerebellum have also been described during the course of non-



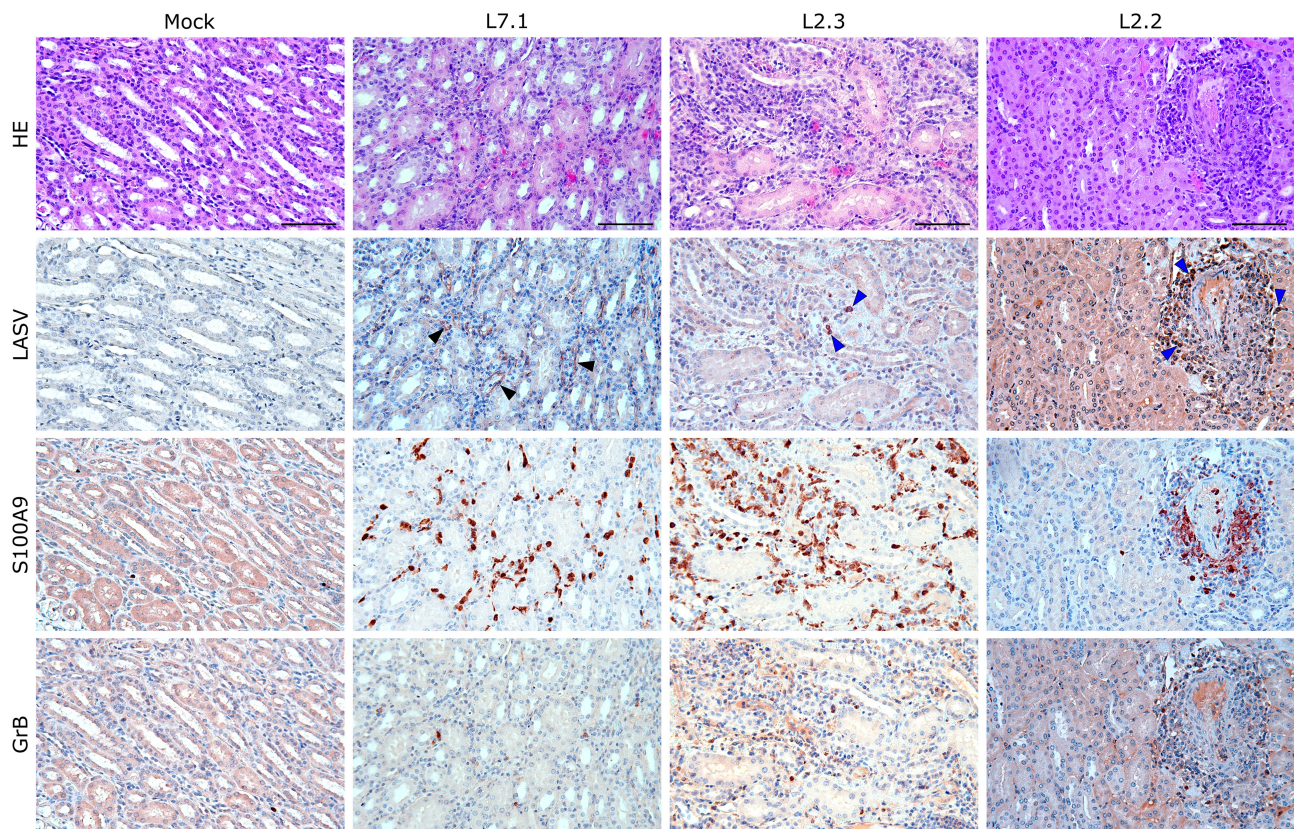


**Figure 7.** Comparative histopathology of the liver after challenge with L7 or L2 LASV strains. HE: hematoxylin-eosin coloration. Yellow arrowheads show signs of hepatic steatosis. LASV: immunostaining of LASV glycoprotein-2c. Black arrowheads show infected hepatocytes and interstitial cells, blue arrowheads show infected immune infiltrating cells. S100A9: immunostaining of neutrophils. GrB: immunostaining of cytotoxic cells. Scale bar: 100  $\mu$ m.

fatal Soromba-R – lineage V – infection [15]. In humans, a third of the patients enrolled in a large Nigerian cohort presented central nervous system manifestations during LASV illness and treatment, and encephalopathy was strongly associated with fatal issue [27]. These previous findings, combined with

the extensive neuro-inflammation we describe in this study suggest that the neurological manifestations caused by Lassa fever should not be underestimated.

Deceased macaques infected by L2 or L7 all exhibited acute respiratory distress. Although we lack specific clinical analyses – volumetric monitoring, lung

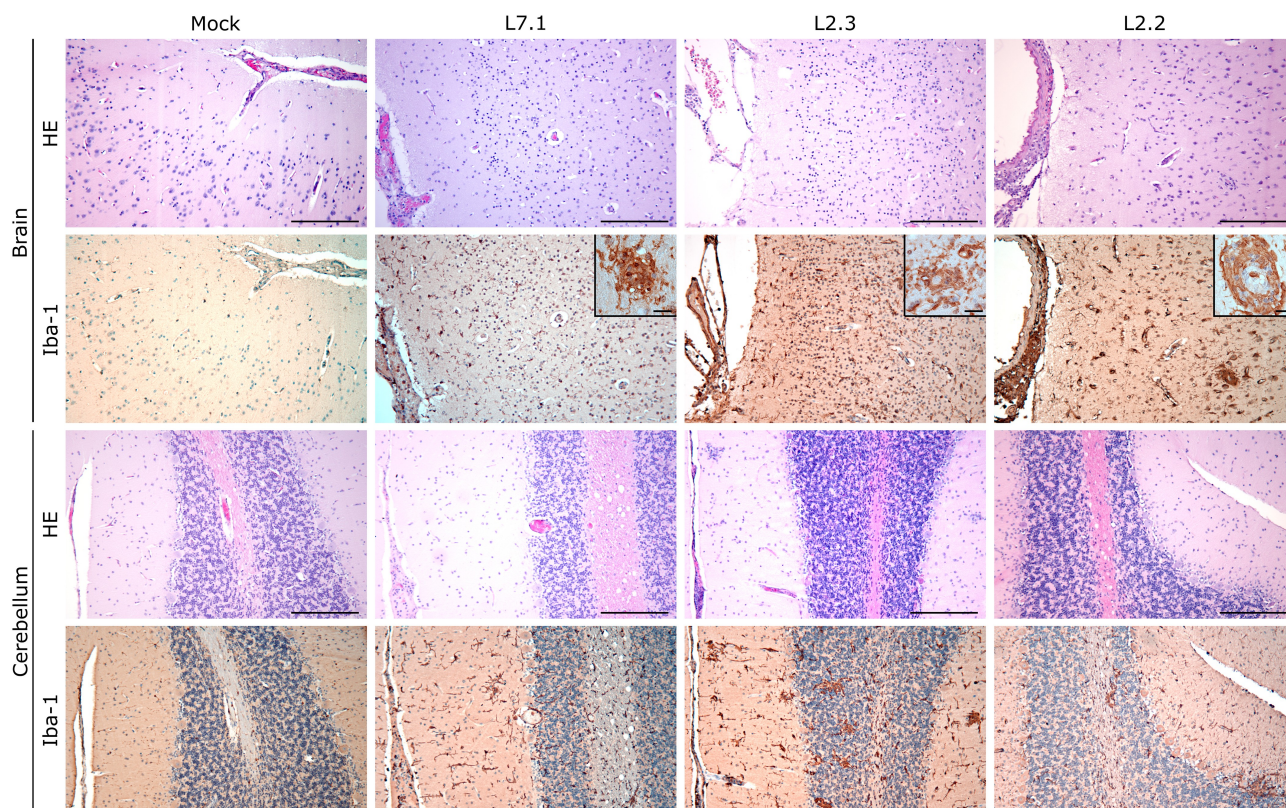


**Figure 8.** Comparative histopathology of the kidney after challenge with L7 or L2 LASV strains. HE: hematoxylin-eosin coloration. LASV: immunostaining of LASV glycoprotein-2c. Black arrowheads show infected endothelial cells, blue arrowheads show infected immune infiltrating cells. S100A9: immunostaining of neutrophils. GrB: immunostaining of cytotoxic cells. Scale bar: 100  $\mu$ m.

radiography – to characterize the respiratory syndrome, histological observations show evidence of advanced interstitial pneumonia, with diffuse infiltration of mononuclear cells and thickening of the alveolar septa. Similar pulmonary manifestations were described by previous studies investigating the pathophysiology of various strains of LASV, notably from lineage III (NML-33), IV (Josiah) and V (Soromba-R) [13,15,16]. In Soromba-R-infected animals, Safronetz and colleagues partly attributed these clinical signs to the strong increase of TNF- $\alpha$  observed during the course of the disease and which is known to correlate with vascular permeability [15,28]. More recently, animals infected with NML-33 and NML-37 strains also develop a strong pulmonary disease in absence of TNF- $\alpha$  secretion [16]. In our study, the five animals who died before the end of the experiment presented pulmonary manifestations but only three of them presented a terminal increase in plasmatic levels of TNF- $\alpha$ . Therefore, TNF- $\alpha$  secretion was probably not the major cause of the acute lung pathology we described, but this pathology was strongly associated with fatal outcome. This corroborates results obtained with a large human cohort dataset showing a significant

association between respiratory distress and outcome during Lassa fever [27]. Altogether, these recent findings tend to show that the impairment of the respiratory function might be an unneglectable effect of LASV infection, although more investigations are to be led to better characterize this respiratory syndrome.

The surviving animal, L2.2, likely survived after mounting an efficient cellular response. Indeed, L2.2 was the only animal to develop LASV-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses between day 10 and day 15. Transcriptomic analyses also showed that genes associated with the T-cell response were only upregulated in L2-infected animals starting from day 9 post-infection. These observations are consistent with the crucial role of the T-cell response in the protection of human survivors or immunized monkeys [19,23,29–32]. The antibody response did not presumably participate in protection, as all L2- and L7-infected animals produced similar levels of LASV-specific IgG before death. At the terminal stage of the disease, we observed strong dysregulation of the inflammatory response in all animals that died before day 15, with a substantial release of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators that was particularly marked in the L7-infected animals. On the contrary,



**Figure 9.** Comparative histopathology of the brain and cerebellum after challenge with L7 or L2 LASV strains. HE: hematoxylin-eosin coloration. Iba-1: immunostaining of the microglia (dim in normal microglia, bright inactivated microglia). Scale bar: 250  $\mu$ m. Scale bar in magnifications: 25  $\mu$ m.

animals L2.2 and L2.3 showed a more balanced inflammatory response, similar to that observed in AV-infected animals [13]. The cells responsible for the release of soluble mediators are likely activated monocytes and macrophages. PBMCs showed a strong activated monocyte signature in the L7-infected animals as early as day 3 post-infection and until day 12, and the overall activation of monocyte genes inversely mirrored the expression of T cell-related genes. In L2-infected animals, the monocyte response was only upregulated between days 3 and 6, and after day 6, we detected the upregulation of T cell-related genes, which persisted until day 12. Thus, the strong activation of monocytes and macrophages producing high amounts of cytokines may explain, at least partially, the absence of proper T-cell responses during fatal Lassa fever, as proposed previously for Josiah-infected monkeys [13]. The combined use of immunomodulatory and antiviral molecules may therefore be a strategy to treat Lassa fever patients. Recently, the JAK/STAT inhibitor ruxolitinib was shown to prevent terminal hypothermia and pleural effusion in a mouse model of arenavirus hemorrhagic fever [33], without altering viral replication, presumably by dampening the cytokine response [34].

In the absence of efficient treatment, vaccination remains the most viable means to control LASV infection during outbreaks. Many vaccines are being developed and at least two are already in clinical trials [20,22,26,35,36]. According to the World Health Organization, a LASV vaccine should protect against LASV lineages I-IV. Our results demonstrate that strains from lineage VII should also be considered in vaccine testing, as they may be at least as pathogenic as the historical strains from lineage IV used to generate all vaccines and are highly divergent from them. Our results also support the testing of new emerging LASV strains in animal models to understand specific aspects of their pathogenesis and to develop better countermeasures.

## Materials and methods

### Study design

Animals were subcutaneously (SC) challenged with 3,000 focus-forming units (FFU) of LASV BEN-16081 lineage II (L2) [6] or 3,000 FFU of BEN-16131 lineage

VII (L7) [6]. After challenge, animals were monitored and were attributed clinical scores on the basis of observed clinical signs, body temperature, body weight, feeding, dehydration and behavior, as previously described [18,23]. A clinical score of 15 or above was the limit point for euthanasia in order to limit animal suffering. Animals were anesthetized every three days until day 15 then once a week until the end of the experiment at day 28. During anesthesia, blood, oral and nasal swabs, and urine were collected in parallel of the medical exam. All procedures were approved by the Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (2018100414445313) and the Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Rhône Alpes (2018101211262022).

### **Cell cultures, virus, and infections**

Vero E6 cells were grown in Glutamax Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 0.5% penicillin-streptomycin. Stocks of LASV BEN-16081 lineage II (L2) and BEN-16131 lineage VII (L7) were produced and titrated by focus-forming assay on Vero E6 cells. Briefly, Vero E6 cells were infected for 1 h with decimal dilutions of the viral stocks then overlaid with carboxy-methylcellulose diluted in DMEM. Seven days later, cells were washed, fixed, permeabilized and stained with mouse anti-LASV antibodies (kindly provided by the CDC, Atlanta) and goat anti-mouse antibodies conjugated to alkaline phosphatase. Infectious foci were revealed by incubation with the NBT/BCiP substrate (ThermoFisher) and counted manually. Inoculums were prepared in phosphate buffered saline (PBS). Animals received 3,000 focus-forming units (FFU) by the SC route. Viral titers in plasma and organs were measured by focus-forming assay on Vero E6 cells.

### **Quantitative RNA analysis**

Quantitative PCR for viral RNA was performed with the SensiFAST Probe No-ROX One-Step kit (Bioline), and NP-specific primers and probes for the L2 and L7 strains. Quantification was done thanks to NP-specific synthetic RNA standards as previously described [37].

### **T-cell activation assay**

LASV-specific T-cells against L2 and L7 strains were determined as described elsewhere [18]. Briefly, fresh whole blood was incubated with overlapping GPC or

NP peptides covering the full sequence of the proteins (15 amino acid long, 11 residues overlapping, 1 µg/ml each) and anti-human CD28 and anti-human CD49d antibodies (2 µg/ml, BD Biosciences) and Brefeldin A (10 µg/ml, Sigma-Aldrich) for 6 h at 37°C. Staphylococcus enterotoxin A (SEA) (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) and PBS were used as positive and negative control of activation, respectively. PBS-ethylene diamine triacetic acid (EDTA) (2 mM final concentration) was then added to the samples before staining with APC mouse anti-human CD3 (clone SP34-2), Alexa Fluor<sup>R</sup> 700 mouse anti-human CD4 (clone L200), and APC-H7 mouse anti-human CD8 (clone SK1) (BD Biosciences). Samples were then treated with PharmLyse (BD Biosciences) to lyse red blood cells. Cells were fixed and permeabilized using the FoxP3 staining buffer set (Miltenyi Biotec) before intracellular staining with antibodies to IFN $\gamma$  (clone B27, PE) and TNF $\alpha$  (clone Mab11, Pe-Cy7) (BioLegend). Cells were analyzed by flow cytometry using a 10-color Gallios cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed using Kaluza 2.1 software (Beckman Coulter).

### **Hematology and biochemistry**

The number of circulating CD8 and CD4 T cells, B cells, NK cells, monocytes, and granulocytes was determined by flow cytometry using the following antibodies: V540 mouse anti-human CD56 (clone B159), V500 mouse anti-human CD3 (clone SP34-2), FITC Mouse anti-NHP CD45 (clone D058-1283), PE mouse anti-human CD10 (clone HI10 $\alpha$ ), PE-Cy<sup>TM</sup>7 mouse anti-human CD20 (clone 2H7), Alexa Fluor<sup>R</sup> 700 mouse anti-human CD4 (clone L200), APC-H7 mouse anti-human CD8 (clone SK1) all from BD biosciences and APC mouse anti-human NKp80 (clone 4A4.D10) from Miltenyi Biotec. Cells were analyzed by flow cytometry using a 10-color Gallios cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed using Kaluza 2.1 software (Beckman Coulter). Plasma concentrations of ALT, AST, and CRP were measured using a Pentra C200 analyzer (Horiba Medicals).

### **Enzyme-Linked immunosorbent assays**

LASV specific IgG antibody titers were determined as described elsewhere [18]. Briefly, polysorp plates (Nunc) were coated overnight with a lysate of LASV-infected (L2 or L7) or mock-infected Vero E6 cells as positive and negative antigens, respectively. Plates were then blocked with PBS/2.5% bovine serum albumin (BSA) for 1 h, and plasma samples were incubated for 1 h on coated plates at dilutions of 1:250, 1:1,000,

1:4,000, and 1:16,000. Plates were then incubated with polyclonal peroxidase-conjugated antibodies directed against NHP IgG  $\gamma$ -chain (Sigma). Tetramethylbenzidine (TMB) (Eurobio) was finally added and optical densities measured using a Tecan plate reader (Tecan).

IFN $\alpha$ 2 concentrations were determined using a human IFN2-specific ELISA (IFN $\alpha$  human matched antibody pair, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions, and a Tecan plate reader (Tecan).

### Luminex

The plasma concentrations of IFN $\gamma$ , IL2, IL10, IL15, IL1RA, IL6, IL8, MCP1, TNF $\alpha$ , MIP1 $\beta$  and IL18 were measured using the NHP Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel I (Merck). The plasma concentrations of sCD137, Granzyme B, FasL and perforin were measured using the NHP Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel II (Merck). Plates were prepared according to the manufacturer's instructions and analyzed on a Magpix instrument (Merck).

### Transcriptomic analysis

Total RNA was extracted from PBMCs using the RNeasy extraction kit (Qiagen). RNA samples quantification and qualification, mRNA poly(A)-capture and library preparations were performed as described elsewhere [23]. Sequencing was performed using a NextSeq 500 Flow Cell High Output SR75 instrument with nine samples per flow cell.

The Sequana RNA-seq pipeline was used to perform bioinformatics analyses [38]. Cutadapt version 1.11 was used to clean reads of adapter sequences and low-quality sequences [39]. Only sequences of at least 20 nucleotides in length were considered for further analysis. STAR version 2.5.0a [40], with default parameters, was used for alignment to the reference genome. Genome was downloaded from UCSC and annotation track (.gtf Ensembl Genes) was retrieved from UCSC (genome: Rhesus, assembly Nov. 2015 Mmul\_8.0.1). Genes were counted using featureCounts version 1.4.6-p3 [41] from the Subreads package (parameters: -t gene -g ID -O -s 2). R software version 4.0.4 was used for statistical analyses. Insufficiently expressed genes were filtered out by removing those with no reads in at least 90% of samples and a cpm <1 for at least three samples, as recommended in the DESeq2 vignette [42]. Differential analysis was performed using the DESeq2 package [42] with a statistical model adjusted for the effect of the day, viral strain, interaction between these

two factors, and pairing within monkeys. A Wald test was used for comparisons among groups and *p*-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg multiple testing correction.

### Histology

At the terminal endpoint of the infections, the monkeys were euthanized, necropsies carried out, and the organs of interest harvested. The organ samples were fixed and inactivated in 10% formalin for a minimum of 14 days, dehydrated and immersed in paraffin using a STP120 device (Microm Microtech), and paraffin-embedded using a TES99 station (Tech-Inter). Three-micrometer thin sections were prepared using a RM2125 RTS microtome (Leica), and left to dry at room temperature. The sections were then deparaffinized with successive baths of xylene and absolute ethanol and dried before proceeding to the following steps (HE coloration or antigen immunostaining).

For hematoxylin-eosin coloration, sections were successively immersed in baths containing Gill's hematoxylin (Sigma), lithium carbonate, and eosin (Sigma). They were then dehydrated in absolute ethanol and xylene and mounted using Eurokit glue. Images were captured using a Leica DMIL microscope with LASX software.

For immunohistochemistry, sections were processed for antigen retrieval using a Retriever 2100 with citrate buffer (pH = 6), saturated with PBS/3% BSA for 30 min, and incubated overnight in primary antibodies diluted in PBS-3% BSA at 4°C. The following primary antibodies were used for immunostaining: a custom anti-Lassa mouse antibody directed against GP2c (kindly provided by the Special Pathogen Branch, CDC, Atlanta) at a 1:50 dilution, an S100A9 rabbit antibody (Invitrogen) at a 1:200 dilution, a Granzyme B mouse antibody (Abcam) at a 1:500 dilution, and an Iba-1 mouse antibody (Abcam) at a 1:500 dilution. The following day, endogenous peroxidases were quenched with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the sections were incubated for 30 min with a ready-to-use secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (*N*-Histofine, Microm Microtech). The sections were then incubated with either diaminobenzidine (DAB Quanto, ThermoFisher) or 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Sigma) for a length of time customized for each primary antibody, counterstained with Gill's hematoxylin diluted 1:2 in water, briefly bathed in an ammonium hydroxide solution, dehydrated with successive baths of absolute ethanol and xylene, and mounted using xylene glue (Eukitt). Images were captured using a Leica DMIL microscope with LASX software.

## Acknowledgements

We thank P. Regnard, P.H. Moreau, and L. Fellmann (SILABE, Strasbourg) for medical care given to the monkeys. We thank S. Mundweiller, S. Godard, E. Moissonnier, D. Thomas, S. Mely, B. Labrosse, D. Pannetier, and C. Leculier (P4 INSERM–Jean Merieux, US003, INSERM) for assistance in conducting the BSL-4 experiments. We thank M-A Dillies (HUB, Institut Pasteur) for helpful discussions. We thank G. Fourcaud and B. Lafoux (UBIVE, CIRI, Institut Pasteur) for technical help. We also thank L. Branco (Zalgen Labs) for providing recombinant proteins. We are grateful to the Coalition for Epidemic Preparedness and Innovations (R. Hatchett, G. Thiry, and M. Saville) and C. Gerke (Department of Innovation Development, Institut Pasteur) for invaluable support.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Funding

This study was entirely funded by a grant from the Coalition for Epidemic Preparedness and Innovations (CEPI-CfP-001).

## Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request (sylvain.baize@pasteur.fr).

## References

- [1] Smither AR, Bell-Kareem AR. Ecology of Lassa virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2021. Berlin, Heidelberg: Springer. doi:10.1007/82\_2020\_231.
- [2] Kouadio L, Nowak K, Akoua-Koffi C, et al. Lassa virus in multimammate rats, Côte d'Ivoire, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:1481–1483. DOI:10.3201/eid2108.150312.
- [3] Mateo M, Picard C, Sylla Y, et al. Fatal case of Lassa fever, Bangolo district, Côte d'Ivoire, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:1753–1756. DOI:10.3201/eid2509.190239.
- [4] Safronetz D, Lopez JE, Sogoba N, et al. Detection of Lassa virus, Mali. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(7):1123–1126. DOI:10.3201/eid1607.100146.
- [5] Whitmer SLM, Strecker T, Cadar D, et al. New lineage of Lassa virus, Togo, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:599–602. DOI:10.3201/eid2403.171905.
- [6] Yadouleton A, Picard C, Rieger T, et al. Lassa fever in Benin: description of the 2014 and 2016 epidemics and genetic characterization of a new Lassa virus. *Emerging Microbes Infect*. 2020;9(1):1761–1770. DOI:10.1080/22221751.2020.1796528.
- [7] Monath TP, Newhouse VF, Kemp GE, et al. Lassa virus isolation from *Mastomys natalensis* rodents during an epidemic in Sierra Leone. *Science*. 1974;185(4147):263–265.
- [8] Olayemi A, Cadar D, Magassouba N, et al. New hosts of the Lassa virus. *Sci Rep*. 2016;6:25280. DOI:10.1038/srep25280.
- [9] Kafetzopoulou LE, Pullan ST, Lemey P, et al. Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science*. 2019;363(6422):74–77. DOI:10.1126/science.aau9343.
- [10] McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Lassa fever. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;262:75–109.
- [11] Yun NE, Walker DH. Pathogenesis of Lassa fever. *Viruses*. 2012;4(10):2031–2048.
- [12] Mateer EJ, Huang C, Shehu NY, et al. Lassa fever-induced sensorineural hearing loss: a neglected public health and social burden. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006187.
- [13] Baillet N, Reynard S, Perthame E, et al. Systemic viral spreading and defective host responses are associated with fatal Lassa fever in macaques. *Commun Biol*. 2021;4(1):27. DOI:10.1038/s42003-020-01543-7.
- [14] Hensley LE, Smith MA, Geisbert JB, et al. Pathogenesis of Lassa fever in cynomolgus macaques. *Virology*. 2011;8:205. DOI:10.1186/1743-422X-8-205.
- [15] Safronetz D, Strong JE, Feldmann F, et al. A recently isolated Lassa virus from Mali demonstrates atypical clinical disease manifestations and decreased virulence in cynomolgus macaques. *J Infect Dis*. 2013;207(8):1316–1327. DOI:10.1093/infdis/jit004.
- [16] Stein DR, Warner BM, Audet J, et al. Differential pathogenesis of closely related 2018 Nigerian outbreak clade III Lassa virus isolates. *PLoS Pathog*. 2021;17:e1009966. DOI:10.1371/journal.ppat.1009966.
- [17] Andersen KG, Shapiro B, Matranga C, et al. Clinical sequencing uncovers origins and evolution of Lassa virus. *Cell*. 2015;162(4):738–750. DOI:10.1016/j.cell.2015.07.020.
- [18] Mateo M, Reynard S, Journeaux A, et al. A single-shot Lassa vaccine induces long-term immunity and protects cynomolgus monkeys against heterologous strains. *Sci Transl Med*. 2021;13(597). DOI:10.1126/scitranslmed.abf6348.
- [19] Baize S, Marianneau P, Loth P, et al. Early and strong immune responses are associated with control of viral replication and recovery in Lassa virus-infected cynomolgus monkeys. *J Virol*. 2009;83:5890–5903. DOI:10.1128/JVI.01948-08.
- [20] Cross RW, Xu R, Matassov D, et al. Quadrivalent VesiculoVax vaccine protects nonhuman primates from viral-induced hemorrhagic fever and death. *J Clin Invest*. 2020;130(1):539–551. DOI:10.1172/JCI131958.
- [21] Lefort V, Longueville JE, Gascuel O. SMS: smart model selection in PhyML. *Mol Biol Evol*. 2017;34:2422–2424.
- [22] Geisbert TW, Jones S, Fritz EA, et al. Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med*. 2005;2:e183. DOI:10.1371/journal.pmed.0020183.
- [23] Mateo M, Reynard S, Carnec X, et al. Vaccines inducing immunity to Lassa virus glycoprotein and nucleoprotein protect macaques after a single shot. *Sci Transl Med*. 2019;11(512). DOI:10.1126/scitranslmed.aaw3163.
- [24] Gunther S, Emmerich P, Laue T, et al. Imported Lassa fever in Germany: molecular characterization of a new

- Lassa virus strain. *Emerg Infect Dis.* 2000;6(5):466–476. DOI:10.3201/eid0605.000504.
- [25] Atkin S, Anaraki S, Gothard P, et al. The first case of Lassa fever imported from Mali to the United Kingdom, February 2009. *Euro Surveill.* 2009;14:19145
- [26] Cashman KA, Wilkinson ER, Shaia CI, et al. A DNA vaccine delivered by dermal electroporation fully protects cynomolgus macaques against Lassa fever. *Hum Vaccines Immunother.* 2017;13:2902–2911. DOI:10.1080/21645515.2017.1356500.
- [27] Okokhere P, Colubri A, Azubike C, 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.* 2018;18:684–695. DOI:10.1016/S1473-3099(18)30121-X.
- [28] Feldmann H, Bugany H, Mahner F, et al. Filovirus-Induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol.* 1996;70:2208–2214. DOI:10.1128/jvi.70.4.2208-2214.1996.
- [29] Overbosch F, de Boer M, Veldkamp KE, et al. Public health response to two imported, epidemiologically related cases of Lassa fever in the Netherlands (ex Sierra Leone), November 2019. *Eurosurveillance.* 2020;25(15):2000265. DOI:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.15.2000265.
- [30] Ter Meulen J, Badusche M, Kuhnt K, et al. Characterization of human CD4 + T-cell clones recognizing conserved and variable epitopes of the Lassa virus nucleoprotein. *J Virol.* 2000;74:2186–2192. DOI:10.1128/JVI.74.5.2186-2192.2000.
- [31] Ter Meulen J, Badusche M, Satoguina 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.* 2004;321(1):134–143. DOI:10.1016/j.virol.2003.12.013.
- [32] Wolf T, Ellwanger R, Goetsch U, et al. Fifty years of imported Lassa fever: a systematic review of primary and secondary cases. *J Travel Med.* 2020;27. DOI:10.1093/jtm/taaa035
- [33] Sahin M, Remy MM, Merkler D, et al. The Janus Kinase inhibitor ruxolitinib prevents terminal shock in a mouse model of arenavirus hemorrhagic fever. *Microorganisms.* 2021;9(3):564.
- [34] Yeleswaram S, Smith P, Burn T, et al. Inhibition of cytokine signaling by ruxolitinib and implications for COVID-19 treatment. *Clin Immunol.* 2020;218:108517. DOI:10.1016/j.clim.2020.108517.
- [35] Safronetz D, Mire C, Rosenke K, 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.* 2015;9:e0003736. DOI:10.1371/journal.pntd.0003736.
- [36] Salami K, Gouglas D, Schmaljohn C, et al. A review of Lassa fever vaccine candidates. *Curr Opin Virol.* 2019;37:105–111.
- [37] Schaeffer J, Carnec X, Reynard S, et al. Lassa virus activates myeloid dendritic cells but suppresses their ability to stimulate T cells. *PLoS Pathog.* 2018;14:e1007430. DOI:10.1371/journal.ppat.1007430.
- [38] Cokelaer T, Desvillechabrol D, Legendre R, et al. ‘Sequana’: a set of snakemake NGS pipelines. *J Open Source Soft.* 2017;2. DOI:10.21105/joss.00352.
- [39] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *Embnet.* 2011;17(1).
- [40] Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultra-fast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15–21. DOI:10.1093/bioinformatics/bts635.
- [41] Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923–930.
- [42] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.

## EMERGING INFECTIONS

# A single-shot Lassa vaccine induces long-term immunity and protects cynomolgus monkeys against heterologous strains

Mathieu Mateo<sup>1,2</sup>, Stéphanie Reynard<sup>1,2</sup>, Alexandra Journeaux<sup>1,2</sup>, Clara Germain<sup>1,2</sup>, Jimmy Hortion<sup>1,2</sup>, Xavier Carnec<sup>1,2</sup>, Caroline Picard<sup>1,2</sup>, Nicolas Baillet<sup>1,2</sup>, Virginie Borges-Cardoso<sup>1,2</sup>, Othmann Merabet<sup>1,2</sup>, Audrey Vallve<sup>3</sup>, Stéphane Barron<sup>3</sup>, Ophélie Jourjon<sup>3</sup>, Oriane Lacroix<sup>3</sup>, Aurélie Duthey<sup>3</sup>, Manon Dirheimer<sup>4</sup>, Gregory Jouvion<sup>5,6</sup>, Pierre-Henri Moreau<sup>7</sup>, Lyne Fellmann<sup>7</sup>, Caroline Carbonnelle<sup>3</sup>, Hervé Raoul<sup>3</sup>, Frédéric Tangy<sup>8</sup>, Sylvain Baize<sup>1,2\*</sup>

Copyright © 2021  
The Authors, some  
rights reserved;  
exclusive licensee  
American Association  
for the Advancement  
of Science. No claim  
to original U.S.  
Government Works

A safe and protective Lassa virus vaccine is crucially needed in Western Africa to stem the recurrent outbreaks of Lassa virus infections in Nigeria and the emergence of Lassa virus in previously unaffected countries, such as Benin and Togo. Major challenges in developing a Lassa virus vaccine include the high diversity of circulating strains and their reemergence from 1 year to another. To address each of these challenges, we immunized cynomolgus monkeys with a measles virus vector expressing the Lassa virus glycoprotein and nucleoprotein of the prototypic Lassa virus strain Josiah (MeV-NP). To evaluate vaccine efficacy against heterologous strains of Lassa virus, we challenged the monkeys a month later with heterologous strains from lineage II or lineage VII, finding that the vaccine was protective against these strains. A second cohort of monkeys was challenged 1 year later with the homologous Josiah strain, finding that a single dose of MeV-NP was sufficient to protect all vaccinated monkeys. These studies demonstrate that MeV-NP can generate both long-lasting immune responses and responses that are able to protect against diverse strains of Lassa virus.

## INTRODUCTION

Lassa virus (LASV) is endemic to West Africa, where it circulates in rodents, of which *Mastomys natalensis* is the main natural reservoir. Rodent-to-human transmission accounts for most human cases and often occurs during the dry season, when the rodent population peaks and comes into closer proximity to human populations to find resources (1, 2). Most infections follow mucosal contact with food or dust contaminated with rodent excrements. Human-to-human transmission is rare and mostly nosocomial after contact with infected fluids. Although most infected individuals survive an LASV infection, 15 to 50% of hospitalized patients die from Lassa fever. Severe complications may appear after recovery, with up to one-third of survivors developing a hearing deficit that can be irreversible (3). Lassa fever thus constitutes a major health problem in endemic areas and, in the absence of an effective treatment or vaccine, the World Health Organization (WHO) recently placed Lassa fever in the top priority list of viral diseases for which a vaccine is urgently needed.

With up to 180 million people at risk for Lassa fever (4), mass vaccination would indeed reduce the risk of major Lassa fever epidemics in both endemic and currently unaffected countries. To

achieve this goal, the Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI) has initiated a global program to develop vaccines against emerging infectious diseases and promote equitable access to vaccination for all during outbreaks, including substantial support of the development of an LASV vaccine from preclinical to clinical phases. The development of an LASV vaccine faces several challenges, and the WHO has published a Target Product Profile (TPP) that defines the characteristics of an appropriate LASV vaccine. A preventive vaccine is preferred over a reactive vaccine, and the vaccine should be safe for all age groups, preferentially provide protection after a single immunization, induce long-term protection to cover several Lassa fever seasons, and cross-protect against several LASV lineages (5).

Cross-protection is likely the most challenging aspect of the TPP. A recent metagenomic analysis of the LASV strains recovered from patients during the recent 2018 outbreak in Nigeria revealed a high diversity of genetically distinct cocirculating strains belonging to several different lineages (2). There are currently seven known lineages of LASV strains established on the basis of their genetic diversity (6, 7). Lineages I, II, and III include strains circulating in Nigeria (8). Lineage IV is represented by strains originating from Guinea, Sierra Leone, and Liberia (9). This includes the prototypic Josiah strain, isolated from a Sierra Leonean patient in 1976. Lineage V comprises strains from Mali and Côte d'Ivoire. Strains from lineage VI were isolated in *Hylomyscus pamfi* from Nigeria (6). Last, lineage VII is represented by strains that emerged in Togo and Benin during the epidemics of 2014 and 2016 (7). Although the distribution of each of the seven lineages appears to be restricted to specific geographic locations, the introduction of LASV from one country to another can occur (7, 10) and may become more frequent with the rapid development of West Africa. In addition, LASV is the most frequently exported hemorrhagic fever virus, in most cases by

<sup>1</sup>Unité de Biologie des Infections Virales Emergentes, Institut Pasteur, 69007 Lyon, France. <sup>2</sup>Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Université de Lyon, INSERM U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR5308, 69007 Lyon, France. <sup>3</sup>Laboratoire P4 INSERM–Jean Mérieux, INSERM US003, 69007 Lyon, France. <sup>4</sup>INSERM, Délégation Régionale Auvergne Rhône-Alpes, 69500 Bron, France. <sup>5</sup>Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité d'Histologie et d'Anatomie Pathologique, 94700 Maisons-Alfort, France. <sup>6</sup>Dynamic Research Group, Université Paris Est Créteil, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, USC ANSES, 94700 Maisons-Alfort, France. <sup>7</sup>SILABE, Université de Strasbourg, Fort Foch, 67207 Niederhausbergen, France. <sup>8</sup>Viral Genomics and Vaccination, Institut Pasteur, CNRS UMR-3569, 75015 Paris, France.

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



health care workers returning to their home countries after contracting the disease (11, 12). Although the WHO TPP indicates that vaccination should protect against lineages I to IV, conferring protection against all lineages would be preferred. However, the high diversity of LASV strains implies that vaccine development would have to address certain antigenic issues. The two major LASV antigens, the glycoprotein (GPC) and the nucleoprotein (NP), diverge considerably between lineages, with up to 15% dissimilarity between two NP proteins (8). This may be problematic, as all LASV vaccines in development are based on the antigens from lineage IV (13). In addition, GPC is often used as the sole antigen in vaccine candidates, whereas immune responses against NP, notably T cell responses, have been shown to be crucial for the recovery of LASV survivors (14–16) and the protection of vaccinated monkeys (10, 13).

Among the LASV vaccine candidates that have been developed over the past decades (5), several have shown promising results in preclinical studies and have therefore received support from the CEPI for further development. Vesiculovax, a modified recombinant vesicular stomatitis virus (VSV) that expresses LASV GPC, was shown to protect monkeys from a lethal challenge with a heterologous strain from lineage II when administered twice, along with a filovirus vaccine (17). Another VSV-based vaccine, rVSVΔG-LASV-GPC, also protected guinea pigs against lineage I and lineage IV strains and monkeys against two strains from lineage IV after a single immunization (18, 19). A DNA vaccine, pLASV-GPC, also protects monkeys after three intradermal injections (20). None of these three vaccines have demonstrated long-term efficacy in monkeys in preclinical studies.

We have previously developed MeV-NP, a recombinant measles virus vaccine that expresses LASV GPC and NP, both from the Josiah strain. In this vaccine, the gene encoding NP was further modified to abolish its ability to dampen the immunogenicity of the measles backbone (21). We have previously demonstrated that a single immunization with MeV-NP protects monkeys against a lethal challenge with the homologous Josiah strain and that protection was mostly linked to the elicitation of T cell responses against GPC and NP (10). MeV-NP was also selected by the CEPI and is currently undergoing a first-in-human phase 1 clinical trial (NCT04055454) under the name MV-LASV. MeV-NP has specific characteristics that could make it an appropriate vaccine against LASV. The measles platform is safe and is currently being used in several clinical trials for other viral diseases (22–25). Measles vaccination confers life-long immunity, and measles-based vectors may also induce long-term immunity against the targeted pathogens. MeV-NP, similar to other measles virus-based vaccines, induces antimeasles antibodies (10) and could therefore immunize against two pathogens in naïve recipients or boost the immune response toward measles in seroconverted individuals, as preexisting immunity does not seem to affect its immunogenic properties (23). It is yet to be determined whether a single immunization with MeV-NP can cross-protect against divergent strains of LASV and induce long-term protection against infection against the homologous strain of LASV.

Here, we tested whether a single dose of MeV-NP can protect monkeys against divergent strains from lineage II, generally responsible for the yearly Lassa fever burden (2, 26), and lineage VII, a recently emerged lineage that has shown an unusually high case fatality rate of 50% in Togo and Benin and that shows the highest divergence from lineage IV strains (7). We also assessed whether MeV-NP can induce long-term protection in monkeys challenged

over 1 year after vaccination and whether a prime-boost regimen could be beneficial for such protection.

## RESULTS

### Immunization of cynomolgus monkeys

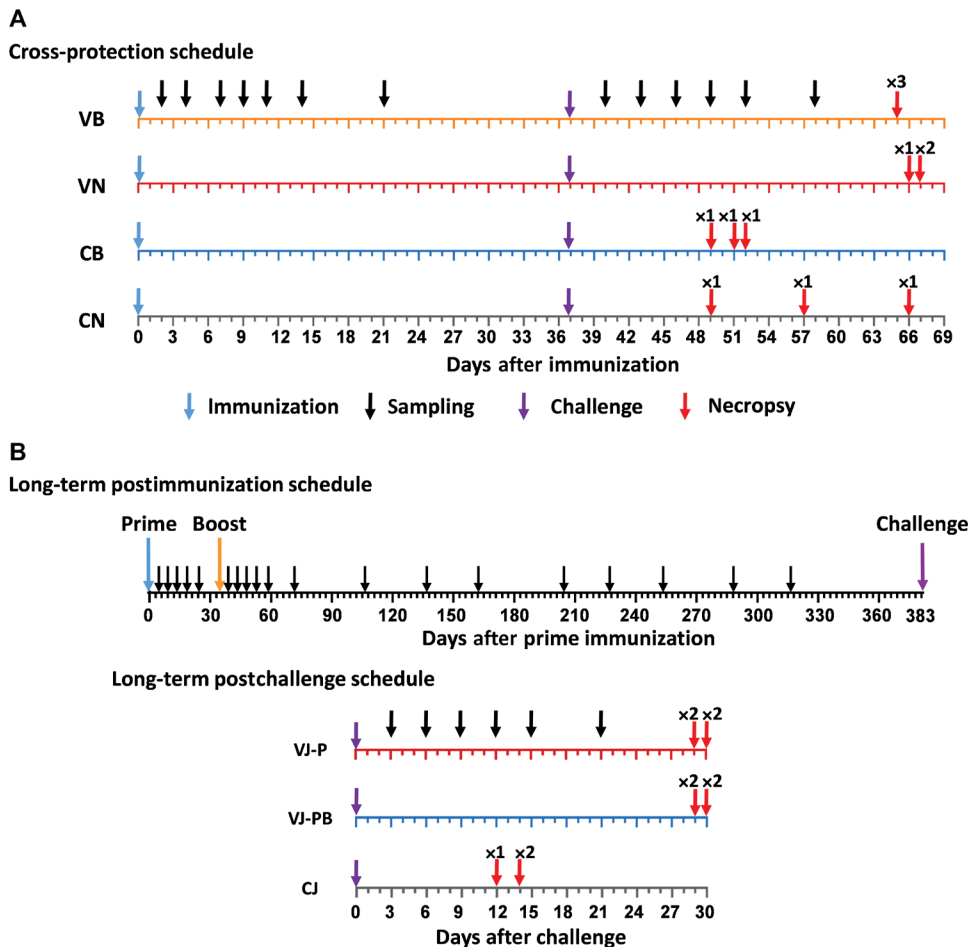
In total, 23 monkeys were used to assess the cross-protection and long-term efficacy of MeV-NP. For evaluation of cross-protection, four groups of three monkeys were immunized by the subcutaneous route with  $2 \times 10^6$  tissue-culture infective doses [median tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>)] of MeV-NP or MeV as a negative control (Fig. 1A). Monkeys in the MeV groups were vaccinated with the measles virus Schwarz strain vaccine. Groups were characterized on the basis of vaccination with MeV-NP (V) or control vaccination (C) and challenged with either the lineage VII Benin strain (B) or the lineage II Nigeria strain (N), leading to four groups: VB (orange), CB (blue), VN (red), and CN (gray).

For evaluation of long-term protection, one group of four monkeys was immunized one time by the intramuscular route with  $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of MeV-NP for subsequent challenge with the Josiah strain of LASV (group VJ-P, red; Fig. 1B). Another group of four received prime and boost (PB) intramuscular immunizations with  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of MeV-NP spaced 1 month apart before challenge with the Josiah strain of LASV (group VJ-PB, blue; Fig. 1B). An additional control group of three monkeys was immunized by two intramuscular injections of  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of MeV spaced 1 month apart for subsequent challenge with the Josiah strain of LASV (group CJ, gray; Fig. 1B). Monkeys were immunized through the intramuscular route to confirm that subcutaneous or intramuscular routes do not affect the immunogenicity of the vaccine, as shown for the Measles-Mumps-Rubella-Varicella (MMRV) vaccine in clinical trials (27) and to match the immunization route used in the clinical trial. After immunization, no alteration of the biological parameters, including body temperature, weight, and respiratory rate, of any monkey was observed during the time between immunization and challenge, which was 37 days for the VN, CN, VB, and CB monkeys and 383 days for the VJ-P and VJ-PB monkeys (Fig. 1, A and B). We assessed potential viremia due to the vaccine for several days after each immunization by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and detected no vaccine replication in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or plasma nor shedding in the oral or nasal excretions or urine (tables S1 and S2), as reported previously (10), reinforcing the apparent safety of MeV-NP.

### Antibody responses are induced after MeV-NP immunization

We measured the induction of LASV-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG after immunization using whole LASV antigens. Two of the three monkeys in the VB and VN groups showed detectable IgM activity against the whole antigens of the homologous LASV lineage IV at day 14 at a low dilution, whereas no IgM was detected for the CB or VB groups (Fig. 2A, top). We also assessed the presence of IgM directed against heterologous lineages II and VII in these monkeys and only detected a low titer of IgM directed against lineage VII in one VB monkey (Fig. 2A, middle). No monkeys developed IgM responses against lineage II (Fig. 2A, bottom).

During the immunization period, all monkeys in the VB and VN groups developed an IgG response against the whole antigens of the homologous lineage IV between days 14 and 37 (Fig. 2B, top), and



**Fig. 1. Outline of the experiments.** (A) Scheme presenting the time of immunization, sampling, challenge, and necropsy for the four groups of the cross-protection study. Prime immunizations are indicated by blue arrows. Black arrows indicate sampling, and purple arrows indicate the time of challenge. Red arrows point to the day of necropsy, and the number of animals euthanized is indicated. VB, MeV-NP immunization, Benin lineage VII challenge; VN, MeV-NP immunization, Nigeria lineage II challenge; CB, MeV immunization, Benin lineage VII challenge; CN, MeV immunization, Nigeria lineage II challenge. (B) Scheme presenting the time of immunization, sampling, challenge, and necropsy for the four groups of the long-term protection study. Prime immunizations are indicated by a blue arrow, and boost immunizations are indicated by an orange arrow. Black arrows indicate sampling, and purple arrows indicate the time of challenge. Red arrows point to the day of necropsy, and the number of monkeys euthanized is indicated. VJ-P, MeV-NP immunization, Josiah lineage IV challenge, prime only; VJ-PB, MeV-NP immunization, Josiah lineage IV challenge, prime-boost; CJ, VJ-P, prime-boost.

the three monkeys in the VB group also produced heterologous LASV-specific IgG with the same kinetics (Fig. 2B, middle). However, no lineage II-specific IgG was detected in VN monkeys (Fig. 2B, bottom). To improve the sensitivity of detection and determine the respective contribution of LASV NP and GP in the humoral responses, we also used recombinant antigens. VB and VN monkeys all produced IgG recognizing NP lineage IV by day 14 or 25 (Fig. 2C, top) and cross-reacting with NP lineage II at day 25 (Fig. 2D, top). IgG recognizing GP lineage IV at day 25 (Fig. 2C, bottom) was detected in one monkey from each VB and VN groups. IgG of two VB monkeys and one CN also cross-reacted with GP lineage II at day 25 (Fig. 2D, bottom).

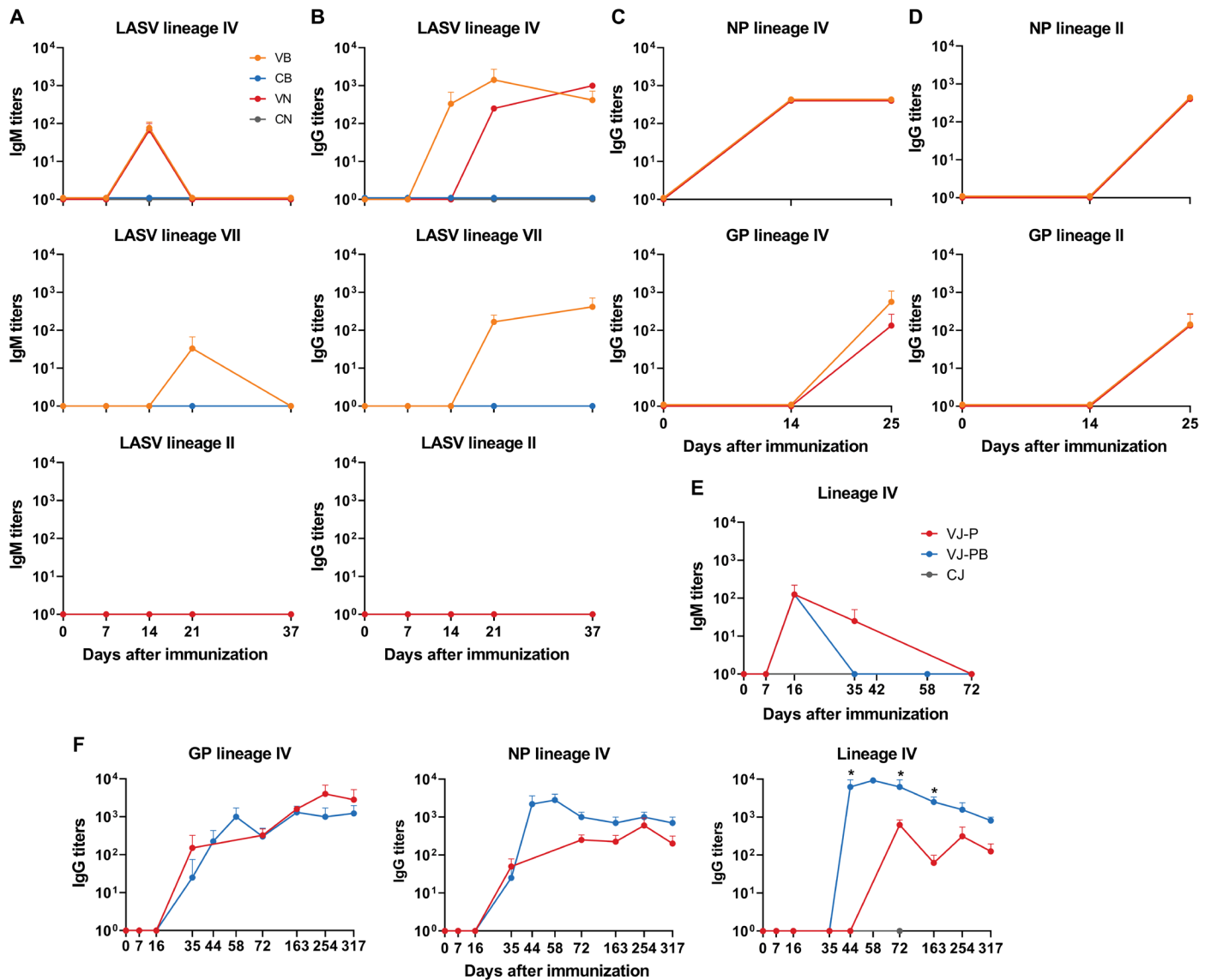
Two of the three monkeys in the VJ-P and VJ-PB groups produced homologous LASV-specific IgM by day 16, and one monkey

in the VJ-P group still exhibited a low titer at day 35 (Fig. 2E). None of the three CJ controls developed LASV-specific IgM (Fig. 2E). Homologous LASV-specific IgG against GP and NP also appeared in all monkeys in the VJ-P and VJ-PB groups between days 16 and 35 and were detected up to 317 days after immunization (DPI) (Fig. 2F). Concentrations of anti-GP (Fig. 2F, left) and anti-NP (Fig. 2F, middle) IgG were similar between the VJ-P and VJ-PB monkeys. The concentrations of IgG against LASV Josiah were significantly higher for the VJ-PB than VJ-P monkeys between 44 and 163 DPI ( $P = 0.0286$ ; Fig. 2F, right).

### T cell responses induced after immunization

LASV-specific T cells from whole blood were analyzed after immunization by quantifying the CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells producing interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) or tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) after stimulation with overlapping peptides covering all of LASV GPC and NP. A low number of T cells produced cytokines 14 or 25 DPI during the cross-protection experiment (Fig. 3, A and B). A low but statistically significant production was observed by CD8<sup>+</sup> T cells in response to Josiah or Benin LASV GPC peptides at days 14 and 25, respectively ( $P = 0.037$  and  $P = 0.048$ , respectively; Fig. 3A). Otherwise, the production of cytokines in response to the various LASV strains was variable, except for CD4<sup>+</sup> T cells at day 25, when a similar percentage of cytokine-producing cells was observed in response to Josiah-, Benin-, or Nigeria-derived GPC and NP peptides (Fig. 3B). The LASV-specific T cells produced mainly TNF- $\alpha$  only, but a proportion of T cells expressed both TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  or IFN- $\gamma$  alone, primarily in response to Josiah and Benin GPC peptides (Fig. 3C).

When we isolated samples from monkeys in the long-term vaccination experiment, we found that the peak of the T cell response occurred 35 DPI for VJ-P monkeys, with 0.3 to 0.5% of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells producing cytokines in response to GPC and NP peptides from LASV Josiah and AV, a strain representative of lineage V (Fig. 3, D and E) (28), with a significant difference as compared to CJ monkeys for NP-specific CD8<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.046$  and  $P = 0.012$ , respectively; Fig. 3E, top left). We also observed significant differences as compared to CJ monkeys for CD8<sup>+</sup> responses against Josiah NP peptide stimulation at day 23 ( $P = 0.007$ ) and for CD4<sup>+</sup> T cell responses after AV NP peptide stimulation at day 16 ( $P = 0.002$ ) (Fig. 3E, left). The peak T cell responses in prime-boost monkeys were measured at day 42, or 7 days after the boost, with 0.2 to 0.5%



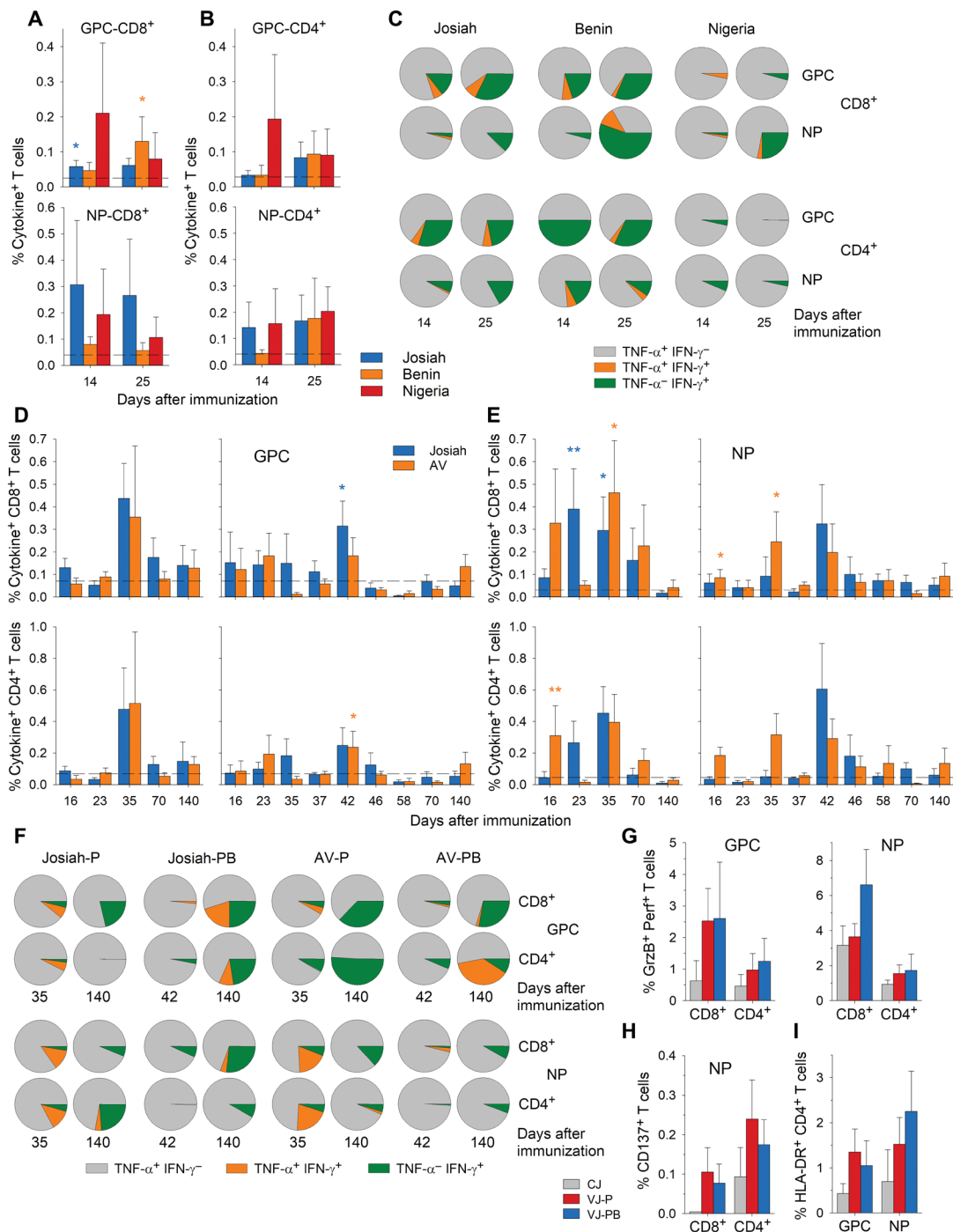
**Fig. 2. Antibody responses induced after immunization of cynomolgus monkeys.** (A) Detection of LASV-specific IgM against lineage IV (top), lineage VII (middle), and lineage II (bottom) in VB, CB, VN, and CN monkeys by ELISA. (B) Detection of LASV-specific IgG against lineage IV (top), lineage VII (middle), and lineage II (bottom) in VB, CB, VN, and CN monkeys by ELISA. (C) Detection of NP lineage IV (top)– and GP lineage IV (bottom)–specific IgG in VB and VN monkeys by ELISA. (D) Detection of NP lineage II (top)– and GP lineage II (bottom)–specific IgG in VB and VN monkeys by ELISA. For (A) to (D), each point represents the means  $\pm$  SEM of three samples. (E) Detection of LASV-specific IgM against lineage IV in VJ-P, VJ-PB, and CJ monkeys by ELISA. (F) Detection of NP lineage IV, GP lineage IV, and LASV lineage IV IgG in VJ-P, VJ-PB, and CJ monkeys by ELISA. Each point represents the means  $\pm$  SEM of four samples for VJ-P and VJ-PB and three samples for the CJ controls. Statistical significance: \* $P \leq 0.05$ , Mann-Whitney test.

of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells producing cytokines in response to Josiah and AV GPC and NP peptides (Fig. 3, D and E). We observed a statistically significant difference between VJ-PB–vaccinated and CJ monkeys for the Josiah GPC–specific CD8<sup>+</sup> T cells and for the AV GPC–specific CD4<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.023$  and  $P = 0.041$ , respectively; Fig. 3D, right). A large proportion of AV NP–specific cytokine-producing CD8<sup>+</sup> T cells were also observed 16 and 35 days after the prime immunization as compared to CJ monkeys ( $P = 0.015$  and  $P = 0.021$ , respectively; Fig. 3E, top right). Again, TNF- $\alpha$  was the main cytokine detected at the peak of the response, but a small proportion of T cells from prime-only monkeys produced both TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$

in response to NP (Fig. 3F). The T cell responses were more diversified at 140 DPI, with the appearance of both TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and TNF- $\alpha$ <sup>–</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells, except for Josiah GPC peptides and CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 3F).

Memory T cell responses were also analyzed in PBMCs collected at 317 DPI by stimulating cells with Josiah GPC– or Josiah NP–derived peptides and analyzing the expression of activation molecules 4 days after (Fig. 3, G to I). A higher percentage of CD8<sup>+</sup> T cells from VJ-P and VJ-PB monkeys expressed Granzyme B (GrzB) and perforin (Perf) in response to GPC peptides (Fig. 3G, left) and from VJ-PB monkeys compared to CD8<sup>+</sup> T cells from CJ monkeys in

**Fig. 3. T cell responses induced after immunization of cynomolgus monkeys.** (A and B) Quantification of CD8<sup>+</sup> (A) and CD4<sup>+</sup> (B) T cells specific for LASV GPC (top) and NP (bottom) peptides. The percentage of T cells producing TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  in response to peptide stimulation among total CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells is presented according to the time after immunization after subtraction of the respective value measured for unstimulated T cells that represent the background T cell response. Each bar represents the means  $\pm$  SEM of six monkeys for LASV Josiah-derived peptides and three monkeys for LASV Benin- and LASV Nigeria-derived peptides. The dashed lines represent the percentage of T cells from control monkeys producing cytokines in response to LASV peptides before challenge (mean of 10 samples) (C) Pie chart representation of the proportion of each subpopulation of cytokine-positive CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells responding to GPC or NP stimulation. (D) Quantification of CD8<sup>+</sup> (top) and CD4<sup>+</sup> (bottom) T cells specific for LASV GPC peptides in primed monkeys (left) or primed-boosted monkeys (right). (E) Quantification of CD8<sup>+</sup> (top) and CD4<sup>+</sup> (bottom) T cells specific for LASV NP peptides in primed monkeys (left) or primed-boosted monkeys (right). For (C) and (D), the percentage of T cells producing TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  in response to peptide stimulation among total CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells is presented according to the time after immunization after subtraction of the respective value measured for unstimulated T cells. Each bar represents the means  $\pm$  SEM of eight samples. Statistical significance: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , one-way ANOVA. The dashed lines represent the percentage of T cells from control monkeys producing cytokines in response to LASV peptides before challenge (mean of eight samples) (F) Pie chart representation of the proportion of each subpopulation of cytokine-positive CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells responding to GPC or NP stimulation. (G to I) LASV-specific T cell responses were evaluated in PBMCs isolated from immunized monkeys at 317 days after immunization. The proportion of GrzB or perforin-expressing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells (G), CD137-expressing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells (H), or HLA-DR-expressing CD4<sup>+</sup> T cells (I) in response to LASV Josiah GPC- and LASV Josiah NP-derived peptides is shown. Data are presented as the percentage of cells expressing the indicated marker in response to peptide stimulation minus the percentage of expressing cells in response to mock stimulation for CJ (gray bars), VJ-P (red bars), and VJ-PB (blue bars). Each bar represents the means  $\pm$  SEM of three (CJ) or four samples (VJ-P and VJ-PB) of PBMCs obtained 317 days after immunization.



Downloaded from <https://www.science.org> at Institut Pasteur on October 28, 2021

response to NP peptides (Fig. 3G, right). A higher percentage of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells expressing the T cell costimulation molecule CD137 (29) in response to NP were also detected in PBMCs from VJ-P and VJ-PB monkeys at 317 DPI compared to T cells from

CJ monkeys (Fig. 3H), and a higher proportion of CD4<sup>+</sup> T cells from vaccinated monkeys expressed human leukocyte antigen (HLA)-DR in response to both GPC and NP compared to CD4<sup>+</sup> T cells from CJ monkeys (Fig. 3I).

### A single shot of MeV-NP protects monkeys against heterologous strains and induces long-term protection

At the end of the immunization phase, three control (CB) and three immunized monkeys (VB) were challenged with a subcutaneous injection of 3000 focus-forming units (FFU) of the heterologous LASV Benin strain (lineage VII) (table S3). In addition, three control (CN) and three immunized monkeys (VN) were challenged by the same route with 3000 FFU of the heterologous Nigeria LASV strain (lineage II) (table S3). Three control (CJ), four prime-only immunized (VJ-P), and four prime-boost immunized monkeys (VJ-PB) received 1500 FFU of LASV Josiah (lineage IV) by the subcutaneous route. The monkeys were then monitored for up to 30 days and attributed clinical scores based on their body temperature, weight, food and water intake, behavior, and clinical signs, with a score of 15 being the end point for euthanasia.

The clinical scores of the three CB controls showed an increase by day 6, and they were euthanized before day 15, whereas all VB monkeys survived the infection (Fig. 4A, left). The CB controls showed signs of aggressiveness and stress by day 4 after challenge, and their tonus was lower by day 7, accompanied by dehydration. Their body temperature started to increase by day 3 and remained elevated until day 9, before decreasing for all monkeys until the time of euthanasia (Fig. 4B). By day 12, CB-2 and CB-3 were asthenic and started shivering, and CB-1 had to be euthanized because of a body temperature below 35°C, which represents a mandatory end point (Fig. 4A, top left, pink line). CB-3 was euthanized on day 14 for the same reason (Fig. 4A, top left, light blue line), whereas CB-2 was euthanized on day 15 with a severe hypothermia below 32°C (Fig. 4, A and B, top left, dark blue line). In contrast, VB monkeys had consistently low clinical scores that reached their highest point around day 9 (Fig. 4A, bottom left). They did not show marked changes in body temperature (Fig. 4B, bottom left) but showed less tonus and were moderately dehydrated between days 8 and 10.

The three CN controls also showed signs of stress, dehydration, and asthenia during the first 9 days but then presented different clinical pictures (Fig. 4A, top right). The clinical score of CN-1 (pink line) rapidly increased from day 9, when its body temperature reached a maximum (Fig. 4B, top right, pink line), and was euthanized at day 12 after 2 days with a continuous nosebleed and severe diarrhea. The clinical score of CN-3 (Fig. 4A, top right, light blue line) also increased rapidly from days 9 to 12, but it survived to day 20 and was euthanized after showing severe balance problems for two consecutive days. The peak in the clinical score coincided with a peak in body temperature at day 9 (Fig. 4B, top right, light blue line). The clinical score of CN-2 (Fig. 4A, top right, dark blue line) increased more slowly up to day 15, reaching a score of 8, but then remained stable for a week and decreased thereafter. This monkey survived the infection without any measurable fever (Fig. 4B, top right, dark blue line) and was euthanized at the end of the protocol with a score of 5. By contrast, none of the VN monkeys developed any signs of disease. They all survived the infection, with clinical scores remaining below 3 (Fig. 4A, bottom right) and without showing evidence of hyperthermia (Fig. 4B, bottom left). MeV-NP therefore protects monkeys against heterologous LASV strains from lineages II and VII after a single immunization.

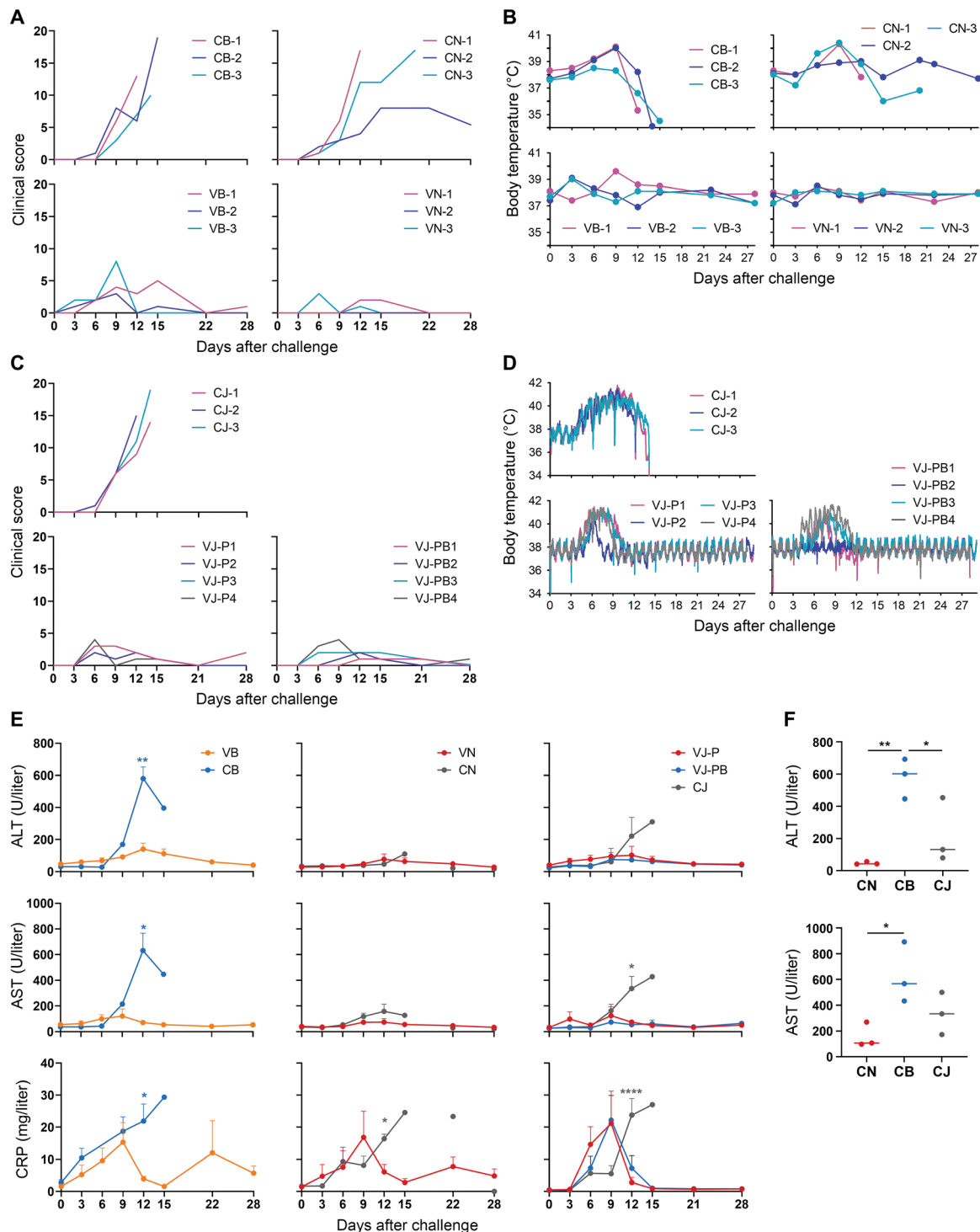
For monkeys infected to assess long-term vaccine-mediated protection, we also evaluated clinical score and body temperature. The three CJ controls were euthanized between days 12 and 14 (Fig. 4C, top), and all presented clinical signs of Lassa fever including diarrhea,

dehydration, and low tonus, as well as a high body temperature between days 6 and 12 (Fig. 4D, top). Between days 12 and 14, CJ-1 had bleeding gums and balance problems and was euthanized on day 14 due to a body temperature below 35°C (Fig. 4, C and D, top, pink lines). CJ-2 (Fig. 4C, top, dark blue line) was euthanized on day 12 after losing consciousness and convulsing. CJ-3 experienced epistaxis and shivering starting from day 11 and was euthanized on day 14 (Fig. 4C, top, light blue line). All VJ-P and VJ-PB monkeys survived the infection with clinical scores below 4 (Fig. 4C, bottom). Most monkeys in these two groups only showed a transient increase in body temperature between days 6 and 12, which was less prolonged for VJ-P1 and VJ-PB1 (Fig. 4D, bottom). VJ-PB2 did not show any increase in body temperature. Thus, MeV-NP vaccination induced long-term protection against the homologous LASV strain and a prime-boost immunization regimen had only a limited effect on the efficacy of protection relative to prime-only immunization.

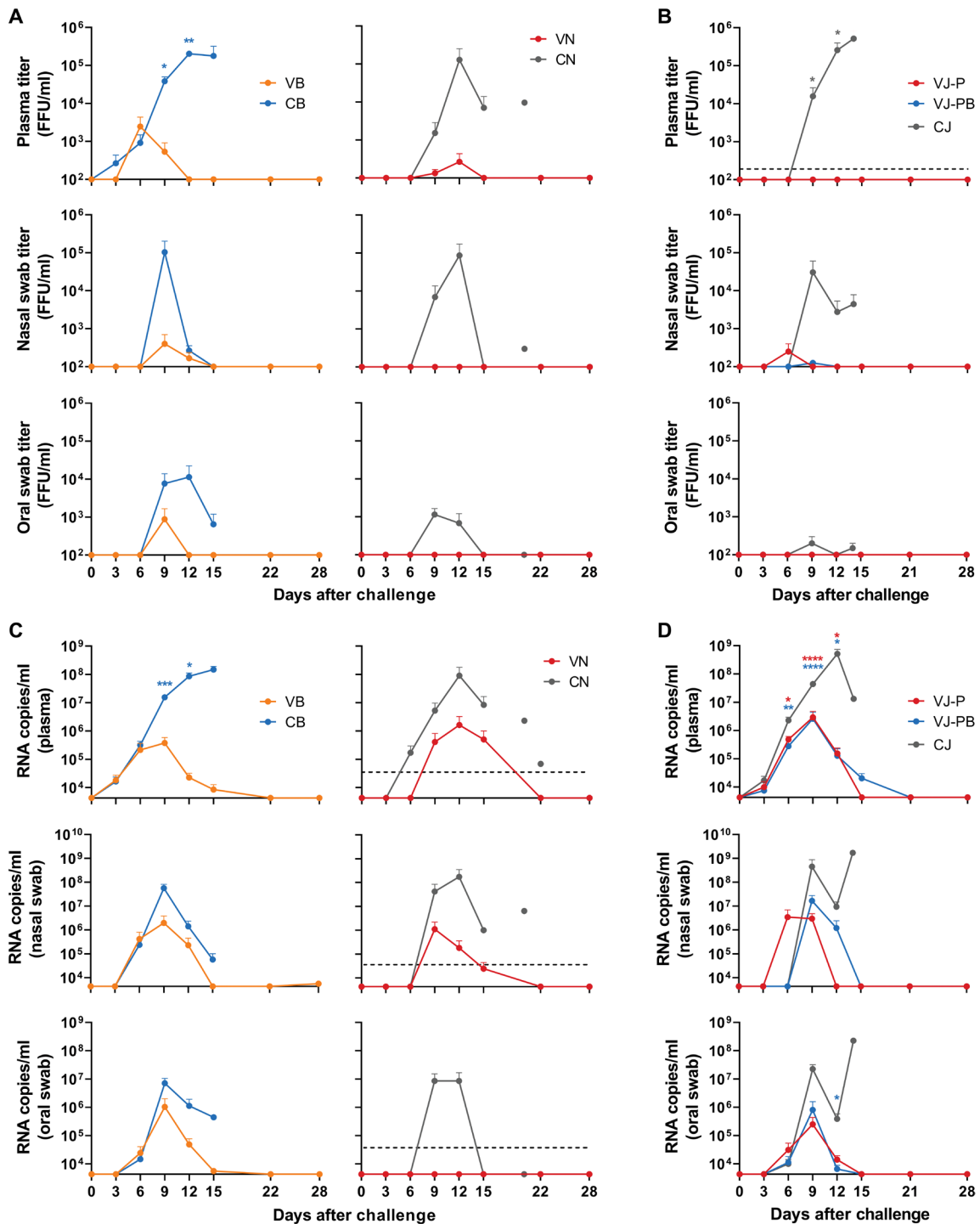
The increase in plasma concentrations of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), a hallmark of Lassa fever, was elevated in monkeys of the CB and CJ groups between day 9 and the day of euthanasia but remained remarkably low in the CN monkeys (Fig. 4E, top and middle). These differences in ALT and AST concentrations were particularly marked at day 12 between CN and CB monkeys ( $P = 0.0075$  for ALT and  $P = 0.0371$  for AST; Fig. 4F). This observation, combined with milder disease in CN monkeys, suggests that the lineage II strain used in this study is less pathogenic in monkeys than the strains from lineages IV and VII. Similarly, the higher ALT and AST concentrations observed in the CB monkeys suggest that the lineage VII strain may cause more severe disease than the two other strains. ALT and AST concentrations remained low in all MeV-NP immunized monkeys (VB, VN, VJ-P, and VJ-PB). The concentration of C-reactive protein (CRP) in the blood peaked at the time of death in all controls, except for CN-2, whose CRP concentration peaked at day 15, remained high at day 22, and then fell to normal values by the end of the experiment (Fig. 4E, bottom). The CRP concentration peaked at day 9 for all MeV-NP-vaccinated monkeys and then decreased by day 15, suggesting that they had cleared LASV infection. Only VB-2 showed a transient rebound in CRP concentration at day 22 (Fig. 4E, bottom left). The other biological parameters did not differ between the control and MeV-NP-vaccinated monkeys, except for an increase in the urea concentration for the control monkeys shortly before death (fig. S1, A to C). The CJ monkeys also showed higher concentrations of lactate dehydrogenase (LDH) in the blood than the VJ-P and VJ-PB monkeys ( $P < 0.0001$  at day 12) and low albumin (ALB) concentrations at the time of death (fig. S1D). Thus, MeV-NP vaccination prevented the appearance of biological dysfunction associated with Lassa fever in monkeys.

### Control of LASV replication in immunized monkeys

We measured the number of infectious particles (Fig. 5, A and B) and copies of viral RNA (Fig. 5, C and D) in the plasma and swabs of all monkeys. Viremia increased substantially until the time of death from day 3 for the CB controls or day 6 for the CN and CJ controls for all controls that were euthanized before day 15, reaching infectious titers between  $10^5$  and  $10^6$  FFU/ml of plasma (Fig. 5, A and B, top; and fig. S2, A and B, top), with corresponding amounts of viral RNA between  $10^8$  and  $10^9$  copies/ml (Fig. 5, C and D, top; and fig. S2, C and D, top). CN-3 showed lower viremia, about  $10^5$  FFU/ml of plasma, which did not increase by the time of death on



**Fig. 4. Clinical monitoring of immunized monkeys after an LASV challenge.** (A) Clinical scores of individual monkeys from groups VB, CB, VN, and CN after challenge with LASV Benin (VB and CB) or LASV Nigeria (VN and CN) in the cross-protection experiment. (B) Monitoring of body temperature by rectal measurement during the course of LASV Benin and LASV Nigeria infections. Individual data are presented for each monkey. (C) Clinical scores of individual monkeys from groups VJ-P, VJ-PB, and CJ after the challenge with LASV Josiah in the long-term experiment. (D) Monitoring of body temperature by real-time measurement during the course of LASV Josiah infection. Individual data are presented for each monkey. (E) Analysis of biological parameters during the course of LASV infection. Each point represents the means ± SEM of three (VB, VN, CB, CN, and CJ) or four samples (VJ-P and VJ-PB) for the ALT, AST, and CRP concentrations, except for individualized points representing the values of one monkey. For statistical purposes, data collected from monkeys euthanized on day 14 were compared to data collected on day 15 for the other monkeys and data collected at the end of the experiment (days 28 to 30) were compared with each other. (F) ALT (top) and AST (bottom) concentrations in control monkeys at day 12 after challenge. Statistical significance: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ , one-way ANOVA.



**Fig. 5. LASV replication in cynomolgus monkeys.** (A) Quantification (in FFU per milliliter) of LASV infectious particles in plasma (top), nasal swabs (middle), or oral swabs (bottom) according to the time after challenge with LASV Benin (VB and CB) or LASV Nigeria (VN and CN) in the cross-protection study. (B) Quantification (in FFU per milliliter) of LASV infectious particles in plasma (top), nasal swabs (middle), or oral swabs (bottom) according to the time after challenge with LASV Josiah in the long-term experiment. (C) Quantification of viral load by RT–quantitative PCR in the plasma (top), nasal swabs (middle), or oral swabs (bottom) according to the time after challenge with LASV Benin (VB and CB) or LASV Nigeria (VN and CN) in the cross-protection study. (D) Quantification of viral load by RT–quantitative PCR in the plasma (top), nasal swabs (middle), or oral swabs (bottom) according to the time after challenge LASV Josiah in the long-term experiment. Each point represents the means  $\pm$  SEM of three (VB, VN, CB, CN, and CJ) or four samples (VJ-P and VJ-PB), except for individualized points representing the values of one monkey. For statistical purposes, data collected from monkeys euthanized on day 14 were compared to data collected on day 15 for the other monkeys, and data collected at the end of the experiment (days 28 to 30) were compared with each other. Statistical significance: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ , and \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ . For (A) and (C), an unpaired *t* test or a Mann-Whitney test was performed after testing normality. For (B) and (D), a one-way ANOVA or a Kruskal-Wallis test was performed after testing normality.

day 20 (fig. S2B, top right, blue line). CN-2 showed only transient viremia, peaking at  $1.4 \times 10^3$  FFU/ml on day 12, but no more infectious virus was detected in plasma isolated from CN-2 by day 15 (fig. S2B, top right, red line). We detected only trace amounts of viral RNA in the plasma of this monkey between day 15 and the end of the experiment (fig. S2D, top right, red line). Infectious titers and viral RNA were also detected between days 9 and 15 in the oral or nasal swabs of most controls but at lower amounts than the concentrations found in plasma (Fig. 5, A to D, middle and bottom). We only detected a small number of infectious particles (300 FFU/ml) in the oral swab of CN-2 (fig. S2B, bottom right, red line) and a low number of viral RNA copies in swabs between days 9 and 12 (fig. S2D, middle and bottom right, red line). CN-2 had thus controlled and cleared the infection by day 15.

We measured low transient viremia (below  $10^4$  FFU/ml) and low infectious titers in swabs (below  $10^3$  FFU/ml) of vaccinated VB monkeys between days 6 and 9 and viral RNA in low quantities between days 3 and 15 (Fig. 5, A and C, top left; and fig. S2, A and C). We also detected a low degree of viremia, peaking at 600 FFU/ml, and a low copy number of viral RNA in the plasma and swabs of VN-1 (fig. S2B, top left, orange line). None of the other vaccinated VN monkeys had detectable infectious titers or viral RNA in their fluids at any time of the experiment (Fig. 5, A and C, right; and fig. S2, B and D). No infectious titers were found in the fluids of the VJ-P or VJ-PB monkeys, except for a low number of infectious particles in the nasal secretions on day 6 for VJ-P1 (700 FFU/ml) and day 9 for VJ-PB3 (200 FFU/ml) (Fig. 5B, middle, and fig. S3A). However, we could still detect low amounts of viral RNA in the fluids of all monkeys, except VJ-PB2, between days 3 and 15 (Fig. 5D, right, and fig. S3B).

We also determined infectious titers and viral loads within several organs at the time of necropsy (fig. S4, A and B). Infectious particles and viral RNA were detected in all organs of the control monkeys, except for CN-2 (fig. S4, A and B, left). Viral RNA was detectable in all organs of the VB and VN monkeys (fig. S4A, middle and right) but not for all those of the VJ-P and VJ-PB monkeys (fig. S4B, middle and right). The presence of viral RNA was not associated with infectious titers, except for very low titers (<20 FFU/ml) in the lymphoid organs and liver of one CB and two CN monkeys (fig. S4A, left).

As viral RNA was detected in the brain of most vaccinated monkeys at the time of necropsy, we evaluated them for neurologic sequelae through anatomopathological analyses. We performed immunohistochemistry to identify presence of viral antigens in the brains of autopsied monkeys (fig. S5). All controls except CN-2 (fig. S5A, top right) had LASV-infected endothelial cells in their brain. Brains isolated from vaccinated monkeys did not exhibit any viral antigen staining after a heterologous (fig. S5A) or a homologous challenge (fig. S5B) at the time of necropsy. Thus, a single shot of MeV-NP led to control of viral replication in monkeys infected with heterologous strains from lineages II and VII or in monkeys infected with a homologous strain more than a year after immunization, demonstrating the induction of a long-term immunity.

### Antibody responses induced after LASV challenge

We next sought to gain further insight into the mechanism of protection. To do so, we determined the LASV-specific immunoglobulin titers in monkeys after infection. In VB monkeys, the LASV-specific IgG titers against the heterologous strain from lineage VII rapidly

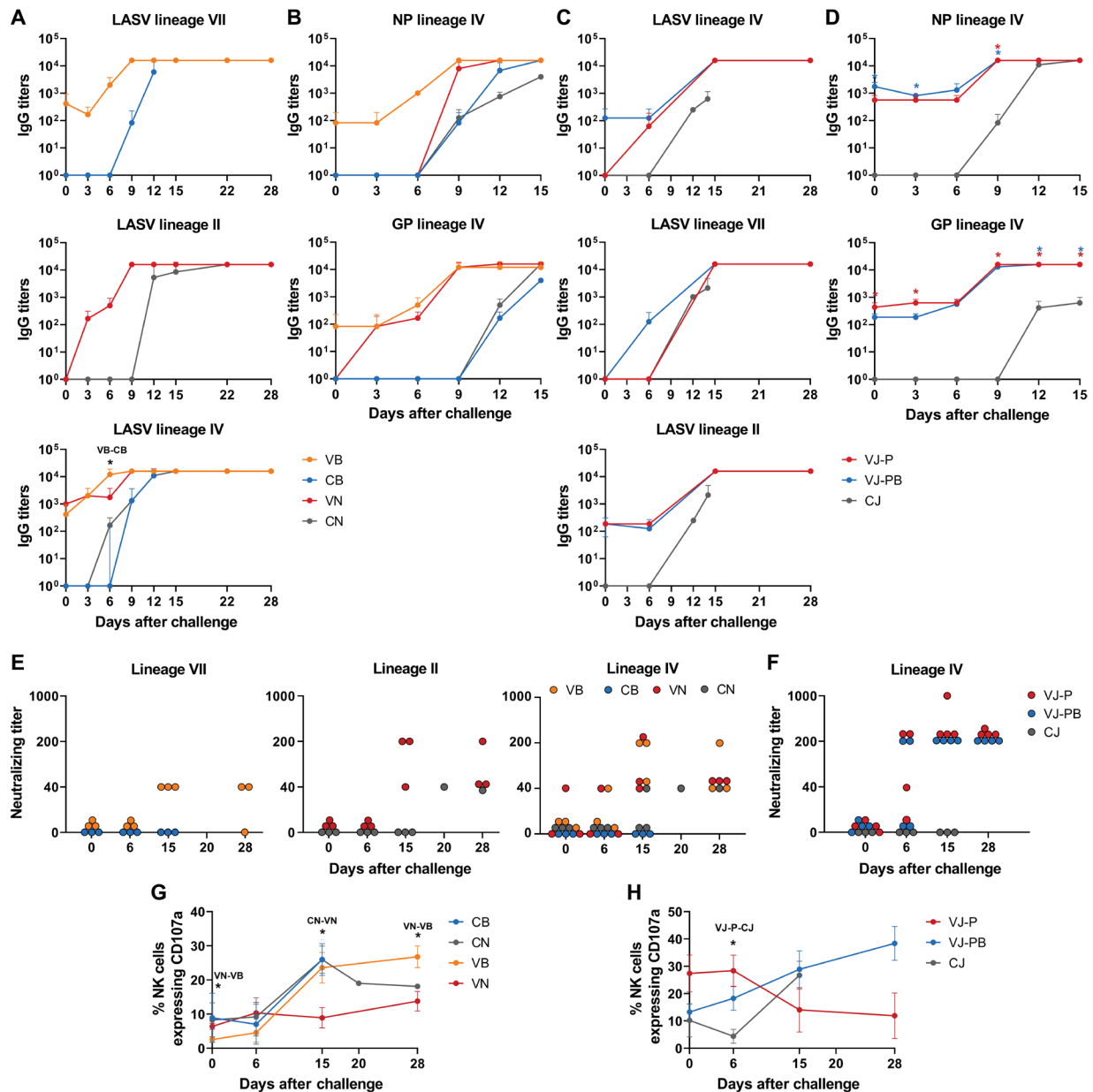
rose from day 3 to reach a maximum at day 9 after challenge (Fig. 6A, top, orange line). We observed a similar increase in the IgG titers against the lineage II strain for the VN monkeys (Fig. 6A, middle, red line). The VB and VN monkeys also produced high titers of lineage IV-specific IgG at day 9 (Fig. 6A, bottom, orange and red lines). LASV-specific IgG directed against whole antigens of the heterologous lineages II and VII or homologous lineage IV also appeared in the control monkeys at day 6 in CN monkeys (blue lines) and at day 9 in CB monkeys (gray lines) (Fig. 6A, bottom). By the time of death, all CB and CN controls had IgG titers similar to those of the VB and VN monkeys. We also measured the titers of IgG directed specifically against LASV NP and GP antigens (Fig. 6B). Titers reached their maximum concentrations between days 9 and 12 after challenge for both the VB and VN monkeys. In controls, anti-NP and anti-GP IgG reached similar titers by the time of death, but their appearance was delayed compared to vaccinated monkeys.

The homologous response against lineage IV reached a maximum on day 15 for the VJ-P and VJ-PB monkeys (Fig. 6C, top, red and blue lines), and LASV-specific IgG also cross-reacted with lineage VII and lineage II antigens (Fig. 6C, middle and bottom, red and blue lines). A few monkeys in these two groups had titers of IgG cross-reacting with lineage II at the time of challenge. The concentrations of LASV-specific IgG for the CJ monkeys increased from day 6 to the time of death, but their appearance was delayed compared to VJ-P and VJ-PB monkeys (Fig. 6C, gray lines). Plasma from all VJ-P- and VJ-PB-vaccinated monkeys contained LASV NP- and LASV GP-specific IgG at the time of challenge (Fig. 6D). Antibody titers were significantly higher in VJ-P and VJ-PB monkeys compared to controls at day 9 for NP ( $P = 0.0167$ ; Fig. 6D) and day 12 for GP ( $P = 0.0173$ ; Fig. 6D). In CJ controls, anti-NP IgG and anti-GP IgG were detected at days 9 and 12, respectively (Fig. 6D). Whereas anti-NP IgG reached similar titers in vaccinated and control monkeys by the time of death, anti-GP IgG remained significantly lower in controls ( $P = 0.0195$ ; Fig. 6D).

We assessed the neutralizing potential of the anti-LASV antibodies produced in these monkeys. VB and VN monkeys had no neutralizing antibodies (NAbs) against heterologous or homologous lineages at the time of challenge (Fig. 6E), with the exception of VN-2, which had a low NAb titer directed solely against the homologous lineage IV (Fig. 6E, right). However, NAbs specific for the homologous and heterologous lineages were detected for all VB and VN monkeys by day 15 and persisted for most monkeys until day 28 (Fig. 6E, orange and red circles). No CB monkeys developed NAbs against lineage VII (Fig. 6E, left, blue circles) or lineage IV (Fig. 6E, right, blue circles) before death. CN-1 did not develop NAbs against lineage II or IV, but CN-2 and CN-3 produced NAbs against both lineages at the time of euthanasia (day 28 for CN-2 and day 20 for CN-3) (Fig. 6E, gray circles). CJ monkeys never developed NAbs, whereas all VJ-P and VJ-PB monkeys showed neutralizing titers against the homologous strain by day 15 (Fig. 6F), with VJ-P2 demonstrating the highest neutralizing titer at day 15. MeV-NP vaccination induced the rapid production of cross-reactive and neutralizing anti-LASV antibodies after challenge in monkeys.

To evaluate the non-neutralizing functions of anti-LASV antibodies during the course of infection, we performed an antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) assay on plasma samples collected before challenge or at several time points after challenge (30). In monkeys challenged with heterologous strains (Fig. 6G), the proportion of CD107a-expressing natural killer (NK) cells increased





**Fig. 6. Analysis of the antibody responses induced after LASV infection.** (A) Detection of postchallenge LASV lineage-specific IgG in VB, VN, CB, and CN monkeys by ELISA. Each point represents the means  $\pm$  SEM of three samples except for control monkeys at day 15 or later. Individual points represent the value of one monkey. Statistical significance:  $*P \leq 0.05$ , Kruskal-Wallis test. (B) Detection of postchallenge NP lineage IV- and GPC lineage IV-specific IgG in VB, VN, CB, and CN monkeys by ELISA. Each point represents the means  $\pm$  SEM of three samples except for control monkeys at day 15 (two monkeys). Individual points represent the value of one monkey. Statistical significance:  $*P \leq 0.05$ , Kruskal-Wallis test. (C) Detection of postchallenge LASV lineage-specific IgG in CJ, VJ-P, and VJ-PB monkeys by ELISA. Each point represents the means  $\pm$  SEM of four (VJ-P and VJ-PB) or three samples (CJ). (D) Detection of postchallenge NP lineage IV and GPC lineage IV IgG in CJ, VJ-P, and VJ-PB monkeys by ELISA. Each point represents the means  $\pm$  SEM of three samples except for control monkeys at day 15 (two monkeys). Statistical significance:  $*P \leq 0.05$ , Kruskal-Wallis test. The red asterisks indicate differences between VJ-P and CJ, and the blue asterisks indicate differences between VJ-PB and CJ. (E and F) Quantification of NABs in the plasma according to the time after LASV infection in monkeys of the cross-protection study (E) and monkeys of the long-term study (F). Individual data of the monkeys represent the highest dilution of plasma showing more than 50% neutralizing activity. (G and H) Analysis of antibody-dependent cell cytotoxicity induced by immunoglobulins after challenge in monkeys of the cross-protection study (G) and of the long-term study (H). Results are expressed as the percentage of NK cells [defined as  $CD3^+ CD20^- CD8^+$  cells among PBMC as previously described (35)] expressing CD107a after culture in the presence of CB, CN, VB, VN, CJ, VJ-P, and VJ-PB plasma in Josiah LASV GPC-coated microplates minus the percentage of CD107a-expressing NK cells when culture was performed with the same plasma in Ebola virus GPC-coated microplates, as negative antigen. For statistical purposes, data collected from monkeys euthanized on day 12 or 14 were compared to data collected on day 15 for the other monkeys and data collected at the end of the experiment (days 28 to 30) were compared with each other. A *t* test was used to compare control and immunized monkeys for lineages II and VII at 0, 6, and 15 days after infection and to compare VN and VB (G). Statistical significance ( $P \leq 0.05$ ) was indicated with a black asterisk and the compared groups of monkeys indicated above (H). A one-way ANOVA test was used for day 0, 6, and 15 to compare CJ, VJ-P, and VJ-PB at each time point and a *t* test was used to compare only VJ-P and VJ-PB at day 28, and a significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between CJ and VJ-P is indicated with black asterisks (H).

between days 0 and 15 when incubated with plasma of all monkeys except for VN monkeys, for which a significantly lower activity than for CN was measured at day 15 ( $P = 0.027$ ; Fig. 6G). Significant differences were also observed at days 0 and 28 between immunized monkeys ( $P = 0.034$  at day 0 and  $P = 0.039$  at day 28; Fig. 6G). With the plasma from monkeys challenged 1 year after vaccination, the proportion of CD107a-expressing NK cells also increased between days 0 and 15 in VJ-PB and CJ monkeys, but not in VJ-P monkeys (Fig. 6H). After incubation with plasma from VJ-P monkeys, the proportion of CD107a-expressing NK cells was higher than in CJ at day 6 ( $P = 0.025$ ) and decreased over time.

### T cell responses induced after challenge

After the challenge with heterologous LASV strains, we detected T cells producing cytokines in response to Josiah GPC peptides beginning at 9 days after infection for immunized monkeys (Fig. 7, A and B). In VB and VN monkeys, CD8<sup>+</sup> T cell responses induced by LASV Nigeria GPC- and LASV Benin GPC-derived peptides were delayed compared to LASV Josiah GPC peptides (Fig. 7C), whereas similar kinetics were observed for CD4<sup>+</sup> T cell responses after stimulation with GPC peptides derived from the different LASV strains (Fig. 7D). We detected CD8<sup>+</sup> T cells producing cytokines in response to Josiah NP peptides at 12 days after infection for all immunized monkeys, starting at day 9 after infection in VB monkeys (Fig. 7E). The CD8<sup>+</sup> T cell responses induced by LASV Benin NP- or LASV Nigeria NP-derived peptides were negligible (Fig. 7F). The T cell responses were negligible for control monkeys, except for the two CN monkeys who survived longer, for which some cytokine-producing T cells were detected at the time of death, mainly CD8<sup>+</sup> T cells responding to LASV GPC peptides (Fig. 7, A and B). In contrast to the postimmunization responses, most CD8<sup>+</sup> T cells produced only IFN- $\gamma$ , and some produced both TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (Fig. 7, A, C, E, and F, pie charts). The same was true for CD4<sup>+</sup> T cells, but a larger proportion of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells was induced (Fig. 7, B and D, pie charts).

We also observed cytokine-producing T cells from 9 days after infection in monkeys challenged 1 year after immunization, with 0.4 to 0.7% responding CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells after stimulation with GPC- and NP-derived peptides by day 12, when the peak of T cell responses was observed (Fig. 8). Thereafter, the T cell response decreased over time. A similar percentage of CD8<sup>+</sup> T cells produced cytokines in response to Josiah GPC peptides 12 days after infection was observed in both VJ-P and VJ-PB monkeys, but only VJ-P monkeys presented a significant increase in the percentage compared to CJ monkeys ( $P = 0.041$ ; Fig. 8A). In response to Josiah NP peptides, the production of cytokines by CD8<sup>+</sup> T cells from VJ-P and VJ-PB was not significant and presented a large variability ( $P > 0.05$ ; Fig. 8B). Although the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells producing cytokines in response to Josiah GPC peptides was similar between VJ-P and VJ-PB at day 12 after infection, responding cells appeared earlier in VJ-P compared to VJ-PB (Fig. 8C). In response to Josiah NP peptides, a significantly higher percentage of CD4<sup>+</sup> T cells produced cytokines in VJ-PB monkeys compared to CJ monkeys ( $P = 0.036$ ; Fig. 8D). In contrast, negligible T cell activation was observed for control monkeys during the whole course of LASV infection (Fig. 8, A to D). Overall, the prime-boost immunization regimen did not improve T cell responses over those induced by prime-only vaccination. Again, the responses mainly consisted of TNF- $\alpha$ <sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and TNF- $\alpha$ <sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>

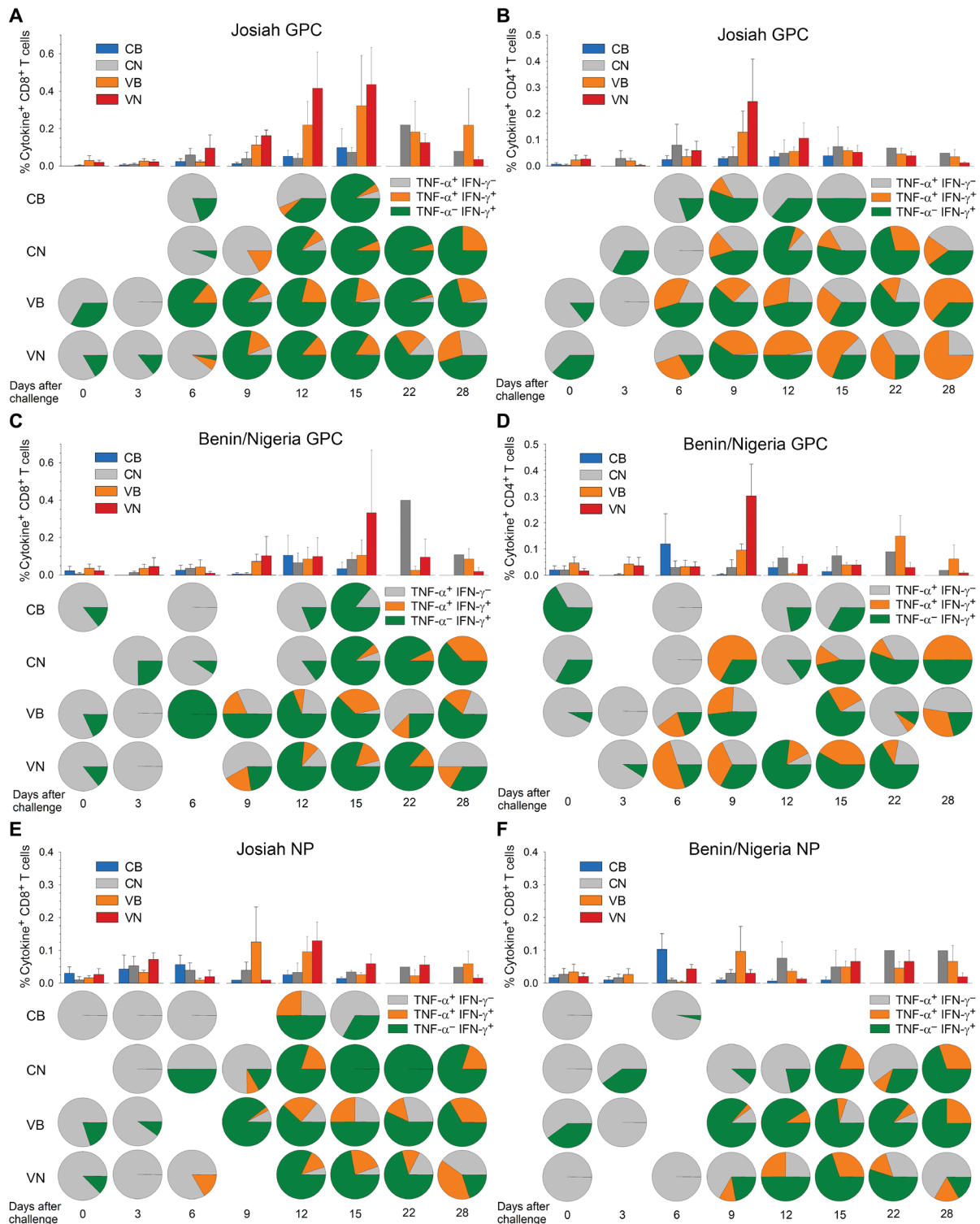
T cells (Fig. 8, pie charts). Similar percentages of CD4<sup>+</sup> T cells expressed CD154, a costimulation molecule expressed by antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells (31), after stimulation with GPC- and NP-derived peptides for all immunized monkeys (Fig. 8E). The peak of expression of CD154 was observed 12 days after infection in response to Josiah GPC and NP peptides, and thereafter decrease over time, as observed with production of cytokines. Again, there was no difference in the intensity of the response between the prime-only and prime-boost regimens ( $P > 0.05$ ; Fig. 8E).

### DISCUSSION

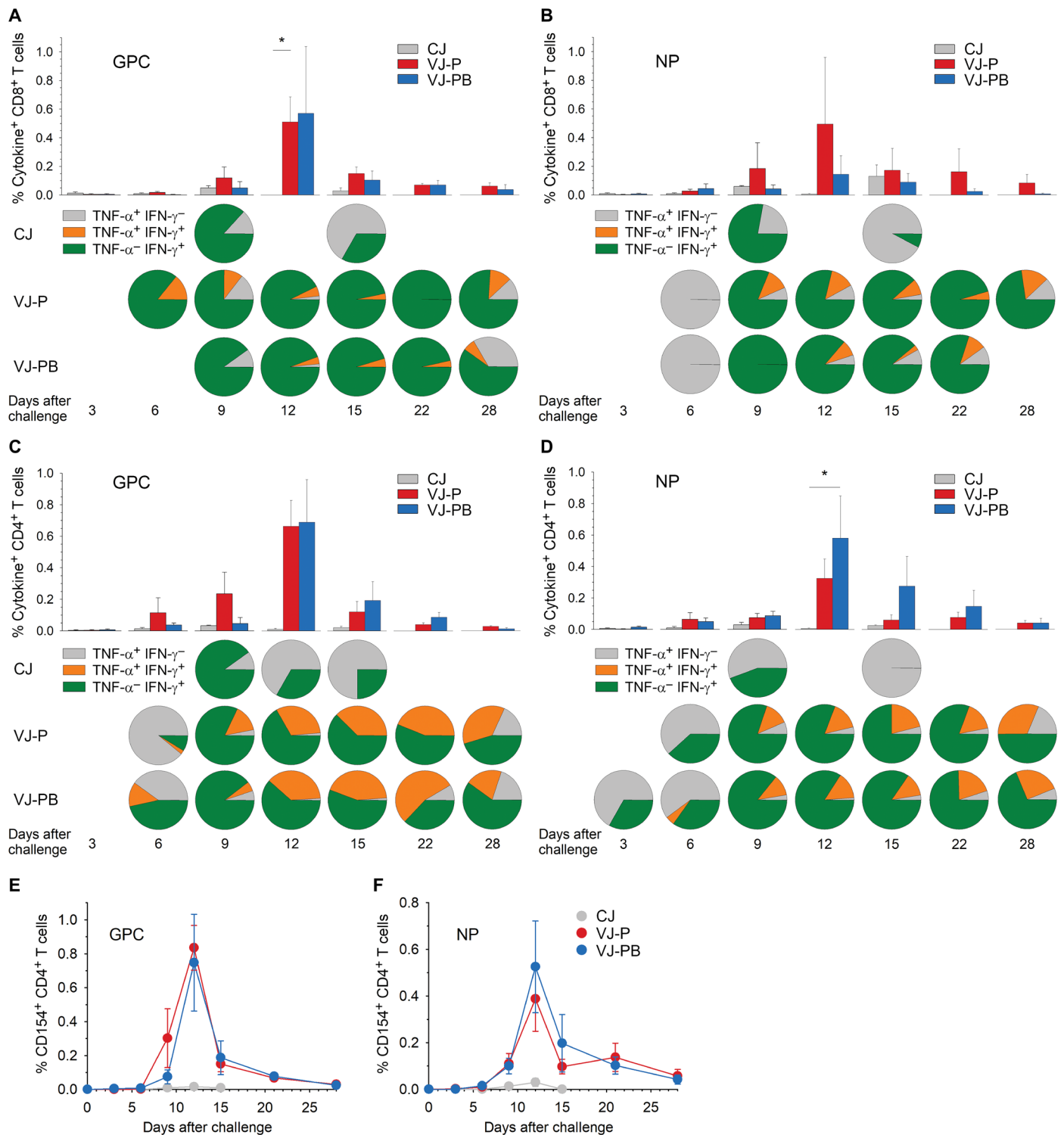
Here, we demonstrated the ability of the MeV-NP vaccine to protect against divergent LASV strains and confer long-term immunity after a single shot. The large and increasing genetic diversity of LASV strains is challenging, and a vaccine should confer full protection against existing and emerging LASV strains. New viral lineages have recently emerged (7), and the circulation area of LASV is expanding (32, 33). We chose to use LASV strains belonging to lineages II and VII that were isolated in 2016 (7). Our rationale was that lineage II, along with the closely related lineage III, represents the strains circulating in Nigeria, the most highly endemic country for Lassa fever. Lineage VII is highly divergent from the Josiah strain used to generate our vaccine but is also interesting because of its recent emergence and high degree of lethality in humans, estimated to be between 30 and 50% (7). Lineage VI viral strains have never been associated with human cases, and lineage V strains are close to those of lineage IV and present lower pathogenicity in monkeys (34, 35). Therefore, the protection achieved against lineage II and lineage VII LASV strains suggests that the MeV-NP vaccine would be efficient against all circulating strains of LASV capable of infecting humans. Previous studies used lineage I, lineage II, homologous lineage IV, or closely related lineage V strains (17, 19, 36, 37). We show that the lineage VII LASV strain is highly pathogenic in monkeys, with a uniformly lethal Lassa fever at least as severe as that caused by the Josiah strain. In contrast, the lineage II strain used in this study, LASV Nigeria, appears to be less severe in nonhuman primates, with one control monkey surviving acute Lassa fever and the death of another delayed relative to that caused by the other strains.

We used two different routes of vaccine inoculation during these experiments. The monkeys challenged with heterologous strains were immunized using the same subcutaneous route and dose as that used for the first preclinical evaluation (10), and, as previously reported, neither adverse effects nor vaccine shedding or viremia were observed. Lower doses of vaccine and the intramuscular route are used for clinical trials in humans. Thus, monkeys challenged 1 year after immunization received either 10<sup>5</sup> (prime-boost) or 10<sup>6</sup> (prime only) TCID<sub>50</sub> by the intramuscular route, 10<sup>5</sup> corresponding to the highest dose used in the phase 1 study in humans. Neither shedding nor adverse effects were observed. Overall, these data confirm the safety of the MeV-NP vaccine in monkeys.

As previously reported (10), inconsistent LASV IgM responses were induced after immunization with MeV-NP, and no NABs were detected. IgG specific for LASV-derived antigens appeared at low titers after vaccination in the prime-only regimen but with different kinetics depending on the route of immunization. Although LASV IgG was detected 2 to 3 weeks after immunization by the subcutaneous route, they appeared later when the intramuscular route was used. The reason for this discrepancy is unclear, as IgG directed



**Fig. 7. T cell responses induced in cynomolgus monkeys challenged 1 month after immunization.** (A to D) Quantification of the proportion of CD8<sup>+</sup> (A) and CD4<sup>+</sup> (B) T cells specific for LASV GPC peptides derived from Josiah LASV or of CD8<sup>+</sup> (C) and CD4<sup>+</sup> (D) T cells specific for LASV GPC peptides derived from Benin or Nigeria LASV. (E and F) Quantification of CD8<sup>+</sup> T cells specific for LASV NP peptides derived from Josiah LASV (E) or Benin or Nigeria LASV (F). The percentage of T cells producing TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  in response to peptide stimulation among total CD8<sup>+</sup> T cells is presented according to the time after challenge after subtraction of the respective value measured for unstimulated T cells. Each bar represents the means  $\pm$  SEM of six samples for Josiah LASV and three samples for Benin and Nigeria LASV. The proportion of each sub-population of cytokine-positive T cells is presented in the pie charts. An unpaired t test or a Mann-Whitney test was performed after testing normality to compare Benin LASV- or Nigeria LASV-infected monkeys.



**Fig. 8. T cell responses induced in cynomolgus monkeys challenged 1 year after immunization.** (A and B) Quantification of CD8<sup>+</sup> T cells specific for LASV GPC (A) or NP (B) peptides derived from Josiah strain. (C and D) Quantification of CD4<sup>+</sup> T cells specific for LASV GPC (C) or NP (D) peptides derived from the Josiah strain. The percentage of T cells producing TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  in response to peptide stimulation among total CD8<sup>+</sup> T cells is presented according to the time after challenge after subtraction of the respective value measured for unstimulated T cells. Each bar represents the means  $\pm$  SEM of eight samples. The proportion of each subpopulation of cytokine-positive T cells is presented in the pie charts. Statistical significance: \* $P \leq 0.05$ , one-way ANOVA. (E and F) Percentage of CD4<sup>+</sup> T cells expressing CD154 in response to stimulation with Josiah GPC (E) or Josiah NP (F) peptides according to the time after challenge. A one-way ANOVA test was used.

Downloaded from <https://www.science.org> at Institut Pasteur on October 28, 2021

against heterologous antigens were detected from 2 weeks after immunization in other studies using the same Schwartz vaccine vector and intramuscular route (38–40). IgG directed against both GPC and NP expressed by the vaccine was induced at similar concentrations and was detected at earlier time points than previously observed (10), probably due to the higher sensitivity of the recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) than the native antigen-based assay.

Although 10-fold less MeV-NP particles were injected during the prime-boost regimen relative to the prime-only regimen for the long-term immunization experiment, the two-dose regimen clearly improved the humoral response. IgG induced by Josiah-derived antigens recognized lineage VII antigens, whereas the lack of lineage II antigen recognition was probably due to the lower sensitivity of the assay, or the low titers of IgG induced after the single immunization. The induced humoral responses persisted for at least 1 year after the prime-boost immunization, whereas LASV IgG was detected in only half of the monkeys at day 317 after a single vaccination and in none at 383 DPI. As previously observed (10), a moderate but notable percentage of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells producing mainly TNF- $\alpha$  and not IFN- $\gamma$  in response to GPC- and NP-derived peptides circulated after immunization. The intensity of the T cell responses induced by our vaccine was similar to that observed with other candidates in monkeys (18, 41). T cells induced by LASV Josiah-derived antigens were able to recognize LASV Benin- and LASV Nigeria-derived antigens, confirming that the MeV-NP vaccine is able to induce T cells with broad specificity against LASV diversity and demonstrating the ability of vaccine-induced T cells to cross react with heterologous LASV strains. Such cross-reactivity was expected, as common immunodominant peptides have been described for T cell responses induced in survivors infected with different LASV lineages (42, 43). A lower percentage of specific T cells was observed with heterologous strains compared to Josiah LASV in response to NP but not to GPC. This may be due to the lower amino acid homology between strains observed for NP than for GPC. Nevertheless, this lower recognition of heterologous LASV NP is still compatible with the improved efficacy of a vaccine expressing both GPC and NP. Several reports suggest that GPC is required for an LASV vaccine and that the presence of NP improves efficacy (36, 44), particularly if the immunosuppressive exonuclease domain of LASV NP is abrogated (10). Having the NP in addition to GPC could help to protect against heterologous strains and may induce a more durable immunity, as suggested by the efficacy of the ML29 candidate, also based on the expression of Josiah LASV GPC and NP, against lineage II LASV (36).

As for the humoral responses, the kinetics of the T cell responses differed according to the immunization routes, with the peak of responding T cells observed later after immunization by the intramuscular route. Once again, we have no explanation for such a difference. In contrast to the results obtained for LASV IgG, boosting monkeys did not improve T cell responses. The maximum percentage of LASV-specific T cells was even measured 1 week later than in monkeys that received a single intramuscular shot. This delayed response probably resulted from the lower dose of vaccine used for the prime-boost regimen. The lack of a boost effect may be due to the difference in dose, but similar observations were described for other MeV-based vaccine candidates independently of dose differences (38, 39), suggesting that T cells might not benefit from a prime-boost strategy. The production of cytokine by T cells in response to

LASV-derived peptides was only detected a few weeks after immunization, probably reflecting the effector phase of the response. In vitro stimulation of PBMCs with LASV peptides followed by a short-term culture demonstrated that memory T cells with cytotoxic potential were still present in the circulation 1 year after immunization. Therefore, MeV-NP induced humoral and cellular responses that persist at least 1 year, even after a single shot.

All immunized monkeys were protected after the challenge, regardless of the LASV strain used, even 1 year after immunization for the homologous Josiah strain. The efficacy of a single dose of MeV-NP after 1 year is similar to the protection observed when monkeys were challenged 1 month after immunization (10), with no clinical signs, no alteration of biological parameters, and only a transient increase in body temperature. Moreover, infectious LASV was not detected in plasma nor in most of the swabs, although we detected elevated transient viral RNA load in plasma and swabs, as well as residual viral loads in organs as compared to previous studies evaluating monkeys challenged 1 month after vaccination. Overall, the protection sustained after 1 year was similar for the prime-boost regimen, aside from one monkey in the prime-boost group that exhibited sterilizing immunity, suggesting that one-high dose shot provides comparable long-term immunity as a two-low dose regimen. This is an important finding, as a one-dose vaccine would provide a valuable advantage in endemic countries to perform mass vaccination or a ring vaccination strategy during an outbreak. A vaccine also has to confer long-term immunity, as regular boosts would be difficult to perform in endemic countries. Our results suggest that the MeV-NP vaccine generates robust long-term immunity. In contrast, a VSV-based vaccine expressing LASV GPC protected only 71% of guinea pigs 1 year after immunization (37).

A single shot of MeV-NP confers efficient protection against a lineage II LASV strain. No clinical signs were observed after challenge, and biological parameters were not altered. Viral replication was efficiently controlled in these immunized monkeys, as only very low and transient viremia was detected in the plasma but not in swabs, and only one monkey showed traces of infectious LASV in the spleen and liver. A low concentration of residual viral RNA was present in the organs at the necropsy, confirming that the monkeys were fully protected against the disease but that the immunity was not sterilizing. These results are consistent with those obtained in monkeys immunized with the VSV-based vaccine and challenged with a lineage II LASV strain, with measurable viral replication (17). MeV-NP-immunized monkeys were also protected against lineage VII LASV, with no alteration of biological parameters, but some mild signs were transiently observed, together with a transient increase in body temperature. A low degree of viral replication occurred in these monkeys, with a transient infection and viral RNA load in the plasma and swabs. The residual viral load in the organs was similar to that observed in lineage II-challenged immunized monkeys. Low concentrations of LASV RNA were found in the brains of immunized monkeys, but no viral antigen was detected in brain sections. Moreover, no neurological signs were observed in immunized monkeys, confirming that no neurological lesion was induced. This difference in protection relative to that against lineage II LASV is probably due to the high pathogenicity of Benin LASV in monkeys and the large genetic diversity between lineages IV and VII. As lineage VII LASV has never been evaluated before, the ability of other vaccines to protect against this strain is unclear. Given its high pathogenicity and genetic distance from the Josiah

strain, lineage VII is likely a pertinent strain that should be used for future vaccine challenge studies. Cross-protection against less divergent strains, such as non-Josiah lineage IV strains or lineage V strains, which also show lower pathogenicity, is relatively easy to achieve (19). Given the large and increasing genetic diversity of circulating LASV strains (2, 7, 8, 45, 46), it is crucial to validate vaccines against those that are the most challenging.

As previously reported (10), both humoral and cellular responses were markedly boosted after challenge. High titers of LASV-specific IgG were induced in the first week after infection, regardless of the LASV strain used. Antibodies recognized lineage II and lineage VII antigens with the same efficiency as for homologous Josiah LASV antigens, confirming the potential cross-reactivity against the entire diversity of LASV. High concentrations of LASV IgG were also induced in control monkeys but later during the course of Lassa fever. NABs were induced at moderate titers in all immunized monkeys 2 weeks after infection, as well as in the surviving lineage II-infected control monkey. The NABs were equally potent against both homologous and heterologous LASV strains, confirming once again their cross-reactivity. Higher titers of NABs were induced when the monkeys were challenged 1 year after immunization. This discrepancy could be due either to the longer period before the challenge or to the infection with homologous LASV. Moreover, maturation of antibody response through somatic hypermutation could also explain this observation. There was no notable difference between the prime-only and prime-boost regimens in terms of the humoral response when the monkeys were challenged 1 year after immunization. T cell responses were also boosted after challenge with the Josiah strain. Again, there were no observable differences between the prime-only and prime-boost monkeys. The GPC- and NP-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses were of similar intensity as those observed when the monkeys were challenged 1 month after a single shot of MeV-NP (10), suggesting that the T cell immunity induced by MeV-NP vaccination is long-lasting. In addition, the diversity of T cell phenotypes was similar to that observed with a 1-month postimmunization challenge (10). CD4<sup>+</sup> T cells also expressed CD154 in response to peptide stimulation, confirming their activation and specificity to LASV (31, 47). These results are highly encouraging, as T cells are required for the control of LASV infection (10, 16, 18, 44, 48). The intensity of the T cell responses induced after the challenge with heterologous strains were lower than those against Josiah LASV (10), probably because only epitopes conserved between the different LASV lineages were able to reactivate the Josiah-specific memory T cells. Consistently, major histocompatibility complex I- and II-specific epitopes conserved between LASV lineages and other arenaviruses have been described (16, 43, 49, 50), suggesting that Josiah LASV-specific T cells may protect against divergent LASV strains. We did not detect T cells producing cytokines in nonimmunized monkeys challenged with lineage II or VII LASV, except for some CD8<sup>+</sup> T cells detected 20 days after infection in one lineage II-infected control monkey. Only a low percentage of responding T cells was measured 28 days after challenge in the surviving control monkey. The lower intensity of T cell responses induced by heterologous LASV relative to a homologous challenge may have been involved in the difference in the efficacy of the control of viral replication observed in the MeV-NP-immunized monkeys.

Our study has several limitations. Our results did not allow to clearly identify the mechanisms involved in the control of LASV after immunization. Both humoral and cellular immune responses

are induced by the vaccine and are strongly boosted after the challenge coincidentally with the control of viral replication. In addition, NABs appeared in all immunized monkeys during the course of LASV infection. However, their absence at the time of challenge and until 1 to 2 weeks later suggests that even if they participate in protection, NABs are poor predictors of vaccine effectiveness, consistent with our previous observations (10). Passive transfer of neutralizing human monoclonal antibodies can control Lassa fever in nonhuman primates and may also act in humans. However, as we failed to detect NAB in the plasma of immunized nonhuman primates before the challenge and because only moderate concentrations of non-neutralizing LASV IgG were present, it is unlikely that passive transfer of this material could be efficient against a challenge and that the control of LASV in MeV-NP-immunized monkeys relies on direct neutralization of viral inoculum. Non-neutralizing IgG and, particularly, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells are probably crucial for controlling LASV after MeV-NP immunization, as also suggested by previous studies (10, 44). The protection induced by a Lassa-Rabies vaccine was shown to be mediated by non-neutralizing LASV-specific IgG through ADCC and phagocytosis (51). In our study, ADCC was not correlated with protection as both control and immunized monkeys developed antibodies able to trigger ADCC. For cross-protection experiments, ADCC-inducing ability of the plasma was equivalent between control and immunized monkeys over the disease course, arguing against a primary role of this mechanisms in the protection. In contrast, plasma of immunized monkeys induced ADCC in the first days after challenge in the long-term experiment. It is therefore difficult to make conclusions on the role of ADCC in the protection induced by MeV-NP. A limitation of our study is the lack of identification of the immune correlates of protection. Although our data point toward a preponderant role of T cell responses, the depletion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell before the challenge would confirm the role of cellular immunity after MeV-NP vaccination and represents a future direction for the field. The number of monkeys used in the experiments is another limitation of our study. Our biosafety level (BSL)-4 animal facilities can only accommodate 12 monkeys, in agreement with animal welfare and the need to reduce animal use.

Lassa fever is an increasing threat to public health in West Africa due to the wide distribution of natural reservoirs of LASV and the frequent introduction of LASV into the human population (2). In total, 180 million people are considered to be at risk for Lassa fever (4), and they often live in remote areas with limited diagnosis and poor health care structures. In addition, there is no effective treatment available aside from the reference treatment, ribavirin, for which the true effectiveness is debatable (52). Thus, the most efficient way to combat Lassa fever is to perform mass vaccination in endemic areas using an efficient vaccine that is able to confer long-term immunity against the entire diversity of LASV with a minimum number of doses. The results provided here suggest that MeV-NP could be one such candidate, as it induces long-term protective immunity after a single dose and protects against highly pathogenic LASV strains that are highly divergent from the Josiah strain. Moreover, the MeV vaccine is known to be safe and clinical trials of other MeV-based vaccines have confirmed that adding heterologous antigens to the MeV backbone does not modify the safety profile of the vaccine (23, 24, 53). The MeV-NP candidate is currently being evaluated in humans in a phase 1 trial (NCT04055454), and a phase 2 trial is in preparation.

**MATERIALS AND METHODS****Study design**

Our objectives were to evaluate the efficacy of MeV-NP, a recombinant measles Schwarz vaccine expressing LASV GPC and NP, against heterologous LASV strains from lineages II and VII (cross-protection study) and its ability to confer long-term protection against the homologous strain from lineage IV (long-term protection study). Both studies were carried out on female monkeys (*Macaca fascicularis*, 17 to 27 months old, 2 to 3 kg). In the cross-protection study, groups of three monkeys were immunized in A2 facilities (SILABE) by subcutaneous injection of  $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of MeV-NP (two vaccinated groups) or MeV vaccine strain Schwarz (two control groups). Blood draws, oral and nasal swabs, and urine sampling were performed every 2 to 3 days during the first 2 weeks and then once a week up to day 37. After 25 days, the monkeys were transported to BSL-4 facilities (Laboratoire P4 INSERM–Jean Mérieux). At day 37, one MeV-NP–vaccinated group and one control group were subcutaneously challenged with 3000 FFU of LASV Nigeria (Lineage II strain BEN-16081) (7), the two other groups were challenged with 3000 FFU of LASV Benin (lineage VII, strain BEN-16131) (7). In the long-term protection study, one group of four monkeys was immunized by a single intramuscular injection of  $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> of MeV-NP and another group of four monkeys received two injections of  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of MeV-NP 35 days apart. Another control group of three monkeys received two intramuscular injections of  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> of MeV at 35 days interval. After the first and second immunizations, blood draws, oral and nasal swabs, and urine sampling were performed every 2 to 3 days during the first 2 weeks and then once a week. Similar sampling was then performed every month for more than a year. Monkeys were transported to the BSL-4 facility 10 days before being challenge by a subcutaneous injection of 1500 FFU of LASV Josiah (lineage IV strain). Monkeys from a single group were placed together in a chamber under negative pressure to avoid mixing with monkeys from other groups. Clinical follow-up was performed group by group to avoid mixing and therefore was not blinded.

After challenge, monkeys were followed for clinical signs and euthanized according to scoring based on body temperature, body weight, feeding, dehydration, behavior, and clinical signs (table S4). Blood draws, oral and nasal swabs, and urine sampling were performed every 2 to 3 days during the first 2 weeks and then once a week up to day 28. All monkeys reaching a clinical score of 15 were euthanized before the end of the experimentation (28 to 30 days after challenge) to limit their suffering. All procedures were approved by the Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Strasbourg (2018100414445313) and the Comité Régional d’Ethique pour l’Expérimentation Animale Rhône Alpes (2018101211262022 and 2019100810333758).

**Cell cultures, virus, and infections**

Vero NK and Vero E6 cells were grown in GlutaMAX Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Life Technologies) supplemented with 5% fetal bovine serum and 0.5% penicillin-streptomycin. For the preparation of MeV-NP and MeV stocks, Vero NK cells were infected at a multiplicity of infection of 0.01 and then incubated at 37°C for 2 to 3 days. To harvest the virus, cells were scraped into Opti-Minimum Essential Medium (MEM) I reduced-serum medium and freeze-thawed twice. Titers were determined by TCID<sub>50</sub> titration on Vero NK cells. Vaccine stocks for monkey immunization were prepared in 1% DMEM. Stocks of LASV Josiah (provided by

S. Becker, Philipps-Universität), LASV BEN-16081 Lineage II (LASV Nigeria), and LASV BEN-16131 Lineage VII (LASV Benin) were produced and titrated on Vero E6 cells. Inoculums were prepared in phosphate-buffered saline (PBS). Monkeys received 1500 FFU by the subcutaneous route for infection with the Josiah strain and 3000 FFU by the same route for BEN-16081 and BEN-16131. Viral titers in plasma and organs were determined by titration on Vero E6 cells. For plaque reduction neutralization assays, plasma samples were diluted and mixed with 150 FFU of LASV. After 1 hour, the mixtures were added to Vero E6 cells and incubated for 1 hour before addition of carboxymethylcellulose diluted in DMEM. After 7 days, the number of foci was calculated by focus-forming immunodetection using anti-LASV antibodies, as described in (54).

**Quantitative RNA analysis**

Quantitative RT-PCR for viral RNA was performed with the SensiFAST Probe No-ROX One-Step Kit (Bioline) using NP-specific primers and probes for the Josiah (forward, 5'-CTTTCACCAGGGTGTGCT-3'; reverse, 5'-GTCACCTCAGACAATGGATGG-3'; probe, 5'-TGAACATTCCAAGAGCC-3'), Nigeria (forward, 5'-AGTATGTTCTCGTAAGGGTTC-3', reverse, 5'-ACTTCAGTTTGGAGCTGC-3'; probe, 5'-TACACCTCAGACAATGGATGG-3'), and Benin (forward, 5'-TAAGGATTCCTTTCTCCAG-3'; reverse, 5'-ACTCCCAAACCATGGATG-3'; probe, 5'-TCCCAAGACTCCTCTTC-3') strains and quantified using corresponding NP-specific synthetic RNA standards developed in house (55). RT was performed at 45°C for 10 min. After an activation step at 95°C for 2 min, amplification (95°C 1 min, 52°C 30 s) was repeated for 45 cycles, and then reaction was cooled down to 37°C. Limits of detection were 4284 RNA copies/ml for LASV Josiah and Benin and 42,840 copies/ml for LASV Nigeria.

**Immunohistochemistry**

At death, tissues were collected and fixated for a minimum of 14 days in 10% formalin. The samples were then dehydrated using a STP120 (Microm Microtech) and paraffin-embedded with a TES99 device (Tech-Inter). Three-micrometer tissue sections were prepared using a Leica LM2125 RTS microtome, and unmasking was performed in a citrate buffer using a Retriever 2100 (Prestige Medical). Brain tissue sections were blocked for 30 min in PBS/3% bovine serum albumin (BSA), and LASV immunostaining was performed using an anti-GP2c mouse monoclonal antibody [L52-272-7, provided by P. Jahrling, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID)] at a 1:50 dilution overnight, detected with an anti-mouse secondary antibody coupled with a peroxidase (N-Histofine, Microm Microtech). 3-Amino-9-ethylcarbazole (Sigma-Aldrich) was used to stain the tissue sections, and they were counterstained with hematoxylin (Leica) before observation with a Dmi8 Leica microscope. Images were taken with the LASX software (Leica).

**T cell activation assay**

LASV-specific T cells were analyzed from 200 µl of fresh whole blood. Cells were incubated with overlapping GPC or NP peptides and anti-human CD28 and anti-human CD49d antibodies (2 µg/ml; BD Biosciences) and brefeldin A (10 µg/ml; Sigma-Aldrich) for 6 hours at 37°C. Staphylococcus enterotoxin A (1 µg/ml; Sigma-Aldrich) and PBS were used as positive and negative activation controls, respectively. The peptides (1 µg/ml each) were 15 amino acids long with an overlap of 11 residues and spanned the complete LASV GPC or

NP (Josiah, Nigeria, or Benin strains). PBS-EDTA (2 mM final concentration) was added to the samples before staining for CD3 (clone SP34-2, allophycocyanin (APC), 14  $\mu$ l per sample), CD4 (clone L200, Alexa Fluor 700, 5  $\mu$ l per sample), and CD8 (clone SK1, APC-H7, 5  $\mu$ l per sample) (BD Biosciences) in the presence of LIVE-DEAD stain (Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 4°C in the dark. Red blood cells were then lysed using Pharm Lyse (BD Biosciences). Cells were fixed and permeabilized using the FoxP3 staining buffer set (Miltenyi Biotec) following the manufacturer's instructions before intracellular staining with antibodies against IFN- $\gamma$  [clone B27, phycoerythrin (PE), 20  $\mu$ l per sample], and TNF- $\alpha$  (clone Mab11, PE-Cy7, 5  $\mu$ l per sample) (BD Biosciences) and, in some experiments, to CD154 (clone 5C8, VioBlue, 2  $\mu$ l per sample) (Miltenyi Biotec) for 30 min at 4°C in the dark. Cells were analyzed by flow cytometry using an LSRFortessa cytometer (BD Biosciences) or a 10-color Gallios cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed using Kaluza 2.0 software (Beckman Coulter).

### T cell reactivation assays

Thawed PBMCs were plated in 96-well plates at 250,000 cells per well in RPMI 1640 with GlutaMAX (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated cynomolgus monkey plasma, 0.5% penicillin-streptomycin, 1% nonessential amino acids, 25 mM Hepes, and 1 mM sodium pyruvate and incubated overnight at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. PBMCs were then mock-stimulated or stimulated with overlapping GPC or NP peptides and anti-human CD28 and anti-human CD49d antibodies (2  $\mu$ g/ml; BD Biosciences). One and 2 days later, interleukin-2 (IL-2) and IL-7 (Miltenyi Biotec) were added at 10 U/ml. Five days after peptide stimulation, cells were stained with CD3 (clone SP34-2, V450, 1.25  $\mu$ l per sample), CD4 (clone L200, APC at 5  $\mu$ l per sample or Alexa Fluor 700 at 1.25  $\mu$ l per sample), CD8 (clone SK1, APC-H7, 1.25  $\mu$ l per sample), CD134 (clone L106, PE, 5  $\mu$ l per sample), CD69 (clone FN50, PerCP-Cy5.5, 1.25  $\mu$ l per sample), CD27 (clone M-T271, PE, 5  $\mu$ l per sample), CD28 (clone CD28.2, PE-CF594, 1.25  $\mu$ l per sample), CD45RA (clone 5H9, PE-Cy7, 1.25  $\mu$ l per sample), CD95 (clone DX2, APC, 2.5  $\mu$ l per sample) (BD Biosciences), HLA-DR [clone AC122, fluorescein isothiocyanate (FITC), 0.5  $\mu$ l per sample], CCR7 (clone REA546, PerCP-Vio700, 0.5  $\mu$ l per sample) (Miltenyi Biotec), CD137 (clone 4B4-1, PE-Cy7, 2.5  $\mu$ l per sample), CD279 (clone EH12.2H7, PE/Dazzle 594, 2.5  $\mu$ l per sample) (BioLegend), and CD38 (clone AT-1, FITC, 5  $\mu$ l per sample) (STEMCELL Technologies) antibodies for 30 min at 4°C in the dark in the presence of LIVE-DEAD stain (Thermo Fisher Scientific). Cells were permeabilized using the FoxP3 staining buffer set (Miltenyi Biotec) as per the manufacturer's instructions and stained with Ki67 (clone B56, PE-Cy7, 1.25  $\mu$ l per sample), GrzB (clone GB11, PE, 1.25  $\mu$ l per sample) (BD Biosciences), and perforin (clone Pf-344, FITC, 1.25  $\mu$ l per sample) (Mabtech) antibodies. Cells were analyzed by flow cytometry using an LSRFortessa cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using Kaluza 2.0 software (Beckman Coulter).

### Hematology and biochemistry

The number of circulating CD4 and CD8 T cells, B cells, NK cells, monocytes, and neutrophils was determined by flow cytometry using cell-specific panels. Plasma concentrations of ALT and AST, LDH, creatine kinase, amylase, total bilirubin, direct bilirubin, creatinine, urea, iron, uric acid (UA), total proteins, ALB, and CRP were measured using a Pentra C200 analyzer (Horiba Medicals).

### Enzyme-linked immunosorbent assays

For the determination of LASV-specific IgM antibody titers, MaxiSorp plates (Nunc) were coated overnight at 4°C with antibodies directed against nonhuman primate IgM  $\mu$ -chain (Sigma-Aldrich). Coated plates were then blocked in PBS/2.5% BSA for 2 hours at 37°C before incubation with diluted plasma (1:100, 1:400, and 1:1600) or positive and negative control sera for 1 hour at 37°C. Lysates of LASV-infected (Josiah, Nigeria, or Benin) or mock-infected Vero E6 cells (lysed by freeze/thaw cycles for IgM antigens and in borate triton 1% for IgG antigens), as positive and negative antigens, were then added to the plates for 2.5 hours at 37°C before incubating them in a cocktail of anti-LASV monoclonal antibodies (provided by P. Jahrling, USAMRIID) for 1 hour at 37°C. Plates were further incubated with polyclonal peroxidase-conjugated antibodies (Sigma-Aldrich) directed against mouse IgG  $\gamma$ -chain for 1 hour at 37°C. For the determination of LASV-specific IgG antibody titers, PolySorp plates (Nunc) were coated overnight with a lysate of LASV-infected (Josiah, Nigeria, or Benin) or mock-infected Vero E6 cells, as positive and negative antigens, respectively. For the determination of Josiah NP- and Josiah GP-specific IgG antibody titers, MaxiSorp plates (Nunc) were coated overnight at 4°C with LASV Josiah recombinant NP C terminus and N terminus (2.5  $\mu$ g/ml each) or prefusion GP (5  $\mu$ g/ml) (Zalgen). After blocking with PBS/2.5% BSA for 1 hour, plasma samples were incubated for 1 hour on coated plates at dilutions of 1:250, 1:1000, 1:4000, and 1:16,000. Plates were further incubated with polyclonal peroxidase-conjugated antibodies directed against nonhuman primate IgG  $\gamma$ -chain (Sigma-Aldrich). Tetramethylbenzidine (Eurobio) was used for detection for both IgM and IgG titer determination. The titer of positivity represented the highest dilution that gave a positive signal. The threshold of positivity was calculated as 2  $\times$  mean of three negative plasma samples + 1 SD of the mean. All samples were analyzed in duplicate, and the results are presented as the means of duplicates.

### ADCC assay

MaxiSorp plates (Nunc) were coated overnight with recombinant LASV GP (Zalgen) or recombinant Ebola virus GP (R&D systems) at a concentration of 5  $\mu$ g/ml in sterile PBS. Plates were then washed in sterile PBS and incubated with heat-inactivated EDTA-anticoagulated plasma for 4 hours at 37°C. Freshly isolated PBMCs from healthy naïve cynomolgus monkeys were then added to each well at 500,000 cells per well in the presence of anti-CD107a (clone H4A3, FITC, 10  $\mu$ l per sample; BD Biosciences) and brefeldin A (10  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich), and plates were incubated overnight at 37°C. Cells were then stained with anti-CD20 (clone 2H7, BV421, 2.5  $\mu$ l per sample), anti-CD14 (clone TÛK4, APC, 1  $\mu$ l per sample), anti-CD3 (clone SP34-2, Alexa Fluor 700, 5  $\mu$ l per sample), and anti-CD8 antibodies (clone SK1, APC-H7, 2.5  $\mu$ l per sample) (BD Biosciences) in the presence of LIVE-DEAD stain (Thermo Fisher Scientific), permeabilized using the FoxP3 staining buffer set (Miltenyi Biotec) as per the manufacturer's instructions, and stained with anti-IFN- $\gamma$  (clone B27, PE, 10  $\mu$ l per sample) and anti-Ki67 antibodies (clone B56, PE-Cy7, 2.5  $\mu$ l per sample) (BD Biosciences). Cells were analyzed by flow cytometry using a 10-color Gallios cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed using Kaluza 2.0 software (Beckman Coulter).

### Statistical analysis

Statistical analyses of the flow cytometry data were performed using Sigma Plot 14 (Systat Software Inc.). Data were analyzed using a





29. M. Wolff, J. Kuball, W. Y. Ho, H. Nguyen, T. J. Manley, M. Bleakley, P. D. Greenberg, Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8<sup>+</sup> T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood* **110**, 201–210 (2007).
30. S. Jegaskanda, J. T. Weinfurter, T. C. Friedrich, S. J. Kent, Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. *J. Virol.* **87**, 5512–5522 (2013).
31. M. Frenstsch, O. Arbach, D. Kirchhoff, B. Moewes, M. Worm, M. Rothe, A. Scheffold, A. Thiel, Direct access to CD4<sup>+</sup> T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat. Med.* **11**, 1118–1124 (2005).
32. N. Sogoba, H. Feldmann, D. Safronetz, Lassa fever in West Africa: Evidence for an expanded region of endemicity. *Zoonoses Public Health* **59**, 43–47 (2012).
33. M. Mateo, C. Picard, Y. Sylla, E. Kamo, D. Odegue, A. Journeaux, S. K. Kan, M. Money, D. N'. G. Coulibaly, E. Koffi, S. Meite, V. Akran, H. Kadjo, E. Adjogoua, S. N'. G. Kakou, S. Baize, M. Dosso, Fatal case of Lassa fever, Bangolo District, Côte d'Ivoire, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 1753–1756 (2019).
34. D. Safronetz, J. E. Strong, F. Feldmann, E. Haddock, N. Sogoba, D. Brining, T. W. Geisbert, D. P. Scott, H. Feldmann, 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).
35. N. Baillet, S. Reynard, E. Perthame, J. Hortion, A. Journeaux, M. Mateo, X. Carnec, J. Schaeffer, C. Picard, L. Barrot, S. Barron, A. Vallve, A. Duthey, F. Jacquot, C. Boehringer, G. Jouvion, N. Pietrosemoli, R. Legendre, M. A. Dillies, R. Allan, C. Legras-Lachuer, C. Carbonnelle, H. Raoul, S. Baize, Systemic viral spreading and defective host responses are associated with fatal Lassa fever in macaques. *Commun. Biol.* **4**, 27 (2021).
36. J. R. Carrion Jr., J. L. Patterson, C. Johnson, M. Gonzales, C. R. Moreira, A. Ticer, K. Brasky, G. B. Hubbard, D. Moshkoff, J. Zapata, M. S. Salvato, I. S. Lukashovich, A ML29 reassortant virus protects guinea pigs against a distantly related Nigerian strain of Lassa virus and can provide sterilizing immunity. *Vaccine* **25**, 4093–4102 (2007).
37. D. R. Stein, B. M. Warner, G. Soule, K. Tierney, K. L. Frost, S. Booth, D. Safronetz, A recombinant vesicular stomatitis-based Lassa fever vaccine elicits rapid and long-term protection from lethal Lassa virus infection in guinea pigs. *NPJ Vaccines* **4**, 8 (2019).
38. R. Stebbings, M. Février, B. Li, C. Lorin, M. Koutsoukos, E. Mee, N. Rose, J. Hall, M. Page, N. Almond, G. Voss, F. Tangy, Immunogenicity of a recombinant measles-HIV-1 clade B candidate vaccine. *PLoS ONE* **7**, e50397 (2012).
39. R. Stebbings, B. Li, C. Lorin, M. Koutsoukos, M. Février, E. T. Mee, M. Page, N. Almond, F. Tangy, G. Voss, Immunogenicity of a recombinant measles HIV-1 subtype C vaccine. *Vaccine* **31**, 6079–6086 (2013).
40. S. Brandler, P. Marianneau, P. Loth, S. Lacôte, C. Combredet, M. P. Frenkiel, P. Després, H. Contamin, F. Tangy, Measles vaccine expressing the secreted form of west Nile virus envelope glycoprotein induces protective immunity in squirrel monkeys, a new model of west Nile virus infection. *J. Infect. Dis.* **206**, 212–219 (2012).
41. J. Jiang, P. Banglore, K. A. Cashman, C. S. Schmaljohn, K. Schultheis, H. Pugh, J. Nguyen, L. M. Humeau, K. E. Broderick, S. J. Ramos, Immunogenicity of a protective intradermal DNA vaccine against Lassa virus in cynomolgus macaques. *Hum. Vaccin. Immunother.* **15**, 2066–2074 (2019).
42. B. M. Sullivan, S. Sakabe, J. N. Hartnett, N. Ngo, A. Goba, M. Momoh, J. Demby Sandi, L. Kanneh, B. Cubitt, S. D. Garcia, B. C. Ware, D. Kotliar, R. Robles-Sikisaka, K. Gangavarapu, L. Branco, P. Eromon, I. Odia, E. Ogbaini-Emovon, O. Folarin, S. Okogbenin, P. O. Okokhere, C. Happi, J. C. de la Torre, P. C. Sabeti, K. G. Andersen, R. F. Garry, D. S. Grant, J. S. Schieffelin, M. B. A. Oldstone, High crossreactivity of human T cell responses between Lassa virus lineages. *PLoS Pathog.* **16**, e1008352 (2020).
43. S. Sakabe, J. N. Hartnett, N. Ngo, A. Goba, M. Momoh, J. D. Sandi, L. Kanneh, B. Cubitt, S. D. Garcia, B. C. Ware, D. Kotliar, R. Robles-Sikisaka, K. Gangavarapu, L. M. Branco, P. Eromon, I. Odia, E. Ogbaini-Emovon, O. Folarin, S. Okogbenin, P. O. Okokhere, C. Happi, P. C. Sabeti, K. G. Andersen, R. F. Garry, J. C. de la Torre, D. S. Grant, J. S. Schieffelin, M. B. A. Oldstone, B. M. Sullivan, Identification of common CD8<sup>+</sup> T cell epitopes from lassa fever survivors in Nigeria and Sierra Leone. *J. Virol.* **94**, e00153–20 (2020).
44. S. P. Fisher-Hoch, L. Hutwagner, B. Brown, J. B. McCormick, Effective vaccine for Lassa fever. *J. Virol.* **74**, 6777–6783 (2000).
45. J. T. Manning, N. Forrester, S. Paessler, Lassa virus isolates from Mali and the Ivory Coast represent an emerging fifth lineage. *Front. Microbiol.* **6**, 1037 (2015).
46. P. B. Jahrling, C. J. Peters, Serology and virulence diversity among Old-World arenaviruses, and the relevance to vaccine development. *Med. Microbiol. Immunol.* **175**, 165–167 (1986).
47. P. K. Chattopadhyay, J. Yu, M. Roederer, Live-cell assay to detect antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses by CD154 expression. *Nat. Protoc.* **1**, 1–6 (2006).
48. J. ter Meulen, Lassa fever: Implications of T-cell immunity for vaccine development. *Aust. J. Biotechnol.* **73**, 207–212 (1999).
49. M. B. A. Oldstone, H. Lewicki, D. Homann, C. Nguyen, S. Julien, J. E. Gairin, Common antiviral cytotoxic T-lymphocyte epitope for diverse arenaviruses. *J. Virol.* **75**, 6273–6278 (2001).
50. F. Amanat, J. Duehr, L. Oestereich, K. M. Hastie, E. O. Saphire, F. Krammer, Antibodies to the glycoprotein GP2 subunit cross-react between old and new world arenaviruses. *mSphere* **3**, e00189–18 (2018).
51. T. Abreu-Mota, K. R. Hagen, K. Cooper, P. B. Jahrling, G. Tan, C. Wirblich, R. F. Johnson, M. J. Schnell, Non-neutralizing antibodies elicited by recombinant Lassa-Rabies vaccine are critical for protection against Lassa fever. *Nat. Commun.* **9**, 4223 (2018).
52. K. A. Eberhardt, J. Mischlinger, S. Jordan, M. Groger, S. Günther, M. Ramharter, Ribavirin for the treatment of Lassa fever: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* **87**, 15–20 (2019).
53. C. Lorin, L. Segal, J. Mols, D. Morelle, P. Bourguignon, O. Rovira, P. Mettens, J. Silvano, N. Dumey, F. le Goff, M. Koutsoukos, G. Voss, F. Tangy, Toxicology, biodistribution and shedding profile of a recombinant measles vaccine vector expressing HIV-1 antigens, in cynomolgus macaques. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **385**, 1211–1225 (2012).
54. S. Baize, J. Kaplon, C. Faure, D. Pannetier, M. C. Georges-Courbot, V. Deubel, Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *J. Immunol.* **172**, 2861–2869 (2004).
55. J. Schaeffer, X. Carnec, S. Reynard, M. Mateo, C. Picard, N. Pietrosemoli, M. A. Dillies, S. Baize, Lassa virus activates myeloid dendritic cells but suppresses their ability to stimulate T cells. *PLoS Pathog.* **14**, e1007430 (2018).

**Acknowledgments:** We thank P. Regnard (Silabe, Strasbourg) for medical care given to the monkeys. We thank S. Mundweiller, S. Godard, E. Moissonnier, D. Thomas, S. Mély, B. Labrosse, D. Pannetier, and C. Léculier (P4 INSERM-Jean Mérieux, US003, INSERM) for assistance in conducting the BSL-4 experiments. We are grateful to G. Fourcaud and B. Lafoux (Institut Pasteur, CIRI, Lyon) for technical help with histological studies. We thank S. Becker for providing us with the Josiah strain and T. G. Ksiasek, P. E. Rollin, and P. Jahrling for the LASV monoclonal antibodies. We also thank L. Branco (Zalgen Labs) for providing recombinant proteins. We are grateful to THEMIS Bioscience GmbH, a wholly owned subsidiary of Merck & Co. Inc. (E. Tauber, A. Kort, K. Ramsauer, S. Schrauf, Y. Tomberger, and R. Tschmarov), to the Coalition for Epidemic Preparedness and Innovations (R. Hatchett, G. Thiry, and M. Saville), and to C. Gerke (Department of Innovation Development, Institut Pasteur) for invaluable support.

**Funding:** This study was entirely funded by a grant from the Coalition for Epidemic Preparedness and Innovations (CEPI-CFP-001) to S. Baize. **Author contributions:** M.M. and S. Baize conceived the project. M.M., S.R., and S. Baize designed the protocols. M.M. produced the MeV-NP vaccine. L.F. and P.-H.M. took care of the monkeys and performed the immunizations. M.M., S.R., A.J., C.G., X.C., J.H., C.P., N.B., V.B.-C., and O.M. performed the RNA extractions, PBMC isolation, and flow cytometry sample preparation. A.V., S. Barron, O.J., O.L., M.D., and A.D. took care of the monkeys and performed the LASV challenge, scoring, sampling, hematological and biochemical analyses, and necropsies. C.C. and H.R. supervised and validated the BSL-4 protocols. A.J., C.G., M.M., C.P., and S.R. performed the ELISA. M.M. and A.J. performed the ADCC assays. M.M. and S.R. performed the T cell reactivation assays. S.R. and S. Baize performed the flow cytometry analyses. M.M., S.R., and A.J. performed the RT-PCR and quantitative PCR analyses. M.M., S.R., and C.G. performed the viral titrations and seroneutralization assays. J.H. prepared the samples for immunohistological analyses and analyzed them. G.J. was involved in the setup of immunohistological analyses. M.M. and S. Baize analyzed the data and wrote the paper, with the help of F.T. S. Baize supervised the project. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. MeV-NP is protected by U.S. patent Lassa vaccine no. 20200308555. **Data and materials availability:** All data associated with this study are present in the paper or the Supplementary Materials.

Submitted 10 November 2020  
Resubmitted 12 February 2021  
Accepted 15 April 2021  
Published 9 June 2021  
10.1126/scitranslmed.abb6348

**Citation:** M. Mateo, S. Reynard, A. Journeaux, C. Germain, J. Hortion, X. Carnec, C. Picard, N. Baillet, V. Borges-Cardoso, O. Merabet, A. Vallve, S. Barron, O. Jourjon, O. Lacroix, A. Duthey, M. Dirheimer, G. Jouvion, P.-H. Moreau, L. Fellmann, C. Carbonnelle, H. Raoul, F. Tangy, S. Baize, A single-shot Lassa vaccine induces long-term immunity and protects cynomolgus monkeys against heterologous strains. *Sci. Transl. Med.* **13**, eabf6348 (2021).

## A single-shot Lassa vaccine induces long-term immunity and protects cynomolgus monkeys against heterologous strains

Mathieu MateoStéphanie ReynardAlexandra JourneauxClara GermainJimmy HortionXavier CarnecCaroline PicardNicolas BailletVirginie Borges-CardosoOthmann MerabetAudrey VallveStéphane BarronOphélie JourjonOriane LacroixAurélie DutheyManon DirheimerGregory JouvionPierre-Henri MoreauLyne FellmannCaroline CarbonnelleHervé RaoulFrédéric TangySylvain Baize

*Sci. Transl. Med.*, 13 (597), eabf6348. • DOI: 10.1126/scitranslmed.abf6348

### One Shot for Lassa Virus

Up to 180 million people are at risk for infection with Lassa virus (LASV), and the endemic region for LASV is expanding. Thus, there is a critical need to develop a vaccine against LASV, preferably one that protects against multiple lineages of LASV, generates durable immune responses, and can be administered in a single dose. To that end, Mateo *et al.* investigated the ability of a recombinant measles virus vaccine expressing LASV proteins (MeV-NP) to protect nonhuman primates against multiple strains of LASV and to provide protection over a year after vaccination, showing that the vaccine was effective at both. MeV-NP, which is now in clinical trials, represents an advance in the field of LASV vaccine development.

### View the article online

<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abf6348>

### Permissions










<https://www.science.org/help/reprints-and-permissions>

Use of think article is subject to the [Terms of service](#)

---

*Science Translational Medicine* (ISSN 1946-6242) is published by the American Association for the Advancement of Science. 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science Translational Medicine* is a registered trademark of AAAS. Copyright © 2021 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works

## Systemic viral spreading and defective host responses are associated with fatal Lassa fever in macaques

Nicolas Baillet <sup>1,2</sup>, Stéphanie Reynard <sup>1,2</sup>, Emeline Perthame <sup>3</sup>, Jimmy Hortion<sup>1,2</sup>, Alexandra Journeaux<sup>1,2</sup>, Mathieu Mateo <sup>1,2</sup>, Xavier Carnec<sup>1,2</sup>, Justine Schaeffer<sup>1,2</sup>, Caroline Picard<sup>1,2</sup>, Laura Barrot <sup>4</sup>, Stéphane Barron<sup>4</sup>, Audrey Vallve<sup>4</sup>, Aurélie Duthey<sup>4</sup>, Frédéric Jacquot<sup>4</sup>, Cathy Boehringer<sup>4</sup>, Grégory Jouvion <sup>5</sup>, Natalia Pietrosevoli<sup>3</sup>, Rachel Legendre <sup>3</sup>, Marie-Agnès Dillies<sup>3</sup>, Richard Allan<sup>6</sup>, Catherine Legras-Lachuer<sup>6</sup>, Caroline Carbonnelle<sup>4</sup>, Hervé Raoul <sup>4</sup> & Sylvain Baize <sup>1,2</sup>✉

Lassa virus (LASV) is endemic in West Africa and induces a viral hemorrhagic fever (VHF) with up to 30% lethality among clinical cases. The mechanisms involved in control of Lassa fever or, in contrast, the ensuing catastrophic illness and death are poorly understood. We used the cynomolgus monkey model to reproduce the human disease with asymptomatic to mild or fatal disease. After initial replication at the inoculation site, LASV reached the secondary lymphoid organs. LASV did not spread further in nonfatal disease and was rapidly controlled by balanced innate and T-cell responses. Systemic viral dissemination occurred during severe disease. Massive replication, a cytokine/chemokine storm, defective T-cell responses, and multiorgan failure were observed. Clinical, biological, immunological, and transcriptomic parameters resembled those observed during septic-shock syndrome, suggesting that similar pathogenesis is induced during Lassa fever. The outcome appears to be determined early, as differentially expressed genes in PBMCs were associated with fatal and non-fatal Lassa fever outcome very early after infection. These results provide a full characterization and important insights into Lassa fever pathogenesis and could help to develop early diagnostic tools.

<sup>1</sup>Unité de Biologie des Infections Virales Emergentes, Institut Pasteur, Lyon, France. <sup>2</sup>Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), Université de Lyon, INSERM U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR5308, Lyon, France. <sup>3</sup>Hub de Bioinformatique et Biostatistique – Département Biologie Computationnelle, Institut Pasteur, USR 3756 CNRS, Paris, France. <sup>4</sup>Laboratoire P4 INSERM – Jean Mérieux, INSERM US003, Lyon, France. <sup>5</sup>Neuropathologie Expérimentale, Département de Santé Globale, Institut Pasteur, Paris, France. <sup>6</sup>ViroScan3D SAS, Trévoux, France. ✉email: [Sylvain.baize@pasteur.fr](mailto:Sylvain.baize@pasteur.fr)

Lassa Fever is a viral hemorrhagic fever that is endemic in Nigeria and the Mano River Union countries (Sierra Leone, Guinea, and Liberia), with sporadic cases in bordering West African countries and recent outbreaks in Benin<sup>1,2</sup>. Lassa fever represents a significant cause of morbidity and mortality, with tens of thousands of cases annually and thousands of fatalities. The main natural host of Lassa virus (LASV), a Mammarenavirus of the Arenaviridae family, is the widespread and commensal rodent *Mastomys natalensis*, but alternate rodent reservoirs have been described<sup>3</sup>. Rodent-to-human transmission of LASV generally occurs after the inhalation of contaminated dust or cutaneous-mucosal contact with material soiled by rats, and human-to-human transmission is then observed<sup>4</sup>. Approximately 20–40% of hospitalized patients succumb to infection. No licensed vaccine or treatment with demonstrated efficacy is currently available. Lassa fever has been recently listed by the WHO as an epidemic threat requiring urgent preparedness.

The diverse LASV strains are grouped into seven major lineages based on their geographical location. Lineages I, II, and III circulate in Nigeria and lineage IV strains were isolated in the Mano River Union countries of Guinea, Sierra Leone, and Liberia. Three additional lineages have recently emerged in Mali, Cote d'Ivoire, Ghana, Togo, and Benin<sup>2,5–7</sup>. The two strains used in this study, AV and Josiah, belong to lineage V and IV, respectively, and are known to induce a severe disease in humans and non-human primates (NHPs)<sup>8,9</sup>. The AV strain has been isolated in a fatally-infected patient in 2000, whereas the Josiah strain represents the prototypic and reference LASV strain used in almost all studies. These strains are phylogenetically close as they share ~82% of nucleotide homology and 95% of amino acids identity, based on the S segment<sup>9</sup>. A large number of Lassa fever patients experience asymptomatic infections or mild symptoms, such as fever, headache, and asthenia. In other patients, fever, asthenia, anorexia, abdominal pain, nausea, vomiting, diarrhea, cough, and sore throat are observed. Edema of the face and neck, conjunctivitis, hemorrhage, and acute respiratory distress then occur in severe patients. The terminal stage is characterized by multiorgan failure and terminal shock<sup>10</sup>. In survivors, sequelae may appear after recovery, including sensorineural hearing loss<sup>11</sup>. The location of endemic areas and the difficulty in accessing patients have stifled the investigation of Lassa fever in humans. Our current understanding of the pathogenesis and immune response comes from animal models but is still limited. Animals, such as immunocompromised mice and strain 13 guinea pigs, are widely used to screen vaccines and therapeutics, but they fail to mirror human disease<sup>12–15</sup>. Only NHPs fully mimic the clinical signs, viral tropism, immune responses, pathophysiological changes, and various outcomes observed in humans<sup>8,16–21</sup>. LASV infection is believed to begin with the targeting of macrophages and dendritic cells (DCs), with subsequent spreading to other cells<sup>22</sup>. However, direct viral cytopathic effects are not sufficiently severe to account for the observed vascular permeability and multiorgan failure. Thus, the cascade of pathogenic events that leads to terminal shock and death is still poorly known. Similarly, the immune mechanisms that allow patients to clear LASV infection and recover from Lassa fever have not been identified. Although macrophages and DCs may be the first target cells, they are not activated and do not secrete high amounts of cytokines. Low titers of neutralizing antibodies have been observed in NHPs and patients only after recovery and therefore do not correlate with survival. However, we and others have demonstrated that early activation and strong proliferation of T cells are associated with the control of LASV and recovery from Lassa fever in cynomolgus monkeys<sup>8,23,24</sup>. A robust T-cell response was also correlated with viremia resolution in a human case of Lassa Fever<sup>25</sup>. Here, we further explored the pathogenesis of Lassa fever

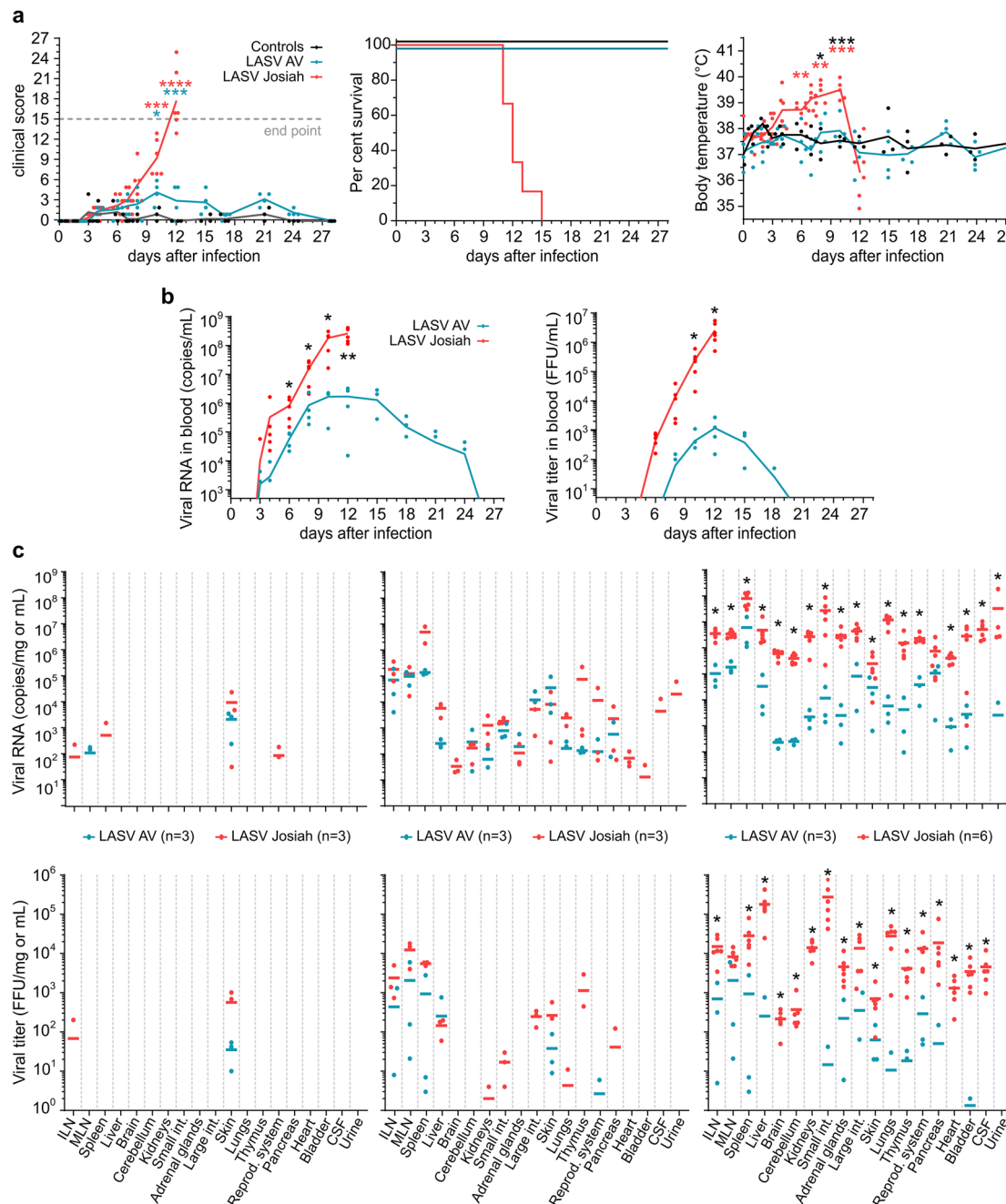
and the immune responses induced by LASV by infecting cynomolgus monkeys with two different LASV strains: Josiah and AV, using the same dose and route of inoculation. Subcutaneous infection with LASV-AV resulted in nonfatal Lassa fever with moderate clinical signs, whereas all the animals infected with LASV-Josiah succumbed to Lassa fever. Thus, we performed a full characterization of Lassa fever pathophysiology in an NHP model by analyzing clinical pathology, viral tropism and dynamics, histopathological changes, cytokine profile, immune responses, and transcriptomic signatures that are associated with fatal and nonfatal Lassa fever during the course of infection and disease.

## Results

### Clinical parameters and viral spreading during Lassa fever.

Cynomolgus monkeys were subcutaneously inoculated at the back of the thigh with 1000 focus-forming units (FFU) of LASV-AV ( $n = 4$ ) or LASV-Josiah ( $n = 6$ ) (Fig. S1a), whereas three were mock-infected. The animals were then monitored for 28 days and attributed clinical scores based on body temperature, weight, food and water intake, behavior, and clinical signs, with an endpoint score of 15. All Josiah-infected animals presented clinical scores that increased relentlessly from day 3 and were killed 11–15 days post infection (DPI) (Fig. 1a). They presented severe symptoms, with a high fever from day 4 and hypothermia at the terminal stages, asthenia, piloerection, anorexia, and continuous weight loss (Fig. S1b). One animal presented epistaxis on the day of euthanasia, whereas abdominal extravasation was detected in two others at necropsy. AV-inoculated animals experienced only mild clinical signs with no fever and a moderate clinical score due to weight loss and recovered by ~15 DPI (Fig. 1a). C-reactive protein (CRP) levels in the plasma of LASV-infected animals increased (Fig. S1c). Viral RNA appeared in the plasma of infected animals as soon as three DPI and infectious particles were first detected in Josiah- and AV-infected animals at 6 and 8 DPI, respectively (Fig. 1b). Viremia peaked at 12 DPI and then decreased in survivors, whereas it increased relentlessly in the Josiah-infected animals. Similar results were obtained in bone marrow (BM) samples, except that viral RNA was still detectable in the survivor samples 28 DPI (Fig. S1 d, e).

Additional groups of three animals were also infected with LASV-AV or LASV-Josiah and sequentially killed 2, 5, and 11 (only AV for this last timepoint) DPI to obtain access to the organs during the incubation period, at the onset of viremia, and at the peak of the disease (Fig. S1a). We also quantified the viral loads in organs obtained from the sequentially killed animals. Viral RNA was detected in the skin, close to the inoculation site, of all Josiah- and AV-infected animals as soon as 2 DPI, as well as in the spleen, inguinal lymph nodes (ILNs), and thymus of one and two, respectively, Josiah-infected animals and in the mesenteric lymph nodes (MLNs) of two of three AV-infected NHPs (Fig. 1c). Infectious particles were also detected in the skin of almost all infected animals. Five days after infection, the highest amounts of viral RNA were found for all animals in the skin, ILNs, MLNs, and spleen. The liver, cerebellum, kidneys, adrenal glands, intestines, lungs, thymus, and pancreas also contained viral RNA. At this timepoint, we detected infectious particles in the secondary lymphoid organs (SLOs), skin, and liver of all Josiah- and most AV-infected animals, whereas we detected LASV in the kidneys, adrenal glands, large intestine, lungs, reproductive system, and pancreas of Josiah-infected animals only. At 11 DPI, corresponding to the peak of the disease, all assessed tissues contained viral RNA. However, viral loads were 10- to 1000-fold higher in organs after infection with LASV-Josiah than with LASV-AV. In AV-infected



**Fig. 1 Clinical and virological features of Lassa fever.** **a** Clinical score, survival rate, and monitoring of body temperature are presented. Results show mean values and individual data for each cohort, except for survival rate, represented with a Kaplan-Meier curve. Controls ( $n=3$ ), LASV-AV ( $n=4$ ), LASV-Josiah ( $n=6$ ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ , as determined by a one-way ANOVA multiple comparisons test for analysis between controls and AV- and Josiah-infected animals and by a  $t$  test for comparison between only controls and AV-infected NHPs. Red asterisks indicate a significant difference between LASV-Josiah and controls, blue asterisks a significant difference between LASV-AV and controls, and black asterisks a significant difference between LASV-Josiah and LASV-AV. **b** Quantification of viral load and infectious particles in the plasma of animals according to the time after LASV infection. Mean values of each cohort and individual data points are presented as the number of viral RNA copies/ml (viral load) or FFU/ml (infectious particles) according to the time after challenge with AV (blue dots) or Josiah (red dots). LASV-AV ( $n=4$ ), LASV-Josiah ( $n=6$ ). The individual data at the time before the death of all LASV-Josiah-infected primates were used to calculate the mean determined at 12 DPI  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , as determined by a Student's  $t$  test. **c** Quantification of viral RNA copies and infectious particles per milligram of various tissues, including inguinal lymph nodes (ILN), mesenteric lymph nodes (MLN), small intestine (Small int.), large intestine (Large int.), the reproductive system (ovaries or testicles) (Reprod. system), and cerebrospinal fluid (CSF) at 2 (left panel), 5 (middle panel), and 11 (right panel) DPI. Individual and mean values are presented for the two cohorts.  $*p < 0.05$ , as determined by a Student's  $t$  test.

animals, the presence of infectious particles in the lymphoid organs, liver, adrenal glands, intestines, skin, lungs, reproductive system, and pancreas was heterogeneous. In contrast, all organs of Josiah-infected NHPs contained very high LASV titers, particularly the

adrenals and central nervous system (CNS). In these animals, the viral RNA to titer ratio, an indicator of the efficiency of viral replication, ranged between 100 and 1000 for most tissues, except for brain and cerebellum, for which it was  $\sim 3000$ , and liver and

pancreas, for which the ratio was ~30 (Fig. S1f). Viral RNA was still present 28 DPI in the tissues of AV-infected animals (Fig. S1g).

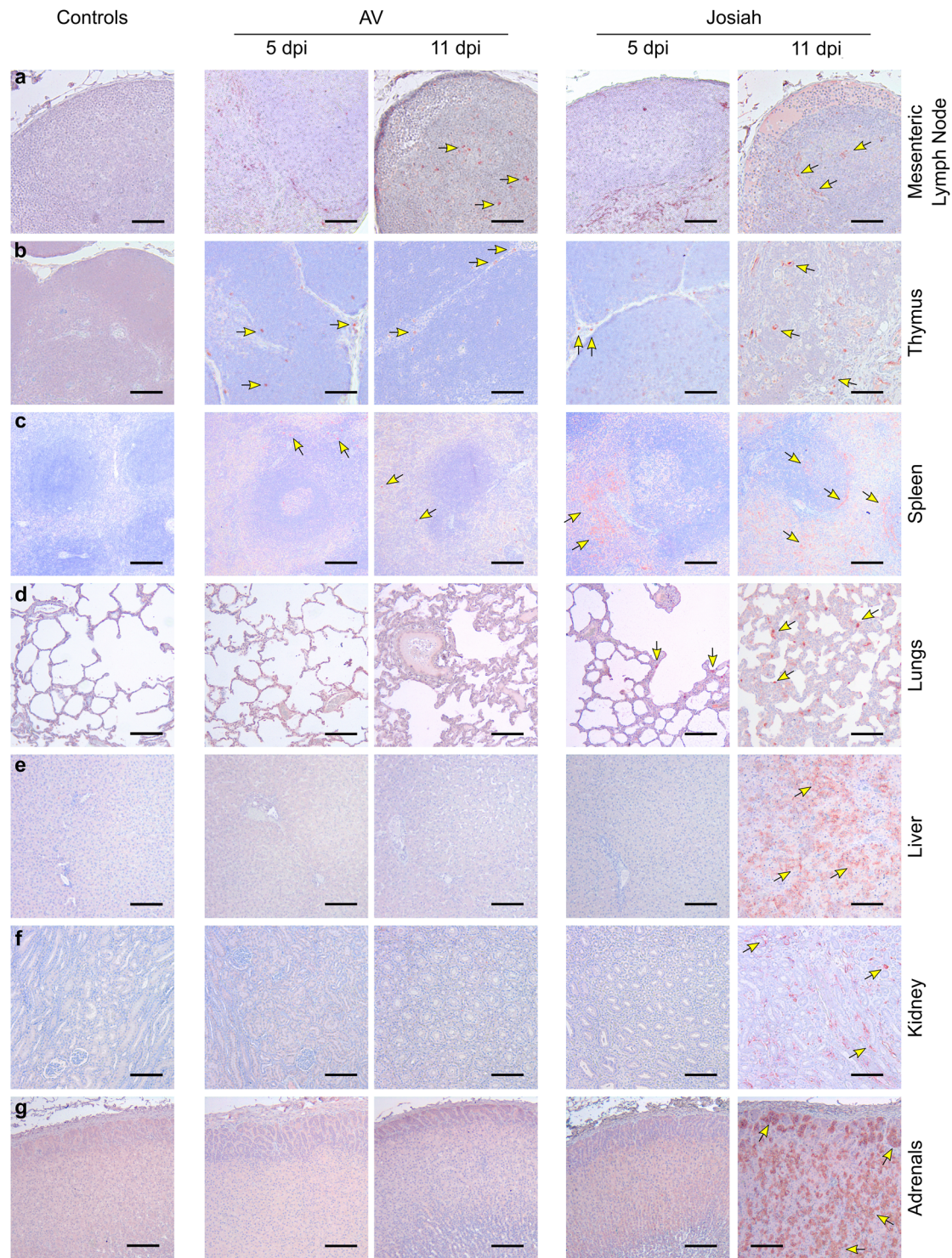
**Histopathological features of Lassa fever.** The earliest pathological events were mostly detectable at 5 DPI in the SLOs and lungs of infected NHPs. In the LNs, AV-, and Josiah-infected animals exhibited an alteration of the cortex architecture, characterized by disorganization or hyperplasia of the lymphoid follicles (Fig. S2a middle and right panel). At 11 DPI, the loss of follicle architecture was still observable in AV- and Josiah-infected animals, often with hyperplasia of macrophages, sometimes containing phagocytized apoptotic bodies (tingible-body macrophages; see insets). LASV was frequently observed 5 DPI in non-lymphocytic cells in all infected animals and was still observable in LNs 11 DPI (Fig. 2a). AV-infected cynomolgus monkeys also exhibited apoptotic lymphocytes in the thymus as soon as 5 DPI (Fig. S2b middle panel). There was also massive lymphocyte apoptosis 11 DPI in the thymus of Josiah-infected animals (Fig. S2b right panel). LASV was detected at 5 and 11 DPI in the thymus of all infected NHPs (Fig. 2b). In the spleen, amyloid protein was present in the center of lymphoid follicles of all Josiah-infected animals and in one AV-infected animal (Fig. S2d inset). There were numerous tingible-body macrophages in the Josiah-infected NHPs. Accordingly, LASV was observable in the spleen as soon as 5 DPI, and more frequently at 11 DPI, in both AV- and Josiah-infected animals (Fig. 2c). However, the distribution of LASV antigen was much more widespread in the Josiah-infected animals. We did not observe histopathological changes in the lungs of the AV-infected NHPs, either at 5 or 11 DPI, with the exception of one of three animals at each timepoint that presented minor foci of interstitial pneumonitis (Fig. S2c middle panel). This was more pronounced in the Josiah-infected animals, with infiltration of mononucleated cells, resulting in thickening of the alveolar walls prior to death at 11 DPI (Fig. S2c right panel). LASV was also present in the alveolar cells of Josiah-infected animals 5 and particularly 11 DPI (Fig. 2d). Although we detected minor evidences of inflammation in the liver of AV-infected NHPs, the Josiah-infected animals showed portal to more extensive hepatitis (with apoptosis of hepatocytes for one out of three animals) (Fig. S2e). These observations are in accordance with the strong widespread LASV immunopositive staining throughout the hepatic parenchyma and observed only in Josiah-infected NHPs (Fig. 2e). We observed similar inflammation patterns in the kidneys in the vicinity of arteries from the cortico-medullary junction in Josiah- but not AV-infected animals (Fig. S2f). Accordingly, LASV was detectable in cells from the cortico-medullary junction in Josiah- but not AV-infected NHPs (Fig. 2f). We detected foci of LASV-positive adrenal cortical cells in the zona glomerulosa and zona fasciculata of all Josiah- but not AV-infected animals (Fig. 2g). Although probably nonspecific, the cerebral cortex of all infected animals showed edema. However, at 11 DPI, we detected perivascular cuffing and microglial activation, i.e., signs of cerebral inflammation encountered in severe forms of the disease, in the brain of Josiah-infected CMs (Fig. S2g). Histopathological features were also present during recovery 28 DPI in some AV-infected animals. We indeed detected inflammatory infiltrates centered on (i) hepatic portal tracts (Fig. S2h), (ii) renal cortico-medullary junction and medulla (Fig. S2i), (iii) myocardial arteries (Fig. S2j) and (iv) 2 cerebral blood vessels (perivascular cuffing, Fig. S2k).

**Biochemical analytes and soluble mediators during Lassa fever.** There was a slight but significant increase in the concentration of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in survivors at 10 DPI, which returned to basal values 21

DPI. AST and ALT levels increased earlier and were much higher until death in Josiah-infected cynomolgus monkeys (Fig. 3a). High concentrations of lactate dehydrogenase (LDH) were present in the plasma of the animals that died from day 6, increasing steadily until death. In contrast, the increase in LDH levels occurred later and was moderate in survivors. The level of albumin (ALB) dropped in both groups, with the minimum values at the peak of the disease in the survivors. Creatinine and urea levels increased substantially in Josiah-infected NHPs. We observed low levels of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in the plasma at the terminal stages of the animals that died.

We then have set out the profiles of circulating soluble mediators in infected animals. Concerning pro-inflammatory cytokines, plasma levels of IL-6, TNF $\alpha$ , and IL12/23 started rising from 6 to 8 DPI and continued rising until death at 12 DPI in Josiah- but not AV-infected animals (Fig. 3b). There was a transient release of IFN $\alpha$ , peaking at 6 DPI, for all infected animals. IL-15 levels increased in animals starting from 2 DPI and continued to rise until death for the Josiah-infected NHPs, whereas they returned to basal values 15 DPI for the AV-infected animals. The levels of anti-inflammatory cytokines IL-1RA and IL-10 increased dramatically from 6 DPI to death in the Josiah-infected animals, whereas there was only a moderate increase in AV-infected NHPs from 6 to 15 or 28 DPI for IL-1RA and IL-10, respectively (Fig. 3c). Monocyte chemoattractant protein (MCP) 1 and macrophage inflammatory protein (MIP) 1 $\beta$  concentrations slightly and transiently increased in AV-infected animals, whereas high and increasing levels were measured in the terminal stages for the Josiah-infected animals (Fig. 3d). IL-8 was transiently secreted at 1 DPI in the Josiah-infected NHPs, whereas its release was delayed and more sustained in the AV-infected animals. We finally assessed different soluble mediators involved in cytotoxic activities and regulation of the immune response. We detected elevated levels of soluble (s) CD137 and perforin, peaking at 12 DPI in all animals before returning to basal values at ~18 DPI in the AV-infected animals (Fig. 3e). In contrast, a transient increase in granzyme B (GrzB) levels occurred solely in the AV-infected NHPs between 9 and 15 DPI. We detected a moderate and transient peak of soluble CD40L 1 DPI in the Josiah-infected animals, whereas it occurred later, at 6 DPI, in the AV-infected NHPs. A transient release of IFN $\gamma$ , peaking at 8 DPI, occurred in all infected animals, whereas the level of IL-2 increased significantly in only the Josiah-infected monkeys, until death. Finally, there was a peak in IL-5 secretion between 8 and 15 DPI only in the AV-infected NHPs.

**Innate immune responses during Lassa fever.** The number of leukocytes tended to transiently drop ~1 week after infection in all animals, but this change was not significant (Fig. 4a). The Josiah-infected NHPs showed an increase in the number of circulating granulocytes in the last days before death. Although the granulocytes were all CD10 $^+$  neutrophils in the first DPI in all animals, the percentage of CD10 $^-$  granulocytes steadily increased until death after Josiah infection. In the AV-infected animals, there was only a moderate and transient increase in the proportion of this cell population. The number of circulating myeloid dendritic cells (mDCs) did not change significantly during the course of the disease, except for a non-significant increase 10 and 11 DPI in AV-infected animals. No data were obtained after 11 DPI. After Josiah infection, a transient increase in monocyte count was observed 3 DPI, was followed by a drop 1 week after infection, and finally rose again in the last days before death. In AV-infected animals, the number of monocytes was elevated from 15 DPI. An activated phenotype was rapidly observed in monocytes in LASV-infected animals, with expression of CD80,

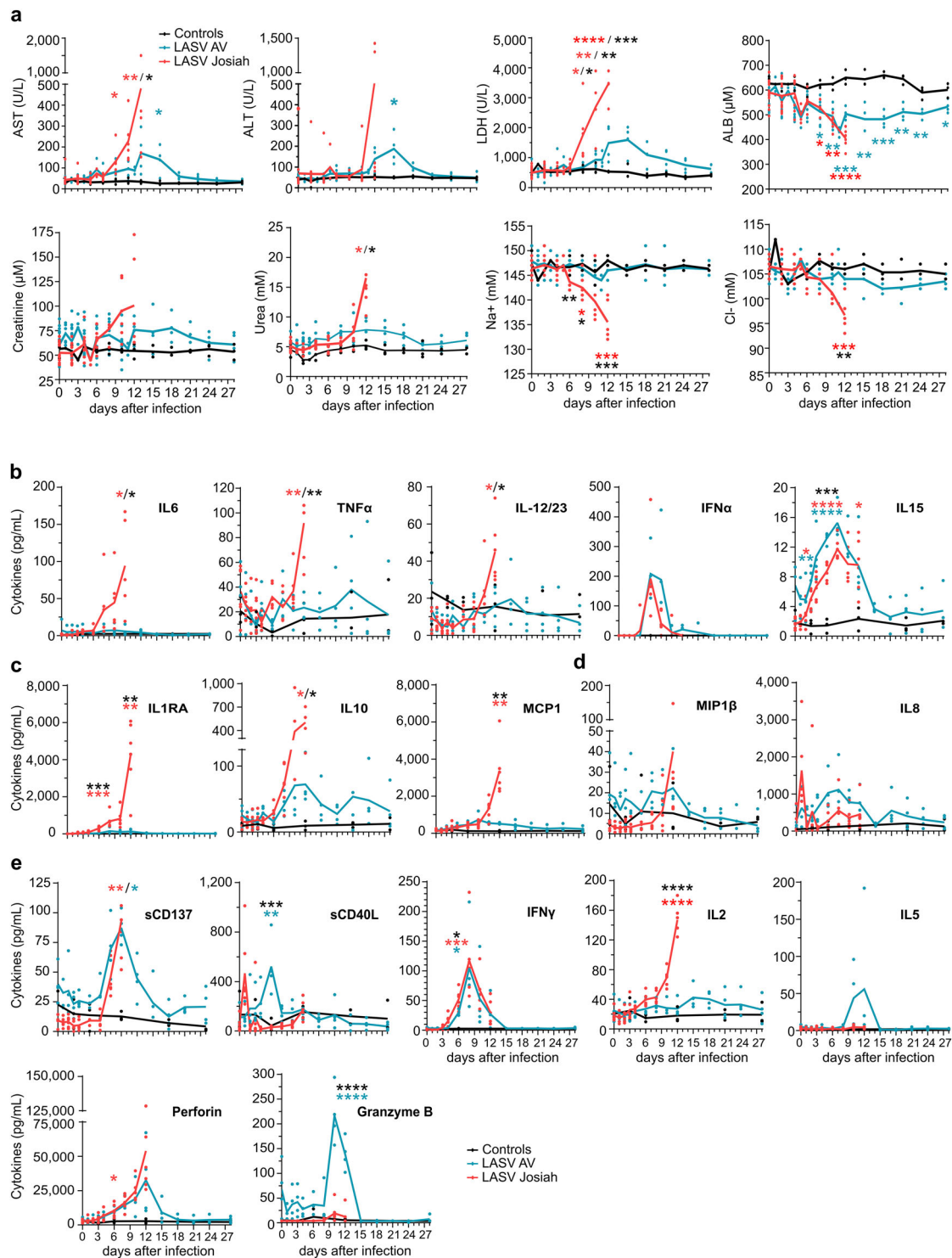


**Fig. 2** Examples of LASV spreading as a function of the severity of the disease. Immunohistochemistry of LASV-GP (red) during the course of the disease in **a** MLNs, **b** thymus, **c** spleen, **d** lungs, **e** liver, **f** kidneys, and **g** adrenal glands. **a, b** Scale bars: 100  $\mu$ m. **c-g** Scale bars: 200  $\mu$ m. Key immunohistological features are indicated by arrows.

CD86, and CD40. The percentage of CD80<sup>+</sup> and CD40<sup>+</sup> monocytes was significantly more elevated after Josiah infection, particularly in the terminal stages. NK cell count also transiently dropped about one week after infection in all animals (Fig. 4b). An increasing percentage of NK cells proliferated at the same time in all infected animals, as demonstrated by the expression of KI67. A moderate but significant amount of NK cells expressed CD107a at their surface 6 DPI in infected animals, suggesting a

cytotoxic activity. Finally, the proportion of NKp80-expressing NK cells dramatically dropped during the 2 weeks following infection whatever the LASV strain was, whereas expression of NKG2D was not significantly modified. The percentage of KI67<sup>+</sup> NK cells was increased in spleen and MLN 11 DPI in LASV-infected NHPs, and as soon as 5 DPI in the spleen of Josiah-infected animals (Fig. 4c). A moderate but non-significant increase in GrzB<sup>+</sup> and CD107a<sup>+</sup> NK cells was measured in the

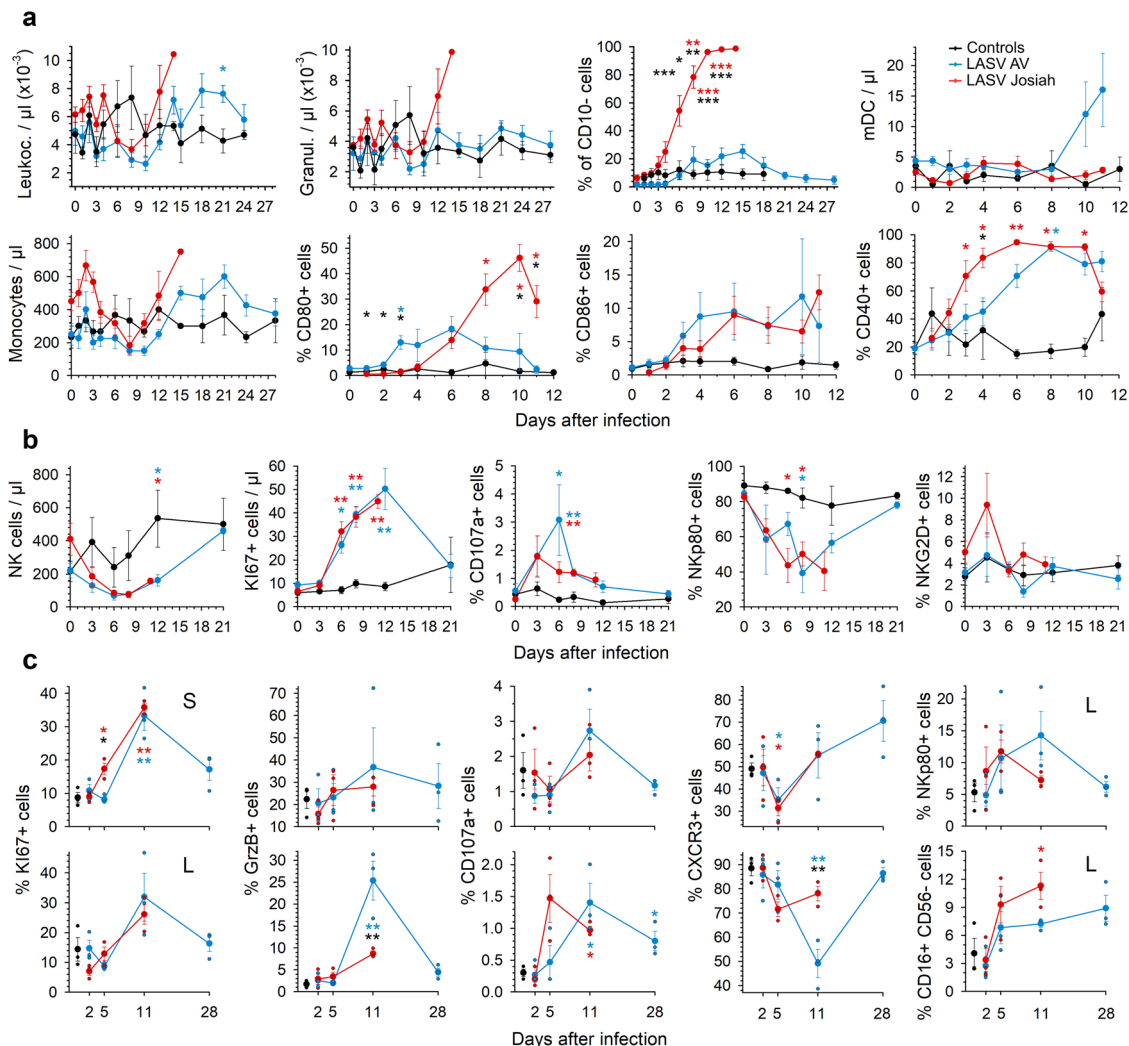




**Fig. 3 Biochemical and inflammatory responses monitoring after LASV challenge.** **a** Analysis of biological parameters during LASV infection. The data from longitudinally followed and sequentially killed animals at 2, 5, and 11 DPI were collected: controls ( $n = 3$  animals), LASV-AV ( $n = 10$ ), LASV-Josiah ( $n = 12$ ). The individual data at the time before the death of all longitudinally followed LASV-Josiah-infected primates were collected to calculate the mean determined at 12 DPI. Results show the mean (curve) and individual data points for each group. Statistical analyses were performed and are presented as in Fig. 1. Quantification of pro-inflammatory cytokines **b**, anti-inflammatory cytokines **c**, chemokines **d**, and T-cell response-related mediators **e** in plasma according to the time after LASV infection. **b–e** Results show the mean (curve) and individual data points for each group: controls ( $n = 3$ ), LASV-AV ( $n = 4$ ), LASV-Josiah ( $n = 6$ ). Statistical analyses were performed and are presented as in Fig. 1.

spleen of LASV-infected animals. A significantly higher proportion of GrzB<sup>+</sup> NK cells was observed in AV-infected NHP MLNs. The percentage of CD107a-expressing NK cells slightly increased from 5 DPI and at 11 DPI in MLN of Josiah- and AV-infected

animals, respectively. The proportion of CXCR3<sup>+</sup> NK cells transiently dropped 5 DPI in LASV-infected NHP spleen. In MLN, CXCR3<sup>+</sup> NK cell percentage decreased moderately by day 5 in Josiah-infected animals and dramatically 11 DPI in AV

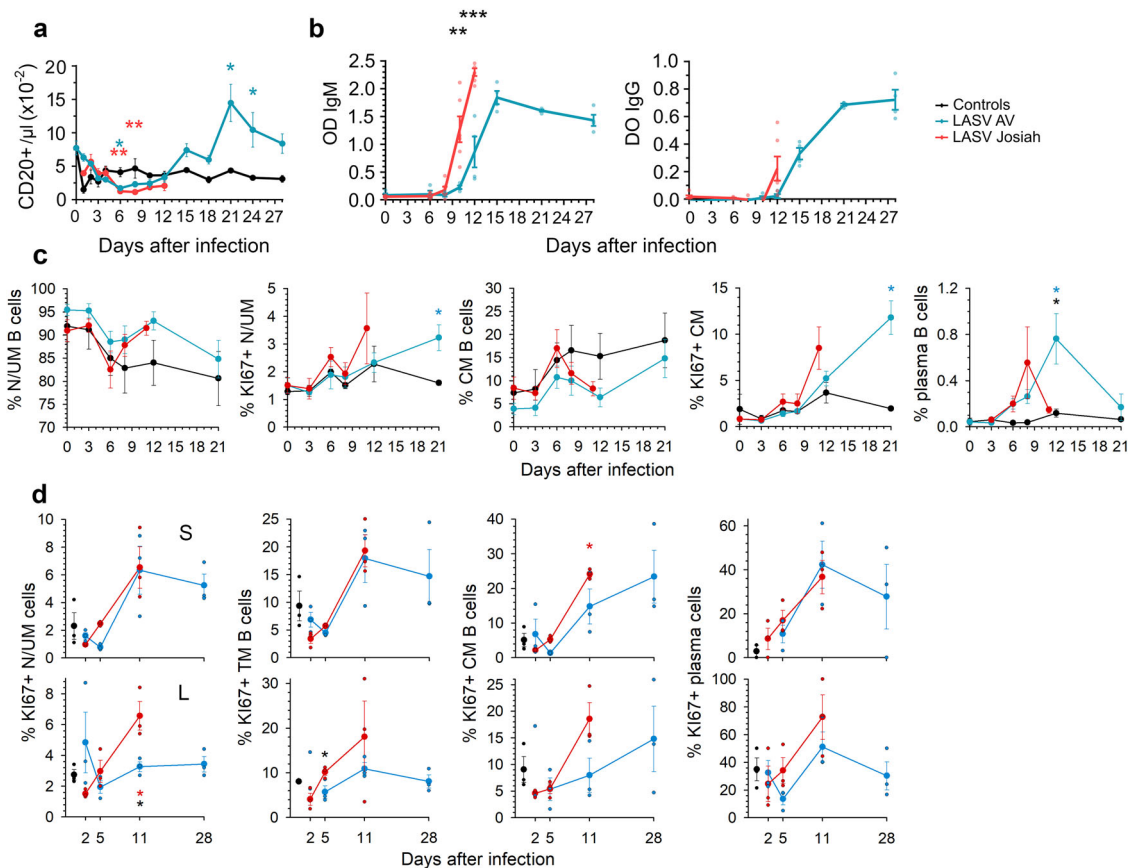


**Fig. 4 Analysis of circulating innate immune cells after LASV challenge.** **a** The number of leukocytes, granulocytes, mDC (HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD1c<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup>), and monocytes (HLA-DR<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>) in the blood is presented according to the time after LASV infection. The percentage of CD10<sup>-</sup> cells among granulocytes is also presented. The percentage of monocytes expressing CD80, CD86, or CD40 is shown. Results show the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for each group: controls ( $n = 3$ ), LASV-Josiah ( $n = 6$ , except for day 14 where  $n = 2$ ) and AV-infected animals ( $n = 4$ ) were analyzed for leukocyte, granulocyte, CD10<sup>-</sup>, and monocyte numbers. For mDC, CD80, CD86, and CD40 analysis, six AV-infected animals were analyzed from day 0 to 6 and three of them from day 8 to 11. **b** The number of circulating NK cells (CD8<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> cells) is presented, as well as the percentage of KI67<sup>+</sup>, CD107a<sup>+</sup>, NKp80<sup>+</sup>, and NKG2D<sup>+</sup> cells among NK cells ( $n = 3$  for controls,  $n = 6$  for LASV-Josiah, and  $n = 4$  for AV-infected animals). Statistical analyses were performed and are presented as in Fig. 1. Individual values can be found in Supplementary data 1 for a and b. **c** The proportion of NK cells (CD8<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup>) expressing KI67, (granzyme B) GrzB, CD107a, CXCR3, and NKp80 was quantified in spleen (S, upper graphs) and MLN (L, lower graphs) of controls ( $n = 3$ ), AV- ( $n = 3$ ), and Josiah-infected ( $n = 3$ ) animals, as well as the percentage of CD16<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> cells among NK cells. Individual values and mean  $\pm$  SEM are expressed for each group. Statistical analyses were performed and are presented as in Fig. 1.

animals. A transient increase of NKp80<sup>+</sup> NK cells was observed 5 DPI in Josiah-infected NHPs and from 5 to 11 DPI after AV infection. However, this cell population was significantly decreased compared to control animals from 11 DPI. Finally, we observed an enrichment in CD16<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> NK cells from 5 DPI, particularly in Josiah-infected animals.

**Adaptive immune response during Lassa fever.** There was a modest and transient drop in the number of B lymphocytes in both Josiah- and AV-infected NHPs ~6–8 DPI, followed by a significant increase in B-cell number from 2 weeks after infection in AV animals. There was a large increase in both LASV-specific IgM and IgG titers 8 DPI in the Josiah-infected animals, which occurred ~12 DPI in the AV-infected NHPs, with significantly higher titers 12 DPI in the Josiah-infected animals (Fig. 5b). We did not detect

neutralizing antibodies during the course of the disease, with the exception of low titers (1:20) in two of four survivors 28 DPI. There was a drop in the percentage of circulating naive/unconventional memory (N/UM) B cells (CD20<sup>+</sup> CD38<sub>mid</sub> CD27<sup>-</sup> CD10<sup>-</sup>) ~1 week after infection, but similar changes were observed in control animals (Fig. 5c). An inverse pattern was observed for conventional memory (CM) B cells (CD20<sup>+</sup> CD38<sub>mid</sub> CD27<sup>+</sup> CD10<sup>-</sup>) in animals. An increase in the percentage of proliferating (KI67<sup>+</sup>) N/UM and CM B cells was observed 11 and 21 DPI in Josiah- (non-significant) and AV-infected NHPs, respectively. Finally, a transient increase in the proportion of plasma cells (CD20<sub>low</sub> CD38<sub>bright</sub> CD27<sup>+</sup>) among B cells was observed 8 and 12 DPI in Josiah- and AV-infected NHPs, respectively. In SLO, whereas the percentage of B-cell subpopulations did not change significantly, an increase of the proportion of proliferating U/UM, transitory memory (CD20<sup>+</sup> CD38<sub>mid</sub> CD10<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>), CM, and



**Fig. 5 Analysis of B-cell responses after LASV challenge.** **a** The number of B cells (CD20<sup>+</sup>) in the blood is presented according to the time after LASV infection. Results show the mean  $\pm$  SEM of control ( $n = 3$ ), AV ( $n = 4$ ), and Josiah ( $n = 6$ ) animals. **b** Detection of LASV-specific IgM and IgG in animals after LASV infection by ELISA. Individual data (points) and mean values  $\pm$  SEM for each cohort (curves) are presented. LASV-AV ( $n = 4$ ), LASV-Josiah ( $n = 6$ ).  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ , as determined by a Student's *t* test. The percentage of naive/unconventional memory (N/UM) B cells (CD20<sup>+</sup> CD38<sub>mid</sub> CD27<sup>-</sup> CD10<sup>-</sup>), of conventional memory (CM) B cells (CD20<sup>+</sup> CD38<sub>mid</sub> CD27<sup>+</sup> CD10<sup>-</sup>), and of plasma B cells (CD20<sub>low</sub> CD38<sub>bright</sub> CD27<sup>+</sup>) among B cells (CD20<sup>+</sup>) is presented, as well as the percentage of Ki67<sup>+</sup> cells among N/UM and CM B cells is presented for blood **c** and spleen (S, upper graphs) and MLN (L, lower graphs). Individual values can be found in Supplementary data 1 for a, b and c. **d** The percentage of Ki67<sup>+</sup> among transitional memory (TM) B cells (CD20<sup>+</sup> CD38<sub>mid</sub> CD10<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>) is also presented for SLOs. Results show the mean  $\pm$ SEM of control ( $n = 3$ ), AV ( $n = 4$  for PBMC and three for SLOs), and Josiah ( $n = 6$  and three for SLOs) animals, as well as individual values. Statistical analyses were performed and are presented as in Fig. 1.

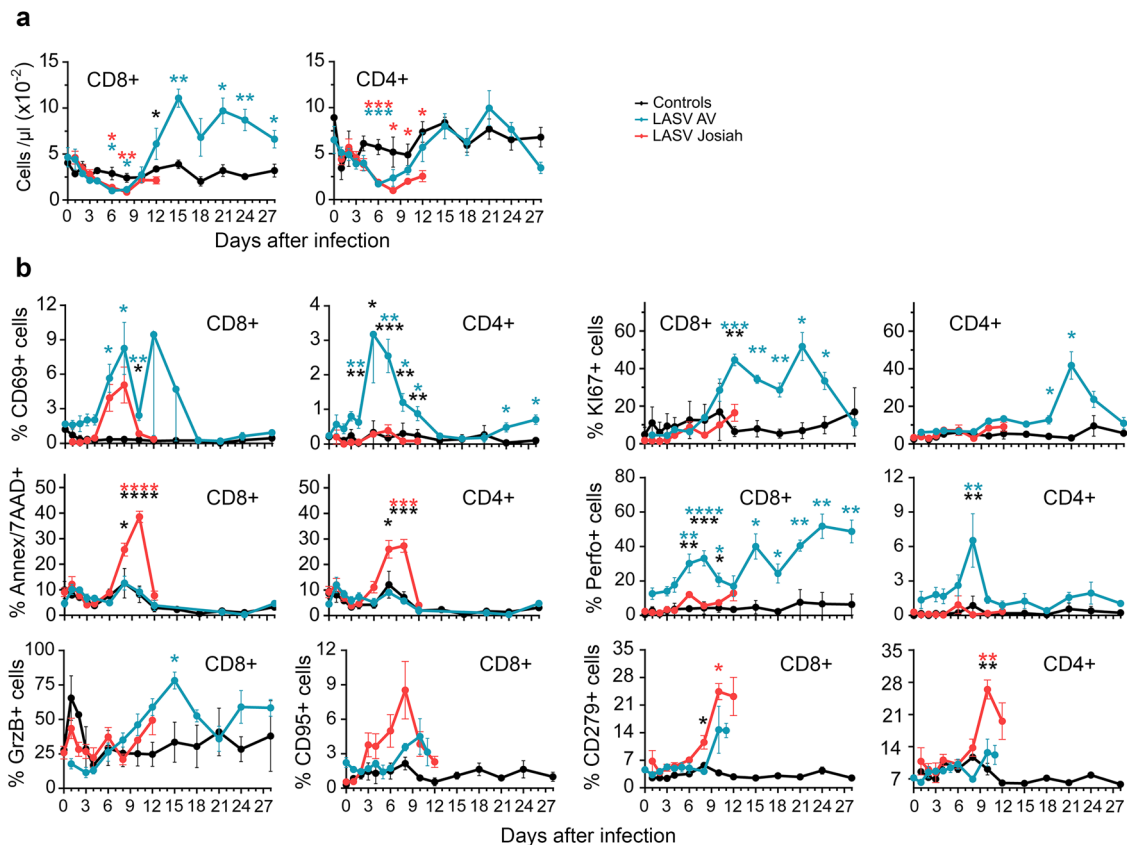
plasma B cells was observed by 11 DPI in spleen and MLN of infected NHPs, except for N/UM B cells in MLN of AV-infected animals (Fig. 5c). Moreover, similar changes were observed in the spleen in all infected NHPs whereas B-cell proliferation was more intense in Josiah-infected animals.

A transient lymphopenia affecting CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells of all infected NHPs was observed from 3 to 10 DPI (Fig. 6a). Lymphocytosis of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells then occurred only for AV-infected NHPs, starting at 12 DPI. The percentage of CD69-expressing CD8<sup>+</sup> cells transiently increased after 4 DPI in all infected NHPs, whereas such an increase in CD4<sup>+</sup> T cells occurred between 4 and 15 DPI solely in the AV-infected animals (Fig. 6b). The percentage of Ki67<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells increased by 8 DPI in the AV- but not Josiah-infected animals and remained high during the course of the disease. CD4<sup>+</sup> T cells showed a similar pattern, with a transient increase in the proportion of proliferative cells in the AV-infected animals from 18 to 28 DPI. The percentage of apoptotic (Annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T and CD4<sup>+</sup> T cells increased significantly between 6 and 12 DPI after Josiah infection, but not with AV. There was also an increase in the proportion of GrzB<sup>-</sup> and perforin-expressing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, starting at 6 DPI, in the AV-infected animals, whereas perforin expression of CD4<sup>+</sup> T cells from AV-infected NHPs transiently increased 8 DPI. Although non-significant, the

proportion of CD8<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup> cells tended to increase more and more rapidly in the Josiah- than AV-infected NHPs. Finally, only Josiah-infected NHPs exhibited a significant increase in the proportion of CD8<sup>+</sup> CD279<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD279<sup>+</sup> T cells between 6 and 10 DPI.

We assessed CD45RA, CD27, and CD28 levels to investigate the phenotypes of circulating effector/memory T cells induced during Lassa fever (Fig. S3a). The various CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell subpopulations did not change during the experiment in the control animals. There was an enrichment in naive/pre-effector (pE) 1 CD45RA<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (RA<sup>+</sup>28<sup>+</sup>27<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells in AV-infected NHPs for all timepoints relative to the control animals, as well as a transient increase in the proportion of effector-memory (EM) 4 (RA<sup>-</sup>28<sup>+</sup>27<sup>-</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells. The proportion of EM4 and terminally differentiated effector-memory (EMRA) (RA<sup>+</sup>28<sup>-</sup>27<sup>-</sup>) CD8<sup>+</sup> T cells increased between 4 and 8 DPI in the Josiah-infected NHPs. In AV-infected animals, the proportion of pE2 (RA<sup>+</sup>28<sup>-</sup>27<sup>+</sup>), EM2 (RA<sup>-</sup>28<sup>-</sup>27<sup>+</sup>), EM3 (RA<sup>-</sup>28<sup>-</sup>27<sup>-</sup>), and EMRA CD4<sup>+</sup> T cells increased from 6 DPI. The Josiah-infected NHPs showed a transient increase in the proportion of EM4 and EMRA CD4<sup>+</sup> T cells from 4 and 6 DPI, respectively.

We assessed the phenotype of T cells in the MLNs and spleens 2, 5, and 11 DPI (Fig. 7). The percentage of Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> and



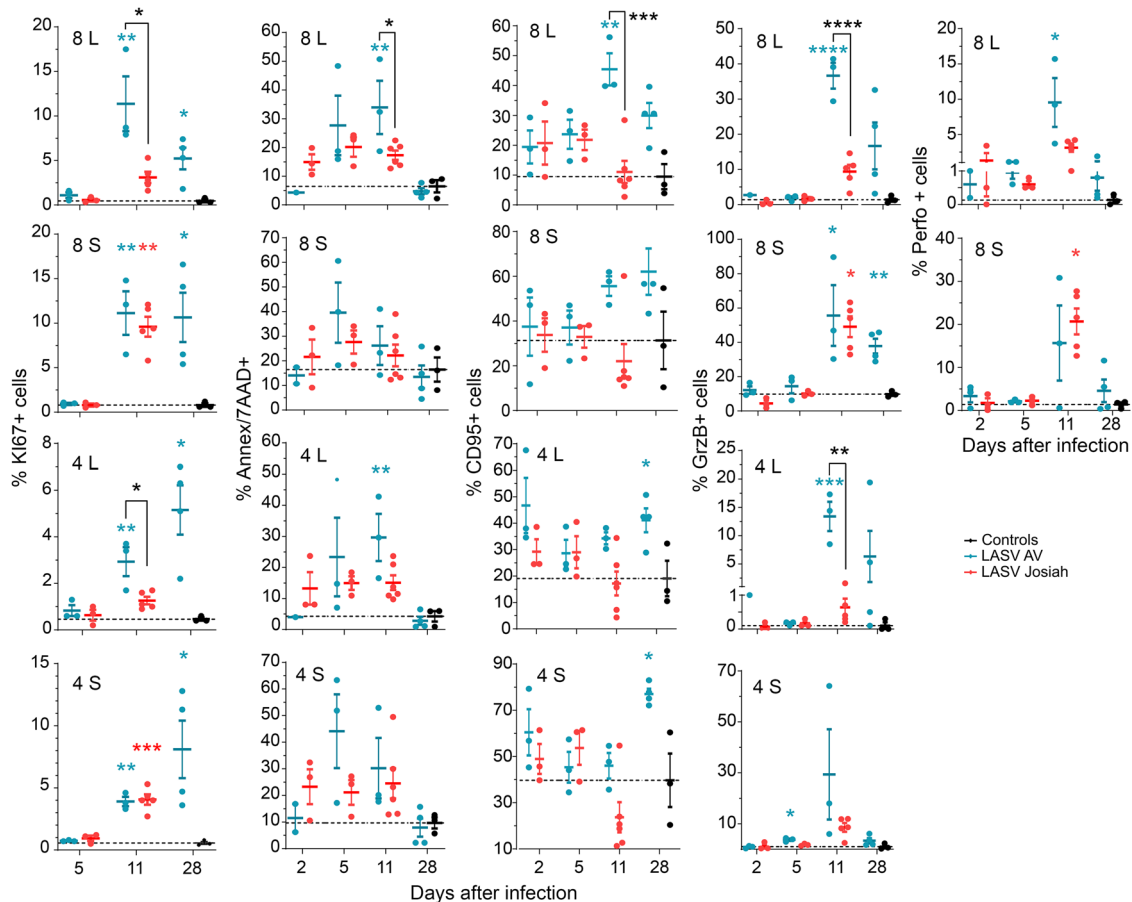
**Fig. 6 Analysis of T-cell responses in PBMC after LASV challenge.** **a** The number of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells in the blood is presented according to the time after LASV infection. **b** The percentage of circulating CD8<sup>+</sup> (left) and CD4<sup>+</sup> (right) T cells expressing CD69, KI67, Annexin V and 7AAD (Ann/7AAD), perforin (Perfo), GrzB, CD95, or CD279 is shown according to the time after LASV infection. Results show the mean  $\pm$  SEM of control ( $n = 3$ ), AV ( $n = 4$ ), and Josiah ( $n = 6$ ) animals. Statistical analyses were performed and are presented as in Fig. 1. Individual values can be found in Supplementary data 1.

CD4<sup>+</sup> T cells was significantly higher in the MLNs of AV-infected animals 11 and 28 DPI than those of mock- or Josiah-infected NHPs. In the spleen, the proportion of KI67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells was significantly higher in all infected animals than in the control group from 11 DPI. The proportion of apoptotic CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells was significantly higher in the MLNs of AV- than Josiah-infected NHPs 11 DPI. We observed an increase in the proportion of CD95<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells at 11 and 28 DPI in the LNs and spleens of AV-infected animals. We also observed an increase in the proportion of CD95<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells of AV-infected NHPs at 28 DPI. We detected a high percentage of GrzB<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the spleens of all infected animals 11 DPI, while the percentage in MLNs was significantly higher in AV-infected animals. Such an observation was also made for GrzB<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in spleens and lymph nodes of all infected NHPs at this timepoint. Finally, we observed an increase in the percentage of perforin<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the MLNs and spleens of all infected primates 11 DPI, but this raise was more important in MLNs of AV animals.

In control animals, the naive/pE1, central memory (CM)/EM1 (RA<sup>-</sup>28<sup>+</sup>27<sup>+</sup>) and EM4 CD8<sup>+</sup> T cells were the most highly represented in the spleen, MLNs, and ILNs (Fig. S3b). In AV-infected animals, there was a higher proportion of naive/pE1 and CM/EM1 T cells that further increased 11 DPI in the spleen. There were no significant differences in the CD8<sup>+</sup> T-cell phenotypes in the ILNs or MLNs between the AV- and mock-infected animals. In Josiah-infected monkeys, there was a higher proportion of EM1, EM3, EM4, and EMRA CD8<sup>+</sup> T cells 11 DPI in the ILNs and MLNs than 5 DPI, which was not the case for

AV-infected animals. Concerning the CD4<sup>+</sup> T-cell repertory, the proportion of EMRA cells in the spleen was higher 5 DPI for AV-infected animals and 11 DPI for Josiah-infected macaques than in that of control animals. EM1, EM4, and EMRA CD4<sup>+</sup> T cells only increased in the ILNs of Josiah-infected monkeys.

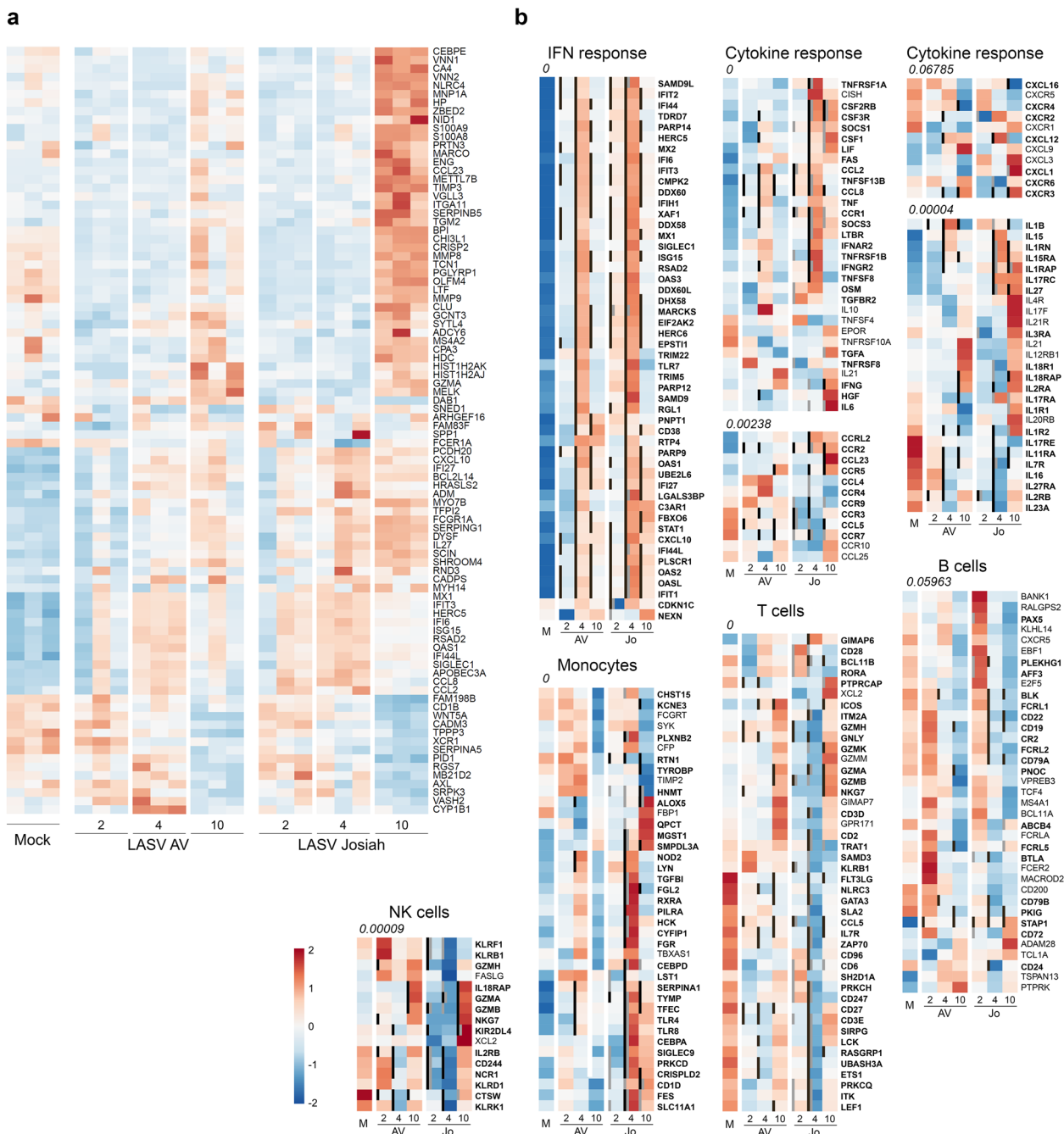
**Transcriptomic changes during Lassa fever.** We analyzed the transcriptomic profiles according to infection and outcome by RNA sequencing of PBMC samples (Fig. 8). We performed pairwise comparisons to identify differentially expressed (DE) genes between mock samples and AV- and Josiah-infected NHP samples (Fig. 8a and S4). Overall, LASV infection led to significant changes in transcriptomic profiles as early as 2 DPI. These changes in expression were more marked at 4 DPI and maximal at 10 DPI. Among the 100 most DE genes were inflammation/innate immunity-related genes (*NLRC4*, *MNP1A*, *ZBED2*, *PRTN3*, *S100A8/9*, *MARCO*, *CCL23*, *CPA3*, *VGLL3*, *CHI3L1*, *PGLYRP1*, *LTF*, *RSAD2*, *CD1B*, *GRZMA*, *CXCL10*, *IFI6/27/44 L*, *IL27*, *MX1*, *IFIT3*, *ISG15*, *OAS1*, *SIGLEC1*, *APOBEC3A*, *CCL2/8*, and *XCR1*) that were upregulated, particularly in Josiah-infected animals during the terminal stages. Genes involved in extracellular matrix and cell-adhesion were also modulated, particularly during fatal Lassa fever (*NID1*, *TIMP3*, *ITGA11*, *TGM2*, *MMP8/9*, *OLFM4*, *PCDH20*, and *CADM3*), as well as some others involved in coagulation (*SERPIN*, *TFPI2*) and apoptosis (*CLU*, *BCL2L14*). The transcriptomic profiles were also highly different between the AV and Josiah infections from 2 to 10 DPI (Fig. S5). We characterized the activation of innate immunity, the cytokine response, and monocyte, T-cell, B-cell,



**Fig. 7 Analysis of T-cell responses in SLO.** The percentage of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells in MLNs (L) and spleen (S) expressing Ki67, Annexin V and 7AAD (Ann/7AAD), CD95, GrzB, or perforin (Perfo) is presented in control (black dots), AV-infected (blue dots), and Josiah-infected (red dots) animals. Results show the individual data and the mean  $\pm$  SEM for each group ( $n = 3$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , as determined by a one-way ANOVA or a Kruskal-Wallis multiple comparisons test. Significant differences are presented as in Fig. 1.

and NK cell activation by analyzing the expression of genes representative of these pathways<sup>26–28</sup> (Fig. 8b). LASV infection induced an increase in the expression of IFN-response genes, from 2 to 10 DPI, which was maximal at day 4, when the synthesis of all IFN-response genes was upregulated. Josiah infection resulted in greater induction than AV infection. We observed similar changes for genes associated with the cytokine/chemokine response, with moderate overexpression peaking 4 DPI in AV-infected NHPs versus a dramatic increase in the synthesis of these genes 4 and 10 DPI after Josiah infection. The expression of genes related to monocyte activation was strongly upregulated after Josiah infection from 4 DPI. In contrast, the expression of T-cell activation related genes was downregulated in the same animals. B-cell-related genes were overexpressed 2 DPI and downregulated from 4 DPI in both AV- and Josiah-infected NHPs. Finally, NK cell signature was downregulated 2 and 4 DPI in Josiah-infected NHPs compared to AV and control animals. The transcription of some NK cell-related genes was induced 10 DPI in infected animals, but NK cell activation was more intense in Josiah animals compared with AV NHPs. We performed a similar analysis in the liver, spleen, and MLNs (Fig. 9). Unlike the PBMC analysis, we list only the DE genes for each pathway. IFN-response genes were upregulated in all organs after LASV infection from 2 DPI, but more intensely for Josiah-infected animals (Fig. 9a–c), except for MLNs at day 2 after AV infection (Fig. 9b). Although gene expression in the liver returned to basal levels 10 DPI in AV-infected NHPs, it remained high in the Josiah-infected animals (Fig. 9c). Certain genes related to the cytokine/

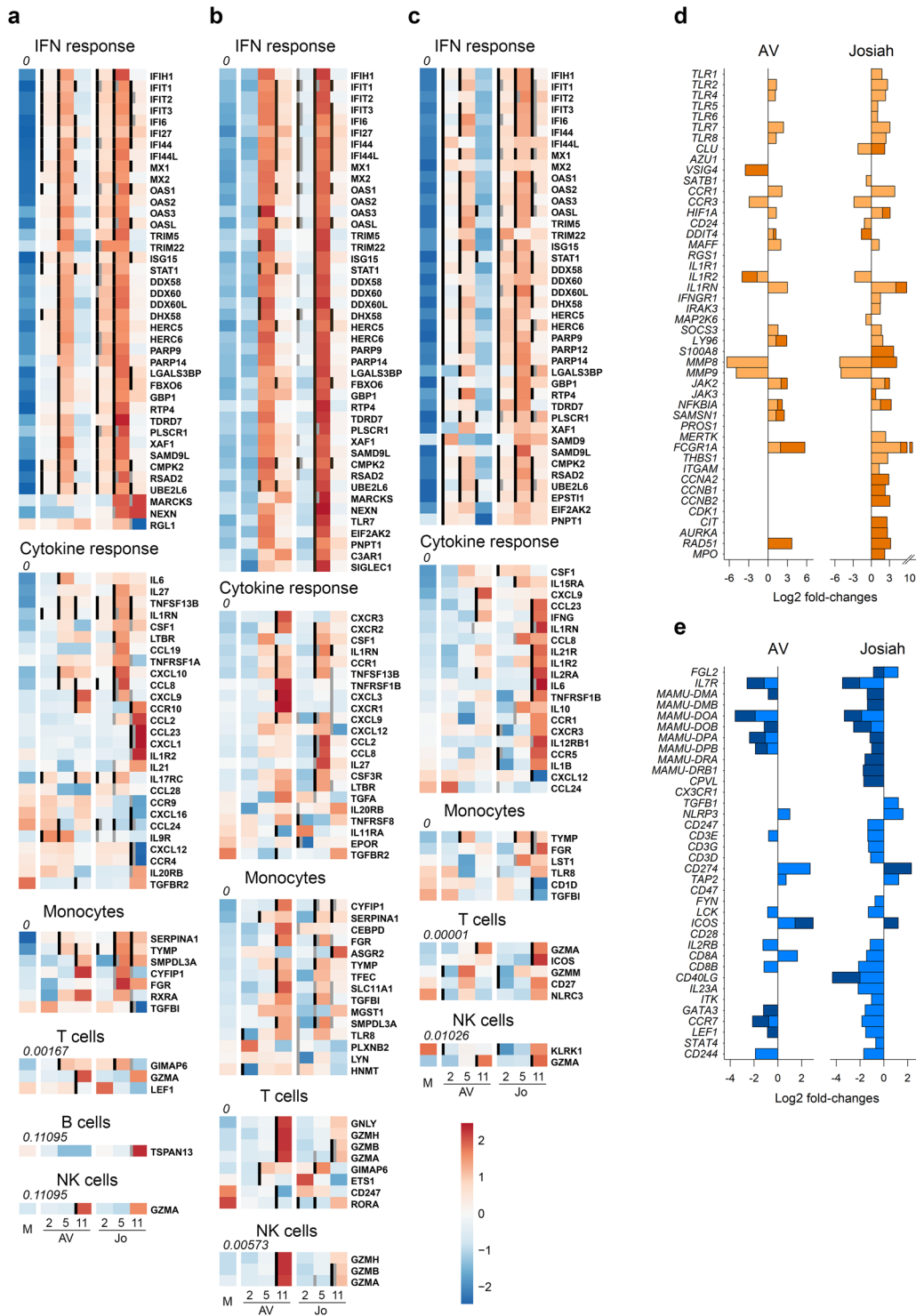
chemokine response were upregulated in spleen 4 and 10 days after LASV infection, but more particularly for Josiah (Fig. 9a). In MLNs, these genes were upregulated 4 and 10 DPI in Josiah- and AV-infected NHPs, respectively. In liver, the cytokine/chemokine response was only observed on day 10 in Josiah-infected NHPs. Monocyte-related genes were more strongly activated 4 and 10 DPI in Josiah-infected than mock- or AV-infected NHPs, whereas these genes were upregulated in both AV- and Josiah-infected animals in the MLNs. Finally, certain T-cell and/or NK cell genes related to cytotoxicity were upregulated in AV-infected animals 10 DPI in the MLNs, and to a lesser extent in spleen. Upregulation of some T/NK cell genes was also observed in the liver of Josiah-infected NHPs 10 DPI. These transcriptomic changes had major consequences on the activation of cellular pathways in both PBMC (Fig. S6) and organs (Fig. S7). An activation of type I/II IFN-response and cell cycle pathways was observed in PBMC and SLO of LASV-infected animals. In liver, a robust activation of type I/II IFN-response pathways was also observed after LASV infection. An intense downregulation of several metabolic pathways was observed in liver of Josiah-infected NHP, whereas only moderated changes were induced after AV infection. The cascade of pathophysiological events and the dysregulated inflammatory responses observed during Lassa fever are reminiscent of septic shock syndrome. We thus analyzed the expression of genes known to be DE during severe sepsis<sup>29–35</sup>. The pattern of upregulated (Fig. 9d) and downregulated (Fig. 9e) genes during severe sepsis was similar to that of DE genes of PBMCs obtained 4 and 10 DPI from Josiah-infected NHPs,



**Fig. 8 Analysis of transcriptomic data of PBMCs.** **a** Heatmap of the 100 most differentially expressed (DE) genes (absolute Log<sub>2</sub> fold-change larger than 5). Gene expression was standardized using VST transformation, hence centered and scaled to make the gene expression comparable. Each column corresponds to the mean gene expression of the three animals of each group for a given timepoint. **b** Heatmap of gene expression of six gene sets. Significant genes are highlighted with bold labels and corresponding significant comparisons are displayed by gray (significant difference between Josiah and AV for a given day) and black vertical bars (significant difference with the mock condition). Gene expression was standardized using VST transformation, centered and scaled to make the gene expression comparable, hence averaged by condition and timepoint. An enrichment test was performed, using a one-tailed Fisher test. *P* values were adjusted on multiple comparisons using Benjamini-Hochberg correction and were presented under the gene set name.

whereas this was not true during AV infection. Among the DE genes, we selected those with the most stable expression profiles during the course of the disease and those most correlated with LASV infection or outcome, i.e., the LASV strain, to identify the set of DE genes in PBMCs that could be used as markers of LASV infection or to predict the outcome of Lassa fever. We identified seven genes allowing discrimination between mock- and LASV-infected NHPs from 2 to 10 DPI with a high probability (Fig. 10a)

and six genes able to predict the onset of Lassa fever as soon as 2 DPI (Fig. 10b). We performed RNA sequencing of PBMCs obtained 1 DPI to determine whether specific transcriptomic signatures are already present in the earliest samples and confirmed this to be the case (Fig. 10c, top). Indeed, we identified several genes for which the expression correlated with infectious status, such as *NFE2*, *PTP4A3*, *KCN2G2*, and a substantial number of genes for which the expression is associated with Lassa fever



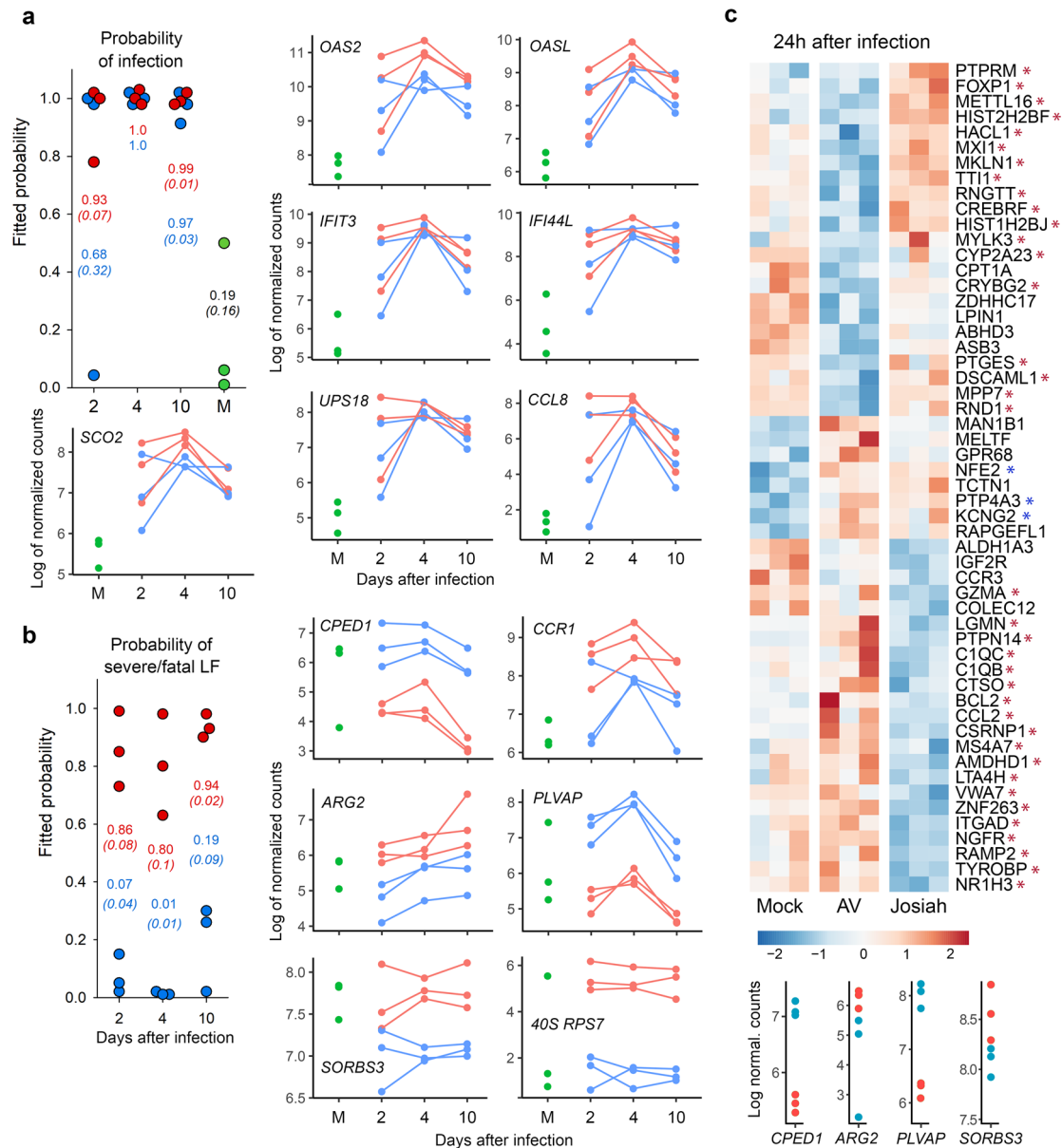
**Fig. 9 Analysis of transcriptomic data of organs and of genes related to sepsis in PBMCs.** Heatmap of gene expression of five gene sets in spleen **a** MLN, **b**, and liver **c** presented as in Fig. 8b, except that only the DE genes are listed. Gene expression was standardized using VST transformation, hence centered and scaled to make the gene expression comparable. Each column corresponds to the mean gene expression of the three animals of each group for a given timepoint. The Log2 fold-changes of genes found DE in this study and known to be upregulated **d** or downregulated **e** in PBMCs during severe sepsis were calculated between PBMCs of LASV-infected and mock animals and represented by light and dark colors for 4 and 10 DPI, respectively.

outcome. Among the set of genes defined in Fig. 10b, four appeared to already be predictive 1 DPI (Fig. 10c, bottom).

**Discussion**

The cascade of pathogenic mechanisms leading to systemic shock and death during Lassa fever, as well as the immune responses

involved in the control of LASV infection, are poorly understood. Here, we describe a model of fatal and nonfatal Lassa fever in the relevant NHP model based on infection by LASV strains isolated from fatal human cases belonging to clade 4 or 5<sup>9</sup>. The Josiah isolate is the reference LASV strain and is known to induce a highly uniform lethal infection in this model<sup>16,36,37</sup>. In contrast,



**Fig. 10 Identification of genes that can be used as early markers of infection and severity.** **a** Individual probabilities of infection status estimated by a random forest: each dot represents an estimation of the probability for an animal to be infected or not, at 2, 4, and 10 DPI and at 28 DPI for mock animals: the higher the probability, the greater the risk of an animal being infected. Josiah-infected animals are represented by red dots, AV-infected animals by blue dots, and mock-infected animals by green dots. The mean probability  $\pm$  SEM is represented in red for Josiah, blue for AV, and black for mock animals. Probabilities were computed by applying the random forest method to the gene expression of *OAS2*, *OASL*, *IFIT3*, *IFI44L*, *SCO2*, *USP18*, and *CCL8*. The kinetics of Log<sub>2</sub> normalized counts are also shown for each gene. **b** Individual probabilities to have a severe/fatal LASV infection were estimated and are represented as in **a**, except that mock animals were not included in this analysis. Probabilities were computed by applying the random forest method to the gene expression of *CPED1*, *CCR1*, *ARG2*, *PLVAP*, *SORBS3*, and *40S RPS7*. **c** Heatmaps of DE genes in PBMCs at 1 DPI. The genes that were statistically associated with infection status are indicated by a blue asterisk, whereas those associated with disease severity/lethal outcome are indicated by a red asterisk. Gene expression was standardized using VST transformation, hence centered and scaled to make the gene expression comparable. Each column displays gene expression of a given animal. The expression of *CPED1*, *ARG2*, *PLVAP*, and *SORBS3* 1 DPI in PBMCs of Josiah- and AV-infected NHPs is represented at the bottom by red and blue dots, respectively. The DE of the other genes selected in **a** and **b** was not significant at 1 DPI and are therefore not represented. Transcriptomic changes measured 1 DPI could not be compared with other samples as the sequencing of these mRNA was not performed together with the others.

we previously showed that NHPs can survive infection by the AV strain<sup>8</sup>. Consistently, Soromba-R LASV, another strain belonging to clade 5, presented a reduced pathogenicity in macaques<sup>17</sup>. In the current study, all AV-infected NHPs survived and experienced clinical signs ranging from almost asymptomatic infection to quite severe Lassa fever. The clinical and biological signs observed in NHPs are reminiscent of the disease induced in

humans, with tissue and hepatic damage, illustrated by elevated AST, ALT, and LDH levels<sup>10</sup>. Renal failure has been recently associated with a fatal outcome, with increasing concentrations of creatinin and urea in the terminal stages of Lassa fever<sup>10</sup>. Albumin levels decreased throughout Lassa fever in all infected animals and may be due to anorexia but may also have resulted from capillary leakage, abnormal fluid accumulation, liver failure, or



renal loss<sup>38</sup>. An electrolytic imbalance, illustrated by a drop in Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> concentrations, was also associated with a fatal outcome. In contrast, the clinical scores remained low during infection with the AV strain and only limited alterations of biological parameters were recorded, suggesting that LASV was rapidly controlled. The first cycles of LASV replication appear to occur locally, close to the site of infection. Indeed, infectious viral particles were present in the dermis two days after SC inoculation, and the amount detected suggests active replication instead of residual inoculum. Differences in viral replication and dissemination were already evident as soon as 2 DPI, with higher viral loads in Josiah-infected NHP skin and detection of low amounts of LASV RNA in the spleen and thymus. Whether the higher replication of Josiah compared with AV was owing to increased virulence or to different host responses remains unclear. These results demonstrate, for the first time, that local replication of LASV occurs before infection of SLO and confirm that these latter represent the first organs to be targeted by LASV. Primary lymphoid organs such as thymus and BM can also be early infected by LASV. Although viremia was detected from 3 DPI in all infected animals, striking differences in viral replication and dissemination were evident very early during the course of infection between the Josiah and AV strains. Indeed, viremia was higher in Josiah- than AV-infected NHPs. Moreover, we observed greater spreading as soon as 5 DPI, with higher viral loads in the organs, with infectious viral particles detected only in lymphoid organs in AV-infected animals, whereas other organs were affected in Josiah-infected NHPs. We observed a similar pattern 11 DPI, with very high LASV titers detected in all organs in Josiah-infected NHPs. Moreover, we previously observed elevated LASV titers in oral and nasal swabs 9 DPI, confirming that the respiratory tract is a site of intense viral replication<sup>37</sup>. In contrast, infectious LASV was found to be mainly restricted to the lymphoid organs in all AV-infected animals, with only significantly lower amounts found in a few other organs for some. These observations were histologically confirmed, with Josiah LASV antigens present in all organs as soon as 5 DPI and massively by 11 DPI, whereas AV antigens were found only in lymphoid organs 5 DPI. The adrenals, liver, lungs, and kidneys were the organs of intense Josiah LASV replication during the terminal stages, consistent with the multiorgan failure associated with hepatic and renal dysfunction and acute respiratory distress observed for fatal Lassa fever. These results show that LASV replication is rapidly controlled and its dissemination restricted to lymphoid organs in nonfatal LF. In contrast, the lack of control leads to relentless viral replication and systemic spreading in severe/fatal LASV. The tropism of LASV for BM could play a role in the transient lymphopenia observed in infected animals, but further investigations are needed to determine if this phenomenon results from hematopoiesis defects or from peripheral deletion<sup>39,40</sup>.

We explored the immune responses induced during Lassa fever to investigate the observed difference in viral control. Generation of memory and plasma B cells was observed in both blood and SLOs in LASV-infected NHPs, simultaneously with LASV-specific IgM and IgG, with earlier and more robust responses after Josiah infection. Genes related to the B-cell response were upregulated as soon as 2 DPI in infected animals, but the profiles were different between AV- and Josiah-infected NHPs. The expression of these genes was downregulated at 4 and 10 DPI. Together, with the lack of detection of neutralizing antibodies, these results confirm that no significant difference in the humoral responses was observed according to Lassa fever outcome and that these responses are not sufficient to control LASV infection, as previously reported<sup>8</sup>. In AV-infected animals, a robust CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell response, involving induction and proliferation

of cytotoxic T cells, was induced in blood and SLOs by the second week after infection. The transient release of sCD137, IFN $\gamma$ , IL-5, perforin, and GrzB in the plasma of AV-infected animals is also indicative of T-cell activation<sup>41,42</sup>, as was the activation of pathways related to antigen processing and presentation in the SLOs of AV-infected NHPs. Differentiation of memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells also occurred in these animals. Overall, these results are consistent with an important role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the control of LASV infection, as previously suggested<sup>8,43</sup>. Importantly, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells with a cytotoxic phenotype were strongly induced ~1 week after infection, suggesting that both types of T cells play a role in the lysis of infected cells<sup>44</sup>. The elevated amount of GrzB released is consistent with cytotoxic CD4<sup>+</sup> T-cell activation, as they appear to be more prone to secrete GrzB than CD8<sup>+</sup> T cells<sup>42</sup>. However, the quantification of cytokines produced by T cells after stimulation with LASV antigen-derived peptides would be necessary to analyze specific T-cell responses. Proliferating and cytotoxic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were present in the spleen of Josiah-infected NHPs 11 DPI, but not in the blood or MLNs. These discrepancies could result from the functional differences between the two SLOs. Indeed, blood-borne antigens directly enter the spleen, whereas APCs bring antigens to the LNs through the lymphatics and the elevated viremia present during Josiah infection may explain the activation of splenic T cells<sup>45</sup>. The release of IFN $\gamma$ , sCD137, and IL-2 suggests T-cell activation in these animals, although IL-2 could also come from DCs activated by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) such as viral RNA<sup>46</sup>. Changes in memory T-cell subpopulations were also observed in the blood and SLOs of Josiah-infected animals, but their overall T-cell responses appear to be defective. Indeed, high proportions of apoptotic and CD279<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and CD95<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were detected in the blood. These observations suggest that massive T-cell death and exhaustion were induced during Josiah infection<sup>47</sup>. Consistently, the induction of CD279<sup>+</sup> T cells has been associated with severe Ebola virus disease<sup>48</sup>. The transcriptomic results in PBMCs and SLOs are also consistent with adaptive T-cell responses of lower intensity in the Josiah-infected NHPs. Finally, pathways linked to mitosis and cell cycle were activated in SLOs of infected NHPs, but more intensively after AV infection, probably reflecting a more robust adaptive immunity in these animals.

NK cells are probably involved in the innate response against LASV, as suggested by their proliferation and acquisition of cytotoxic markers as well as their transcriptomic signatures in blood and SLOs of infected animals. The enrichment in CD16<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup>, NKp80<sup>+</sup>, GrzB<sup>+</sup>, and CD107a<sup>+</sup> cells in MLN and spleen for the latter is consistent with the induction of cytotoxic NK cells in SLOs<sup>49,50</sup>. The NKp80<sup>-</sup> NK cells that circulated in LASV-infected NHPs could result from relocalization of NKp80<sup>+</sup> cells into tissues or to downregulation of NKp80 expression after exposure to monokines<sup>51</sup>. The downregulation of CXCR3 expression in NK cells in SLOs is probably owing to ligand-induced internalization. Indeed, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 are the ligand for CXCR3 and attract NK cells into inflamed tissues<sup>52</sup>. The synthesis of CXCL9 and CXCL11 mRNA observed in blood and SLO of LASV-infected animals is consistent with this hypothesis. Finally, NK cells could be the source of the IFN $\gamma$  released in plasma in infected animals. Although further investigations are needed to understand the role played by NK cells, a similar response observed in both Josiah- and AV-infected animals argues against a primary role of NK cells in Lassa fever outcome.

A balanced and self-limiting inflammatory response was induced during AV LASV infection. IFN-response gene synthesis was only induced 4 to 5 DPI in the PBMCs and organs while

cytokine/chemokine and monocyte-associated genes were only moderately overexpressed. These observations were mirrored by the moderate and transient release of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines into the plasma. This balanced inflammatory response may have played an important role in the induction of efficient T-cell immunity, as these cytokines are known to serve as costimulatory signals for T-cell activation<sup>53</sup>. In sharp contrast to the response in AV-infected NHPs, an overwhelming, dysregulated, and potentially deleterious inflammatory response appeared to be induced during Josiah infection. The expression of IFN-response genes was upregulated as soon as 2 DPI in the PBMCs and organs up to death, and the levels were very high from 4 to 5 DPI. This transcriptomic response can be, at least within PBMCs, attributed to monocytes, given the intense overexpression of monocyte-related genes observed at the same time. Consistently, a large proportion of circulating monocytes was activated in the blood of Josiah-infected animals during the disease, whereas this was more balanced after AV infection. Similar results in the transcriptomic response of PBMC have been previously reported in a fatal model of Lassa fever in macaques after aerosol infection, with early induction of IFN-responsive genes and TLR signaling pathways<sup>54</sup>, and also in the Lassa fever-like model of intravenous LCMV infection of macaques<sup>20</sup>. Genes related to cytokine/chemokine responses were robustly expressed during Josiah infection in both PBMCs and organs. In the liver, these transcriptomic changes were maximal during the terminal stages, which is consistent with the liver alterations observed at the same time. The liver metabolism was highly suppressed during Josiah infection, probably contributing to liver failure and pathogenesis. The metabolic pathways were only moderately affected after AV infection, confirming that liver function was preserved during nonfatal Lassa fever. Very high concentrations of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines were also detected in the circulation, with levels steadily increasing until death. These mediators may be released by activated monocyte/macrophages, which would be consistent with the activated phenotype of circulating monocytes observed in Josiah-infected NHPs as well as the gene signature of activated macrophages in their SLOs. This unbalanced and excessive inflammatory response may be involved in the defective T-cell activation observed in the SLOs. Indeed, the homing and motility of T cells within the SLOs and their contact with APCs are dictated by the complex and well-regulated expression of homeostatic chemokines by stromal cells of the SLOs<sup>45,55–57</sup>. Dysregulated chemokine synthesis may have altered the traffic of naive T cells within the SLOs, preventing the induction of effective immunity. It has been previously shown that arenavirus tropism, including that of LASV, for fibroblastic reticular cells may have a deleterious effect on the architecture of the SLOs and consequently on the induction of the immune response<sup>58–60</sup>. Consistent with this finding, a loss in lymphoid follicle architecture was evident in LASV-infected NHPs. The large number of CD10<sup>−</sup> granulocytes, a phenotype characteristic of immature myeloid cells, that circulated in the final days before death in Josiah-infected NHPs may have also been involved in the defective T-cell response<sup>61</sup>. Indeed, these cells circulate during severe sepsis and cancer and are related to myeloid-derived suppressor cells. They may exhibit T-cell suppressive properties and their presence is associated with a poor prognosis in sepsis. Furthermore, infection of DCs has been observed within the SLOs of Josiah-infected NHPs 7 DPI<sup>16</sup>. As LASV-infected DCs fail to induce T-cell responses<sup>62,63</sup>, this tropism could also have a role in the lack of T-cell activation in Josiah-infected NHPs. Finally, the large proportion of apoptotic T cells within the PBMCs and SLOs probably also contributed to immunosuppression. However, further studies would be needed to decipher the mechanisms

involved in the defective T-cell immunity following Josiah LASV infection. Overall, the observations made during Josiah infection are reminiscent of septic shock syndrome. Indeed, the cytokine/chemokine storm, combining inflammatory and anti-inflammatory compounds, detected in the plasma at the late stage is similar to that associated with severe sepsis and septic shock<sup>64</sup>. Very high levels of IL-10 were released in the circulation of Josiah-infected animals. This mediator is probably not produced by PBMC, with regards to their low IL-10 mRNA levels, but rather in tissues/organs. Consistently, the synthesis of IL-10 mRNA was significantly increased as soon as 4 DPI in the liver of Josiah-infected monkeys. The massive production of mRNAs coding for these mediators was also detected in PBMCs and organs from 4 to 5 DPI until death and pathways related to TLR- and RIG-like receptors (RLR), Janus kinases, mitogen-activated protein kinases, signal transducers and activators of transcription (STAT), and NF- $\kappa$ B were activated as observed during severe sepsis<sup>65</sup>. Moreover, the most altered pathways in PBMC, SLOs, and liver were those related to type I and type I IFN responses, with dramatic activation in infected animals, and more particularly in Josiah-infected NHPs. These observations are consistent with the soluble mediators detected in plasma and with a septic-like syndrome. Most clinical and biological signs observed during Josiah infection also reflect those of severe sepsis: lymphopenia and T-cell apoptosis, thrombocytopenia, liver failure with hepatic necrosis, renal failure, vascular permeability, edema, and acute respiratory distress syndrome (ARDS)<sup>65–69</sup>. The dramatic thickening of the alveolar walls and interstitial pneumonitis observed in the lungs of Josiah-infected animals are consistent with ARDS. The dramatic Josiah LASV replication in the lungs could have favored an exacerbated local inflammatory response, contributing to the pathology observed in these tissues. Furthermore, large sets of genes related to the inflammatory response and T-cell immunity, known to be up and downregulated, respectively, in correlation with the severity of sepsis, were similarly modulated in Josiah-infected animals<sup>29–35</sup>, further suggesting that highly similar pathophysiological mechanisms are recruited during sepsis and Lassa fever.

The outcome of Lassa fever appears to be determined very early. Indeed, as soon as 1 DPI, we were able to identify DE genes in PBMCs associated with LASV infection and Lassa fever outcome. At a time when LASV replication is still restricted to the local inoculation site, a systemic PBMC response can already be observed, as previously reported<sup>19</sup>. Moreover, upregulation of IFN-response-related genes was also evident 2 DPI in the spleen and liver of all LASV-infected NHPs relative to control animals and in the spleen, LN, and liver of Josiah-infected animals compared to the other NHPs. This observation confirms that a systemic response was induced very early after LASV infection, at a time when the infection was clinically silent. From 2 to 10 DPI, certain IFN-response genes were upregulated in LASV-infected NHPs relative to control animals and could be used as high probability markers of infection, as proposed by other authors<sup>19,70</sup>. Similarly, another set of genes was DE between AV- and Josiah-infected NHPs throughout the course of infection, allowing prediction of the outcome of Lassa fever from the early incubation period to terminal stages, as proposed for other acute viral infections such as dengue<sup>71</sup>. The analysis of the expression of these genes by RT-PCR could be used for diagnostic purposes, as previously proposed for other genes<sup>54</sup>, assuming that they will likely not be specific for Lassa fever but rather represent an acute viral infection signature. Nevertheless, during an outbreak, such an approach would allow determining whether a subject has been infected very early after a high-risk contact and provide an idea of the severity of the coming disease. Whether the same sets of genes are modulated during human Lassa fever is yet to be determined,

but similar early transcriptomic profiles are probably induced in the PBMCs of patients. The relative specificity of these gene sets for Lassa fever could also be challenged against other infectious diseases. The prognostic of Lassa fever severity could be useful in epidemic setting when intensive care can be provided to a limited number of patients. Our results suggest that the orientation toward an efficient or defective immune response after LASV infection is decided in the first hours after infection. They allow us to propose the following hypothesis to explain the pathophysiology of Lassa fever. The first cycles of viral replication occur at the site of inoculation. Then LASV reaches the SLOs, which probably serve as a viral reservoir before systemic infection. In nonfatal Lassa fever, a balanced inflammatory response is induced early after infection and an efficient T-cell response is generated. Viral replication is restricted to the SLOs and no systemic dissemination of LASV occurs, probably owing to an efficient innate and/or T-cell response. This lack of systemic spreading avoids the appearance of severe clinical signs and only asthenia, anorexia, and fever are observed. From 12 DPI, viremia decreases concomitantly with the appearance of LASV-specific IgG and a robust CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell response. This balanced humoral and cellular response probably allows for complete control of LASV and recovery. In fatal Lassa fever, LASV is not restricted to the SLOs and systemic viral spreading occurs, with intense viral replication in virtually all organs and tissues, despite a more intense induction of the IFN-response in the early stages, possibly owing to higher viral replication. This massive replication generates substantial amounts of PAMPs, as double-stranded RNA intermediates or single-stranded RNA, which intensively activate cells through TLRs and RLRs, inducing a cytokine/chemokine storm, a defective T-cell response, and a pathological cascade similar to that induced during septic shock syndrome. Multiorgan failure then occurs, followed by death in a hypovolemic, hypoxic, and hypotensive context. Although the early events that dictate the evolution towards LASV control or severe HF and death remain unclear, this study brings new insights into the pathogenesis of Lassa fever and identifies transcriptomic signatures that could serve as an early marker of LASV infection and of Lassa fever prognosis.

## Methods

**Cell cultures.** Vero E6 cells were grown in Glutamax Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 0.5% penicillin-streptomycin (P/S).

**Viruses.** LASV-AV (GenBank FR832711.1 and FR832710.1) and LASV-Josiah (GenBank HQ688674.1 and HQ688672.1) strains were kindly provided by Dr Stephan Becker (Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany). AV and Josiah strains were passaged four and five times before generating a stock, respectively. Stocks were produced on Vero E6 cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 in DMEM supplemented with 2% FBS and 0.5% P/S. Culture supernatants were harvested, titrated on Vero E6 cells, checked for the absence of *Mycoplasma spp.*, aliquoted, and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Infection of animals.** All infectious work with LASV and sample inactivation was performed in a maximum containment laboratory (Laboratoire P4 Jean Mériéux, Lyon, France). All cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (12 females, 16 males, age range 2–3 years, weight range 2–5 kg) were purchased from SILABE (Simian Laboratory Europe, Niederhausbergen, France). One group of four and one group of six monkeys were infected with a subcutaneous injection (at the back of the thigh) of 0.5 mL PBS containing  $10^3$  FFU of LASV-AV or LASV-Josiah strain, respectively. Another control group of three monkeys was injected subcutaneously with 0.5 mL PBS. Animals were followed for clinical signs of the disease and euthanized according to a scoring based on body temperature, body weight, feeding, hydration, behavior, and clinical signs. The experimentation endpoint was placed at 28 days post-challenge and all animals that had survived to this point were killed according to validated experimental procedures. Blood draws were performed daily from the day of infection to the fourth DPI, every 2 days from the fourth day to the 12th DPI, and every 3–4 days between the 12th day and the end of the experiment. BM was harvested on the second, fourth, seventh, and

tenth day, as well as during necropsies. In parallel with the longitudinal follow-up of animals, groups of three monkeys infected with  $10^3$  FFU of LASV-AV were sequentially killed 2, 5, and 11 DPI. Other groups of three monkeys were also infected with  $10^3$  FFU of LASV-Josiah and sequentially killed 2 and 5 DPI. Blood and BM samples were harvested using the same protocol as described above. Full necropsies were performed on each animal and organs were harvested for virologic and pathological analyses. All procedures were approved by the Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale Rhône Alpes (file number 2015062410456662, CECAPP, UMS3444/US8, Lyon, France).

**Hematology and biochemistry analyses.** Hematology was completed on a MS9 (Melet Schloesing Laboratories, Osny, France) and the following parameters were evaluated in blood samples harvested in ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tubes: red blood cell count, hemoglobin concentration, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, platelets count, neutrophil count, lymphocyte count, monocyte count, eosinophil count, and basophil count. Part of the biochemistry analyses was completed on a Horiba Pentra C200 (Horiba, Kyoto, Japan) and the following parameters were evaluated in blood samples harvested in heparin tubes: ALT, AST, creatinine kinase, CRP, total bilirubin, direct bilirubin, gamma glutamyltransferase, LDH, albumin, total protein, iron, uric acid, and calcium. The other part of the biochemistry analyses was completed on an i-STAT (Abbott, Princeton, USA), with an evaluation of the following parameters: sodium, potassium, chloride, total carbon dioxide, glucose, anionic gap, creatinine, and urea.

**LASV RNA detection.** Viral RNA was extracted from plasma, cerebrospinal fluid, and urine using QIAamp Viral RNA Minikits (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Organs were treated with RNA later (Qiagen) prior to freezing. After weighing and grinding the various tissues, total RNA was extracted using ViralRNeasy Minikits (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Quantification of viral RNA was performed using the EuroBioGreen Lo-ROX qPCR mix (Eurobio, Les Ulis, France), with primers specific for LASV NP sequence: 5'-CTTTCACCAGGGGTGTCT-3' and 5'-GTCCACC TCAGACAATGGATGG-3' for LASV-Josiah and 5'-CTCTCACC GGAGTAT CT-3' and 5'-CCTCAATCAATGGATGGC-3' for LASV-AV. RT-PCR was performed on a Light Cycler 480 II (Roche, Boulogne-Billancourt, France).

**LASV titration.** Vero E6 cells were infected with sequential dilutions of body fluids and resuspended tissue and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5% CO<sub>2</sub> for 7 days with carboxymethylcellulose (CMC) (1.6%) (BDH Laboratory Supplies, Poole, UK) in DMEM supplemented with 2% FBS. Infectious foci were detected by incubation with monoclonal antibodies (mAbs) directed against LASV antigens (mAbs L52-54-6A, L53-237-5, and YQB06-AE05, generously provided by P. Jahrling, USAMRIID, Fort Detrick, MD), followed by PA-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich).

**Quantification of cytokines in plasma.** Thirty-seven analytes were measured in plasma samples using the following multiplex magnetic bead assays: NHP cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panels<sup>®</sup> I (GM-CSF, TGF $\alpha$ , GCSF, IFN $\gamma$ , IL-2, IL-10, IL-15, sCD40L, IL-17, IL-1ra, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, TNF $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL12/23p40, VEGF, and IL-18) and II (FGF-2, Eotaxin, IL-16, fractalkine, sCD137, granzyme A and B, IL-1 $\alpha$ , IL-23, IP-10, sFasL, TNF- $\beta$ , IL-28A, and perforin) (Merck). Plates were prepared according to the manufacturers' recommendations and analyzed on a Magpix<sup>®</sup> instrument (Merck). IFN- $\alpha$ 2 levels were detected in the plasma of animals using matched pair antibodies and standard protein (Life technologies), according to the manufacturer's instructions. For the detection of LASV-specific IgG, polyporp plates (Nunc) were coated overnight with lysates of LASV- or mock-infected Vero E6 cells as positive and negative antigens, respectively. Plasma samples were then incubated for 2 h on both antigens at dilutions of 1:250, 1:1000, 1:4000, and 1:16,000. Plates were further incubated with polyclonal peroxidase-conjugated antibodies directed against NHP IgG $\gamma$ -chain (Kirkegaard and Perry Laboratories). Tetramethylbenzidine (TMB) (Eurobio) and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solutions were used for detection and the optical densities (OD) measured. For the detection of LASV-specific IgM antibody titers, Maxisorp plates (Nunc) were coated overnight with monkey anti- $\mu$  antibodies at a concentration of 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and then saturated for 2 h with a 2.5% PBS-SAB solution before adding diluted plasma samples at dilutions of 1:100, 1:400, and 1:1600. Negative and positive LASV antigens were then added to the plates for 1 h before incubation with a mouse anti-LASV antibody cocktail. Plates were then incubated with anti-mouse peroxidase-conjugated antibodies before revelation with TMB and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and measuring the OD.

**Neutralization assays.** For plaque reduction neutralization assays, plasma samples were diluted and mixed with 150 FFU of LASV strain Josiah. After 1 h, the mixtures were added to Vero E6 cells and incubated for 1 h before the addition of CMC diluted in DMEM. After seven days, the number of foci was calculated by confocal immunodetection using anti-LASV antibodies.

**Histology.** Histopathology and immunohistochemistry were performed on macaque tissues. Following fixation and inactivation of tissues for a minimum of 14 days in 10% neutral-buffered formalin and one formalin exchange, tissues were removed from the BSL-4 and processed using a STP120 (Microm Microtech, Brignais, France) and embedded with paraffin using a TES99 device (Tech-Inter, Thoiry, France). Samples were sectioned (3–5 µm) and the resulting slides stained with hematoxylin and eosin. Anti-LASV virus immunoreactivity was detected using a custom anti-mouse GP2c antibody at a 1:50 dilution after unmasking of the paraffin embedded samples. The secondary antibody was a ready-to-use peroxidase coupled anti-mouse (N-Histofine, Microm Microtech). Samples were then counterstained with hematoxylin before observation with a Leica DMI8 microscope and LASX software.

**Flow cytometry.** Blood cell populations, proliferation, and cytotoxic activity during the course of the disease were quantified from 50 µL of fresh whole blood. Surface antibodies to human or NHP CD3, CD4, CD8, CD10, CD20, CD27, CD28, CD45RA, CD56, CD69, CD80, and CD95 from BD Biosciences, CD86, CD1c, HLA-DR, CD14 from Miltenyi Biotec, and CD40 and CD279 from BioLegend were stained for 30 min on ice. For surface staining only, cells were fixed after lysing of the red blood cells using the Immunoprep Reagent System (Beckman Coulter) according to manufacturer's instructions.

For intracellular staining, red blood cells were lysed using PharmLyse (BD Biosciences) and white cells were stained with surface antibodies, permeabilized using the FoxP3 staining buffer set (Miltenyi), and stained using antibodies to Ki67, GrzB (BD Biosciences), and perforin (Mabtech) before fixation in PBS with 1% paraformaldehyde (PFA). Apoptotic and necrotic cells were identified using the Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7AAD (BioLegend) according to the manufacturer's instructions. Splens, MLNs, and ILNs were manually crushed and the tissue filtered with a 70-µm cell strainer to recover the cells. Red blood cells were then lysed using ACK buffer (ThermoFisher Scientific) and cells from the organs suspended in fresh RPMI medium supplemented with 1% Hepes, 5% fetal bovine serum, and 0.5% P/S. Cells were then directly stained for intracellular and extracellular markers using the same protocol and reagents described above. For NK and B cells analysis, frozen PBMC and organs were thawed and washed in RPMI 5% FCS, 1% Hepes, non-essential amino acids and 0.5% P/S. Cells were then stained with surface antibodies for 30 min on ice with CD27, CD20, CD107a, and CXCR3 antibodies (BD Biosciences), CD16 (Biolegend), Nkp80 and NKG2d (Miltenyi Biotec), and CD38 (Stemcell). Other antibodies used were described above. Cells were washed once in PBS, 0.5% FCS and 2 mM EDTA before fixation with 1% PFA. Intracellular staining with Ki67 was performed using the same intracellular staining method than above. Cells were analyzed using a 10-color Gallios cytometer (Beckman Coulter) and the data analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter).

**Transcriptomic analysis.** Total RNA was extracted from PBMCs, splenocytes, MLN, and liver using the RNeasy Extraction Kit (QIAGEN). RNA samples were then quantified using the Quantifluor RNA system (Promega) and qualified using Pico RNA Chips on a Bioanalyzer 2100 (Agilent). External RNA Controls Consortium (ERCC) RNA Spike-in Mix 1 (ThermoFisher Scientific) was added to all samples to limit the variability of samples in multiple batches and mRNA was poly (A)-captured using NEXTflex Poly(A) beads (Bio Scientific). The libraries were prepared using the NEXTflex Rapid Directional RNA-seq (RNA sequencing) Kit (Bio Scientific) and were quantified and qualified using a Quantus quantification kit (Promega) and a fragment analyzer advanced analytical. Sequencing was performed on a NextSeq 500 Flow Cell High Output instrument (single read, 75 base pairs). Three independent data sets were obtained: PBMCs from day 2 to 10, PBMCs 1 DPI (PBMC1), and the organs. The first data set included 21 samples: three infection status (mock, Josiah, and AV) and three timepoints (2, 4, and 10 DPI for LASV-infected animals and 28 DPI for the mock infection). The second data set contained nine samples (three infection status, three animals per group). The last one consisted of 69 samples: three organs (liver, spleen, and LNs), three infection status (mock, AV, and Josiah), and three timepoints (2, 5, and 11 DPI for LASV-infected animals and 28 DPI for mock-, as well as for AV-infected NHPs).

Bioinformatics analysis was performed using the RNA-seq pipeline from Sequana<sup>72</sup>. Reads were cleaned of adapter sequences and low-quality sequences using cutadapt version 1.11<sup>73</sup>. Only sequences of at least 25 nucleotides in length were considered for further analysis. STAR version 2.5.0a<sup>74</sup>, with default parameters, was used for alignment against the reference genome (*Macaca Fascicularis* 5 from ENSEMBL version 95). Reads were assigned to genes using featureCounts version 1.4.6-p3<sup>75</sup> from Subreads package (parameters: -t gene -g ID -O -s 2).

Statistical analyses were performed to identify genes for which the expression profiles were significantly different for each pair of biological conditions. For each data set (PBMC, PBMC1, and organs), genes exhibiting expression lower than one count per million for at least three samples were considered to have a low level of expression and discarded from the analysis. For the PBMC and PBMC1 data sets, differential analysis was performed using the DESeq2 R package (v1.24.0)<sup>76</sup>. The model was adjusted for the effect of infection status, timepoints, animal identifier, and sequencing lane, when relevant. For the organ data set, differential analysis was performed using the limma R package (v3.40.6)<sup>77</sup>. Expression values were normalized using voom transformation and the model was adjusted for the effect of

organ, infection status, timepoint, and animal identifier. For the organ data set, the sex of the animals was not included because of the statistical confounding effects of the experimental conditions of interest. For both data sets, gene set functional analysis was performed to identify gene sets and pathways enriched in the various biological conditions using the CAMERA function from the limma R package<sup>78</sup> based on the same model as in the differential analysis. The interrogated gene signatures included the Hallmark gene set and the Reactome and KEGG pathways from the Molecular Signature Data Base<sup>79</sup>. The probabilities of lethal infection and infection status were estimated using the RandomForest R package (v4.6-14)<sup>80</sup>. Each probability was computed for each figure by estimating a random forest for the gene expression subset for a specific number of genes (seven for lethal infection and six for infection status). The resulting probabilities were predicted by the model to assess the predictive ability of the selected biomarkers.

**Statistical analysis.** Statistical analyses of all collected data excluding transcriptomics were performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data of continuous variables are expressed as individual points or as the mean ± standard error of the mean. Student's *t* test or one-way analysis of variance with multiple comparisons were used to compare the means between groups of data with a normal distribution. The Kruskal–Wallis multiple comparisons test was used to compare the means between groups of data with a non-normal distribution. The Shapiro–Wilk test was used to test for normality. The statistical analyses performed on the transcriptomic data sets are described in the appropriate Methods section. In addition, the sample sizes and number of replicates were described in the text or figure captions.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

## Data availability

The data sets related to RNA sequencing generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available owing to further investigation currently in progress but are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 19 May 2020; Accepted: 1 December 2020;

Published online: 04 January 2021

## References

- Sogoba, N., Feldmann, H. & Safronetz, D. Lassa fever in West Africa: evidence for an expanded region of endemicity. *Zoonoses Public Health* **59**, 43–47 (2012).
- Yadouleton, A. et al. Lassa fever in Benin: description of the 2014 and 2016 epidemics and genetic characterization of a new Lassa virus. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 1761–1770 (2020).
- Olayemi, A. et al. New hosts of the Lassa virus. *Sci. Rep.* **6**, 25280 (2016).
- Kafetzopoulou, L. E. et al. Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science* **363**, 74–77 (2019).
- 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. Phylog. Evol.* **8**, 301–316 (1997).
- Manning, J. T., Forrester, N. & Paessler, S. Lassa virus isolates from Mali and the Ivory Coast represent an emerging fifth lineage. *Front. Microbiol.* **6**, 1037 (2015).
- Whitmer, S. L. M. et al. New lineage of Lassa virus, Togo, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 599–602 (2018).
- 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**, 5890–5903 (2009).
- Günther, S. et al. Imported Lassa fever in Germany: molecular characterization of a new Lassa virus strain. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 466–476 (2000).
- 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.* **18**, 684–695 (2018).
- Mateer, E. J., Huang, C., Shehu, N. Y. & Paessler, S. Lassa fever-induced sensorineural hearing loss: a neglected public health and social burden. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, e0006187 (2018).
- Oestereich, L. et al. Chimeric mice with competent hematopoietic immunity reproduce key features of severe Lassa fever. *PLOS Pathog.* **12**, e1005656 (2016).
- Cashman, K. A. et al. Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model. *Antivir. Res.* **90**, 70–79 (2011).
- Jahrling, P. B., Smith, S., Hesse, R. A. & Rhoderick, J. B. Pathogenesis of Lassa virus infection in guinea pigs. *Infect. Immun.* **37**, 771–778 (1982).

15. Carrion, J. 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**, 4093–4102 (2007).
16. Hensley, L. et al. Pathogenesis of lassa fever in cynomolgus macaques. *Viol. J.* **8**, 205 (2011).
17. Saffronetz, 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).
18. Carrion, R. Jr. et al. Lassa virus infection in experimentally infected marmosets: liver pathology and immunophenotypic alterations in target tissues. *J. Virol.* **81**, 6482–6490 (2007).
19. Djavani, M. M. et al. Early blood profiles of virus infection in a monkey model for Lassa fever. *J. Virol.* **81**, 7960–7973 (2007).
20. Zapata, J. C. et al. Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection of macaques: a model for Lassa fever. *Antivir. Res.* **92**, 125–138 (2011).
21. Downs, I. et al. Natural history of aerosol induced lassa fever in non-human primates. *Viruses* **12**, 593 (2020).
22. Baize, S. et al. Lassa virus infection of dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *J. Immunol.* **172**, 2861–2869 (2004).
23. Fisher-Hoch, S. P., Hutwagner, L., Brown, B. & McCormick, J. B. Effective vaccine for Lassa fever. *J. Virol.* **74**, 6777–6783 (2000).
24. Geisbert, T. W. et al. Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLOS Med.* **2**, 537–545 (2005).
25. 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).
26. Nakaya, Helderl. et al. Systems analysis of immunity to influenza vaccination across multiple years and in diverse populations reveals shared molecular signatures. *Immunity* **43**, 1186–1198 (2015).
27. Querec, T. D. et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat. Immunol.* **10**, 116–125 (2008).
28. Cursons, J. et al. A gene signature predicting natural killer cell infiltration and improved survival in melanoma patients. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 1162–1174 (2019).
29. Almansa, R. et al. Transcriptomic correlates of organ failure extent in sepsis. *J. Infect.* **70**, 445–456 (2015).
30. Sweeney, T. E. et al. A community approach to mortality prediction in sepsis via gene expression analysis. *Nat. Commun.* **9**, 694 (2018).
31. Cazalis, M.-A. et al. Early and dynamic changes in gene expression in septic shock patients: a genome-wide approach. *Intensive Care Med. Exp.* **2**, 20 (2014).
32. Stanski, N. L. & Wong, H. R. Prognostic and predictive enrichment in sepsis. *Nat. Rev. Nephrol.* **16**, 20–31 (2020).
33. Davenport, E. E. et al. Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir. Med.* **4**, 259–271 (2016).
34. Barcella, M. et al. Identification of a transcriptome profile associated with improvement of organ function in septic shock patients after early supportive therapy. *Crit. Care* **22**, 312 (2018).
35. Bauer, M. et al. A transcriptomic biomarker to quantify systemic inflammation in sepsis — a prospective multicenter phase II diagnostic study. *EBioMedicine* **6**, 114–125 (2016).
36. 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).
37. Mateo, M. et al. Vaccines inducing immunity to Lassa virus glycoprotein and nucleoprotein protect macaques after a single shot. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaaw3163 (2019).
38. 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).
39. Kamphuis, E., Junt, T., Waibler, Z., Forster, R. & Kalinke, U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* **108**, 3253–3261 (2006).
40. Binder, D., Fehr, J., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. Virus-induced transient bone marrow aplasia: major role of interferon- $\alpha/\beta$  during acute infection with the noncytopathic lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Exp. Med.* **185**, 517–530 (1997).
41. Luu, K., Shao, Z. & Schwarz, H. The relevance of soluble CD137 in the regulation of immune responses and for immunotherapeutic intervention. *J. Leukoc. Biol.* <https://doi.org/10.1002/JLB.1002MR1119-1224R> (2020).
42. Lin, L. et al. Granzyme B secretion by human memory CD4 T cells is less strictly regulated compared to memory CD8 T cells. *BMC Immunol.* **15**, 36 (2014).
43. 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**, 2186–2192 (2000).
44. van Leeuwen, E. M. M., Remmerswaal, E. B. M., Heemskerck, M. H. M., ten Berge, I. J. M. & van Lier, R. A. W. Strong selection of virus-specific cytotoxic CD4+ T-cell clones during primary human cytomegalovirus infection. *Blood* **108**, 3121–3127 (2006).
45. Mueller, S. N. & Germain, R. N. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 618–629 (2009).
46. Zelante, T., Fric, J., Wong, A. Y. W. & Ricciardi-Castagnoli, P. Interleukin-2 production by dendritic cells and its immuno-regulatory functions. *Front. Immunol.* **3**, 161–161 (2012).
47. Ahn, E. et al. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci.* **115**, 4749–4754 (2018).
48. Ruibal, P. et al. Unique human immune signature of Ebola virus disease in Guinea. *Nature* **533**, 100–104 (2016).
49. Poznanski, S. M. & Ashkar, A. A. What defines NK cell functional fate: phenotype or metabolism? *Front. Immunol.* **10**, 1414 (2019).
50. Freud, A. G. et al. NKP80 defines a critical step during human natural killer cell development. *Cell Rep.* **16**, 379–391 (2016).
51. Klimosch, S. N., Bartel, Y., Wiemann, S. & Steinle, A. Genetically coupled receptor–ligand pair NKP80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses. *Blood* **122**, 2380–2389 (2013).
52. Bernardini, G., Antonangeli, F., Bonanni, V. & Santoni, A. Dysregulation of chemokine/chemokine receptor axes and NK Cell Tissue localization during diseases. *Front. Immunol.* **7**, 402 (2016).
53. Curtisinger, J. M. et al. Inflammatory cytokines provides a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* **162**, 3256–3262 (1999).
54. 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).
55. Mueller, S. N. et al. Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses. *Science* **317**, 670–674 (2007).
56. Alexandre, Y. O. & Mueller, S. N. Stromal cell networks coordinate immune response generation and maintenance. *Immunol. Rev.* **283**, 77–85 (2018).
57. Ohl, L., Bernhardt, G., Pabst, O. & Förster, R. Chemokines as organizers of primary and secondary lymphoid organs. *Semin. Immunol.* **15**, 249–255 (2003).
58. Mueller, S. N. et al. Viral targeting of fibroblastic reticular cells contributes to immunosuppression and persistence during chronic infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 15430–15435 (2007).
59. Steele, K. E., Anderson, A. O. & Mohamadzadeh, M. Fibroblastic reticular cells and their role in viral hemorrhagic fevers. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **7**, 423–435 (2009).
60. Steele, K. E., Anderson, A. O. & Mohamadzadeh, M. Fibroblastic reticular cell infection by hemorrhagic fever viruses. *Immunotherapy* **1**, 187–197 (2009).
61. Guérin, E. et al. Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration. *Crit. Care Med.* **42**, 2007–2018 (2014).
62. Pannetier, D. et al. Human dendritic cells infected with the non-pathogenic Mopeia virus induce stronger T-cell responses than with Lassa virus. *J. Virol.* **85**, 8293–8306 (2011).
63. Schaeffer, J. et al. Lassa virus activates myeloid dendritic cells but suppresses their ability to stimulate T cells. *PLOS Pathog.* **14**, e1007430 (2018).
64. Cavallion, J.-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicol.* **149**, 45–53 (2018).
65. Hotchkiss, R. S. et al. Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 16045 (2016).
66. Cabrera-Perez, J., Condotta, S. A., Badovinac, V. P. & Griffith, T. S. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 767–777 (2014).
67. Venet, F. & Monneret, G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* **14**, 121–137 (2018).
68. Gonçalves, G. M., Zamboni, D. S. & Câmara, N. O. S. The role of innate immunity in septic acute kidney injuries. *Shock* **34**, 22–26 (2010).
69. Bhatia, M. & Mochhala, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* **202**, 145–156 (2004).
70. Zapata, J. C. & Salvato, M. S. Genomic profiling of host responses to Lassa virus: therapeutic potential from primate to man. *Future Virol.* **10**, 233–256 (2015).
71. Nikolayeva, I. et al. A blood RNA signature detecting severe disease in young dengue patients at hospital arrival. *J. Infect. Dis.* **217**, 1690–1698 (2018).
72. Cokelaer, T., Desvillechabrol, D., Legendre, R. & Cardon, M. ‘Sequana’: a set of snakemake NGS pipelines. *J. Open Source Softw.* **2**, 352 <https://doi.org/10.21105/joss.00352> (2017).
73. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. J.* **17**(2011).
74. Dobin, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2012).

75. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2013).
76. Love, M., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
77. Ritchie, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
78. Wu, D. & Smyth, G. K. Camera: a competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. *Nucleic Acids Res.* **40**, e133 (2012).
79. Liberzon, A. et al. The molecular signatures database hallmark gene set collection. *Cell Syst.* **1**, 417–425 (2015).
80. Liaw, A. & Wiener, M. Classification and Regression by randomForest. *R News* **2**, 18–22 (2002).

## Acknowledgements

We thank Emmanuelle Guillot-Combe for invaluable support in the project. We are grateful to S. Mundweiler, B. Labrosse, D. Pannetier, S. Mély, A. Bocquin, D. Thomas, S. Godard, E. Moissonnier, A. Pocquet, J. Valois, and C. Léculier (P4 INSERM–Jean Mérieux, US003, INSERM) for assistance in conducting the BSL-4 experiments. We also thank M. Langry, C. Tournebize, and J. Noiret for their technical help during the in vivo experiments. We thank F. Chrétien, D. Hardy, P. Ave, and L. Fiette (Experimental Neuropathology Unit, Institut Pasteur) for training and advice on immunohistochemical processing and staining. We also thank O. Merabet, S. Krieger, C. Germain, and M. Jourdain (UBIVE) for technical help. We thank S. Becker (Institut of Virology, Marburg, Germany) for providing us with the LASV strains, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, and P. Jahrling (Special Pathogens Branch, Center for Disease Control, Atlanta, GA) for the LASV monoclonal antibodies, and H. Contamin (Cynbiose) for providing healthy primate blood. This study was funded by The Délégation Générale pour l'Armement (Agence Nationale de la Recherche - Accompagnement Spécifique des Travaux de Recherches et d'Innovation Défense, ANR-ASTRID 2014, France), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, France), and a PhD grant attributed to N.B. from the Direction Générale de l'Armement (France, 2014015). The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Author contributions

S. Baize conceived the project. N.B., S.R., and S. Baize designed the protocols. N.B., S.R., A.J., M.M., X.C., J.S., and C.P. performed the RNA extractions, isolation of cells from organs, PBMC isolation, and flow cytometry sample preparation. L.B., S.B., A.V., A.D., F.J., and C.B. took care of the animals and performed the LASV challenge, scoring,

sampling, hematological and biochemical analyses, and necropsies. L.B., F.J., and C.B. supervised the animal experiments. C.C. and H.R. supervised and validated the BSL-4 protocols. N.B., S. Baize, S.R., and A.J. performed the ELISA and Luminex assays. S.R. and S. Baize performed the flow cytometry analyses. N.B. and S.R. performed the RT-qPCR analyses on the plasma and organ samples. N.B. and S.R. performed the viral titrations and seroneutralization assays. N.B. prepared the samples for transcriptomic analyses. N.B. and J.H. performed the histological analyses. G.J. analyzed the anatomic-pathological changes. C.L.-L. and R.A. performed the RNA-seq. E.P., N.P., R.L., and M.-A.D. analyzed the transcriptomic data. N.B. and S. Baize analyzed the data and wrote the paper. S. Baize supervised the project.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01543-7>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to S.B.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



# A Vaccine Platform against Arenaviruses Based on a Recombinant Hyperattenuated Mopeia Virus Expressing Heterologous Glycoproteins

Xavier Carnec,<sup>a</sup> Mathieu Mateo,<sup>a</sup> Audrey Page,<sup>a</sup> Stéphanie Reynard,<sup>a</sup> Jimmy Hortion,<sup>a</sup> Caroline Picard,<sup>a</sup> Elsie Yekwa,<sup>b</sup> Laura Barrot,<sup>c</sup> Stéphane Barron,<sup>c</sup> Audrey Vallve,<sup>c</sup> Hervé Raoul,<sup>c</sup> Caroline Carbonnelle,<sup>c</sup> François Ferron,<sup>b</sup> Sylvain Baize<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup>CNRS, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques UMR 7257, Aix-Marseille Université, Marseille, France

<sup>c</sup>Laboratoire P4 Jean Mérieux—INSERM, US003, INSERM, Lyon, France

**ABSTRACT** Several Old World and New World arenaviruses are responsible for severe endemic and epidemic hemorrhagic fevers, whereas other members of the *Arenaviridae* family are nonpathogenic. To date, no approved vaccines, antivirals, or specific treatments are available, except for Junín virus. However, protection of non-human primates against Lassa fever virus (LASV) is possible through the inoculation of the closely related but nonpathogenic Mopeia virus (MOPV) before challenge with LASV. We reasoned that this virus, modified by using reverse genetics, would represent the basis for the generation of a vaccine platform against LASV and other pathogenic arenaviruses. After showing evidence of exoribonuclease (ExoN) activity in NP of MOPV, we found that this activity was essential for multiplication in antigen-presenting cells. The introduction of multiple mutations in the ExoN site of MOPV NP generated a hyperattenuated strain (MOPV<sub>ExoN6b</sub>) that is (i) genetically stable over passages, (ii) has increased immunogenic properties compared to those of MOPV, and (iii) still promotes a strong type I interferon (IFN) response. MOPV<sub>ExoN6b</sub> was further modified to harbor the envelope glycoproteins of heterologous pathogenic arenaviruses, such as LASV or Lujo, Machupo, Guanarito, Chapare, or Sabia virus in order to broaden specific antigenicity while preserving the hyperattenuated characteristics of the parental strain. Our MOPV-based vaccine candidate for LASV, MOPEVAC<sub>LASV</sub>, was used in a one-shot immunization assay in nonhuman primates and fully protected them from a lethal challenge with LASV. Thus, our hyperattenuated strain of MOPV constitutes a promising new live-attenuated vaccine platform to immunize against several, if not all, pathogenic arenaviruses.

**IMPORTANCE** Arenaviruses are emerging pathogens transmitted to humans by rodents and responsible for endemic and epidemic hemorrhagic fevers of global concern. Nonspecific symptoms associated with the onset of infection make these viruses difficult to distinguish from other endemic pathogens. Moreover, the unavailability of rapid diagnosis in the field delays the identification of the virus and early care for treatment and favors spreading. The vaccination of exposed populations would be of great help to decrease morbidity and human-to-human transmission. Using reverse genetics, we generated a vaccine platform for pathogenic arenaviruses based on a modified and hyperattenuated strain of the nonpathogenic Mopeia virus and showed that the Lassa virus candidate fully protected nonhuman primates from a lethal challenge. These results showed that a rationally designed recombinant MOPV-based vaccine is safe, immunogenic, and efficacious in nonhuman primates.

**Received** 21 December 2017 **Accepted** 22 March 2018

**Accepted manuscript posted online** 28 March 2018

**Citation** Carnec X, Mateo M, Page A, Reynard S, Hortion J, Picard C, Yekwa E, Barrot L, Barron S, Vallve A, Raoul H, Carbonnelle C, Ferron F, Baize S. 2018. A vaccine platform against arenaviruses based on a recombinant hyperattenuated Mopeia virus expressing heterologous glycoproteins. *J Virol* 92:e02230-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02230-17>.

**Editor** Adolfo García-Sastre, Icahn School of Medicine at Mount Sinai

**Copyright** © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Sylvain Baize, [sylvain.baize@pasteur.fr](mailto:sylvain.baize@pasteur.fr).

**KEYWORDS** viral hemorrhagic fevers, arenavirus, innate immunity, Lassa fever, live-vector vaccines

Lassa virus (LASV) is an Old World arenavirus responsible for a hemorrhagic fever that is endemic in West Africa. Epidemiological data are scarce, but up to 300,000 people may be infected annually, with several thousand of them succumbing to the disease (1), while survivors often experience debilitating sequelae, such as irreversible deafness (2). Lassa fever (LF) is the viral hemorrhagic fever (VHF) the most frequently imported to northern countries, with approximately 30 cases during the last 10 years. More worrying, the area of circulation of LASV is expanding, as illustrated by the outbreak of LF that occurred in Benin in 2015, a country previously not affected by this virus, or by the sporadic cases observed in Mali, Burkina Faso, Ghana, and Ivory Coast. Although the mortality rate of LASV is frequently between 5 and 15%, outbreaks associated with a mortality rate of approximately 30 to 40% have been observed recently in Nigeria and Benin, and almost half of imported LF cases have resulted in death.

Arenaviruses are enveloped viruses with a bisegmented single-stranded RNA genome with an ambisense coding strategy. The large (L) segment encodes matrix protein Z and RNA-dependent RNA polymerase L, whereas the small (S) segment encodes the nucleoprotein (NP) and the precursor GPC of the envelope glycoprotein GP1-GP2 (3). Except for pathogenic arenaviruses isolated in humans, most arenaviruses have been isolated from their natural rodent reservoirs and have never been associated with human disease. Among Old World arenaviruses, Mopeia virus (MOPV) has been isolated in Mozambique from the same natural reservoir as LASV, *Mastomys natalensis*, and is closely related to LASV, sharing approximately 75% amino acid homology (4). MOPV is nonpathogenic in nonhuman primates (NHP) and can even protect them against a lethal challenge with LASV (5, 6). We have previously shown that both viruses share specific tropism for antigen-presenting cells (APC), in particular dendritic cells (DC) and macrophages (MP) (7, 8), but only MOPV (i) activates APC, (ii) induces type I interferon (IFN) production (9), and (iii) promotes a robust activation of T cells harboring functional cytotoxic properties (10). The greater immunogenicity of MOPV than of LASV, together with their close relationship, may explain the fact that MOPV is a “natural live-attenuated” vaccine against LASV. However, the complete absence of pathogenicity in NHP has not been demonstrated (6), and limited virulence has been observed in a mouse model (11). Thus, this natural virus cannot be used in humans as a vaccine.

Reverse genetics greatly improved the range of possibilities to study arenaviruses, which also included the generation of attenuated viruses for vaccine purposes (12, 13). Hence, viruses with a switch of the open reading frame (ORF) or codon deoptimization in the S segment of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are viable and attenuated and protected mice from lethal challenge with wild-type (WT) LCMV (14–16). Similar results were obtained with the replacement of the intergenic region of the L segment with that of the S segment of LCMV (17, 18). To combat LF, several vaccine candidates against LASV have already been assayed in NHP models and showed promising results. A vesicular stomatitis virus (VSV)-based candidate expressing LASV GPC fully protected NHP against several LASV strains (19, 20), but the use of the VSV backbone in humans might be hampered because of possible side effects (21). The expression of LASV GPC is sufficient to promote strong CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses, but other virus-derived antigens may also confer protection (20). To date, the only arenavirus-based vaccine for LF is the Mopeia/Lassa virus reassortant virus ML29, which harbors the L segment of MOPV and the S segment of LASV. ML29 was shown to protect NHP in a challenge with LASV, but the lack of reverse genetics for ML29 impedes the manipulation and control of its genome, particularly with WT NP of LASV, a known virulence factor that drastically dampens the type I IFN response in APC (22). Taken together, these results suggest that if MOPV can act as a vaccine for LASV, a



reverse-genetics system for MOPV used with an attenuated virulence factor(s) and specific LASV antigenic properties would represent a promising new vaccine strategy.

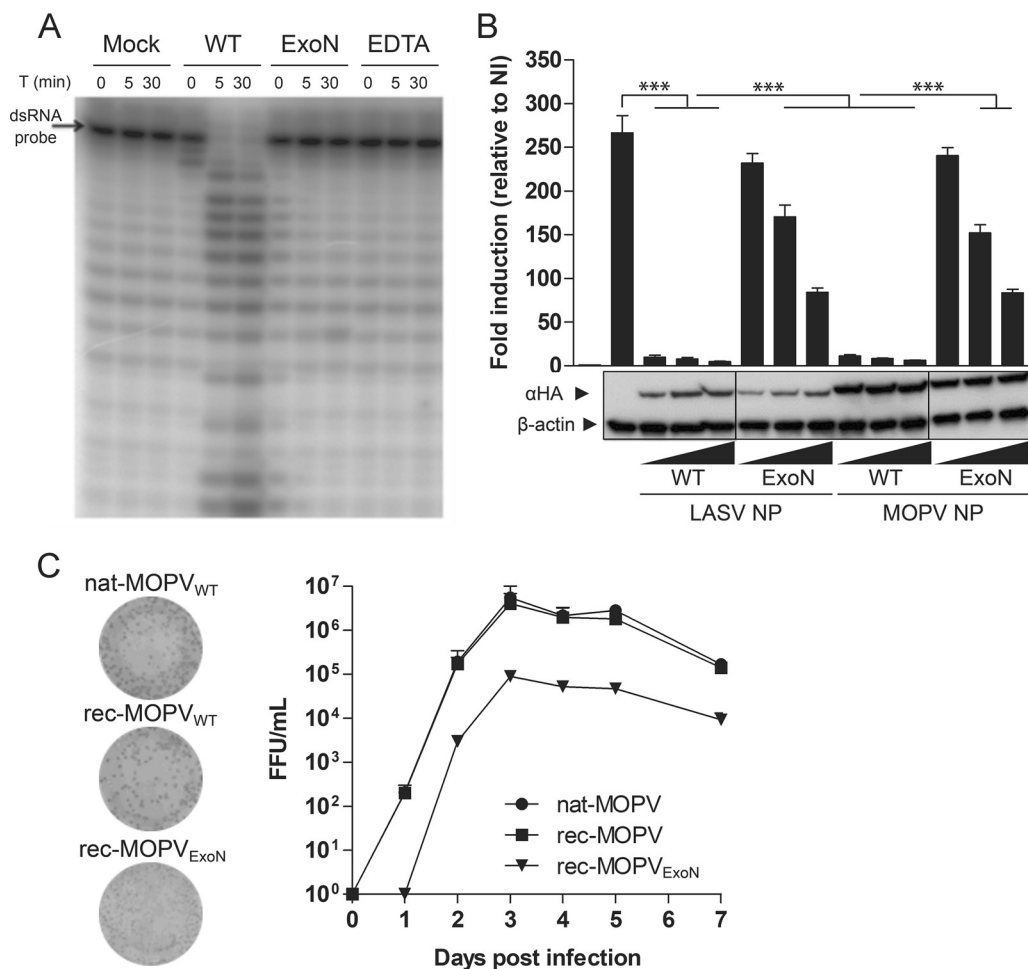
NP of arenaviruses contains a DEDDH exoribonuclease (ExoN) domain that can digest double-stranded RNA (dsRNA), limiting the recognition of pathogen-associated molecular patterns by cell sensors and suppressing the induction of type I IFN responses (23, 24). We first confirmed that NP of MOPV has 3'-to-5' exoribonuclease activity and used reverse genetics to generate a recombinant MOPV in which this function of NP was stably abrogated. This virus is highly attenuated in APC, more immunogenic than MOPV itself in terms of cell activation, and promotes a type I IFN response comparable to that with WT MOPV (MOPV<sub>WT</sub>). Further modifications of the genome of this "hyperattenuated" version of MOPV, named MOPEVAC, allowed the introduction of the heterologous GPC ORF to generate MOPV-based strains against pathogenic Old World and New World arenaviruses. The MOPV<sub>ExoN6b GPC LASV</sub> candidate (MOPEVAC<sub>LASV</sub>) was then used to immunize cynomolgus macaques before challenge with LASV. All immunized animal survived challenge, while all terminally ill control animals were euthanized. Our results establish the basis of an efficacious and versatile recombinant MOPV-based arenavirus vaccine platform against pathogenic arenaviruses.

## RESULTS

### Reverse genetics for generation of an ExoN knockout-based attenuated MOPV.

Previous studies have demonstrated the potential of MOPV to provide protection from LF (5, 6, 25). We propose the use of MOPV as a molecular basis for the development of a putative vaccine platform for pathogenic arenaviruses. NP of most arenaviruses is a virulence factor that is able to hinder the recognition of dsRNA intermediates by cellular sensors through their ExoN activity. We assessed the potential ExoN activity of NP of MOPV and its inhibition by synthesizing the C-terminal domains (residues 354 to 569) of WT MOPV and the D390A/G393A (NP ExoN) double mutant and incubating them for up to 30 min with radiolabeled 20-bp-long dsRNA probes. Gel separation of the reaction products showed that the WT domain was able to degrade the probe in a time- and Mn<sup>2+</sup>-dependent manner, contrary to the D390A/G393A mutant, which was unable to degrade the probe (Fig. 1A). We further assessed the role of ExoN activity in the inhibition of dsRNA sensing by cell host factors. We cotransfected HEK293T cells with a plasmid driving the expression of firefly luciferase (FF-Luc) under the control of an IFN regulatory 3 (IRF3)-dependent promoter along with expression plasmids for hemagglutinin (HA)-tagged versions of NP from the WT or the ExoN mutant (D390A/G393A) of MOPV, before infection with Sendai virus (SeV). The HA-tagged versions of the WT or the ExoN mutant (D389A/G392A) of LASV were used as controls. Western blot analysis of the cellular NP content showed a general decrease in the expression level of LASV NP relative to that of MOPV NP in our assay, regardless of the amount of transfected plasmids used. Both the WT and the ExoN mutant of MOPV were expressed at similar levels. In the absence of NP, SeV infection increased IRF3-dependent FF-Luc activity (mock) by 260-fold. The WT versions of both LASV and MOPV NP significantly inhibited this activity by 95 and 90%, respectively, whereas mutated NP was unable to inhibit FF-Luc activity by more than 10% at the lowest concentration and 60% at the highest (Fig. 1B). Hence, MOPV NP has ExoN activity that can be reduced by the introduction of mutations in the active site of the enzyme.

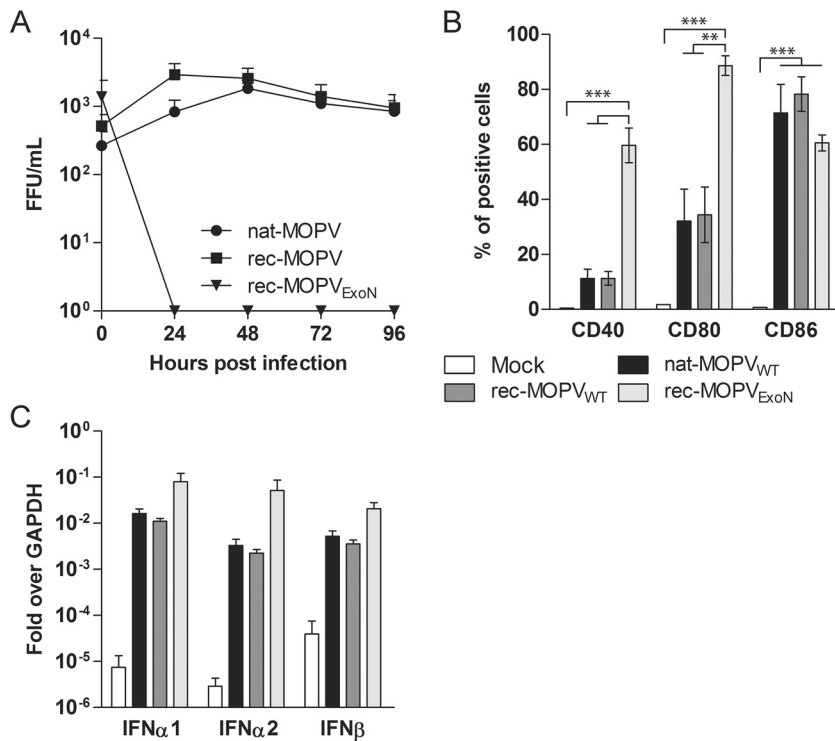
We next investigated the consequence of the introduction of the same mutations in NP of MOPV in an infectious context by setting up a four-plasmid reverse-genetics system for MOPV similar to that of LASV (26). Both WT recombinant MOPV (rec-MOPV<sub>WT</sub>) and the recombinant ExoN mutant of MOPV (rec-MOPV<sub>ExoN</sub>) were rescued, and the kinetics of their growth were compared to that of the WT natural virus (nat-MOPV<sub>WT</sub>) in Vero E6 cells infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001 (Fig. 1C). The growth rates of nat- and rec-MOPV<sub>WT</sub> rapidly reached a plateau and were indistinguishable from each other. The growth curve of rec-MOPV<sub>ExoN</sub> was parallel to that of the WT counterparts but with a 15-fold-lower titer. Similar results were obtained



**FIG 1** MOPV NP has ExoN activity required for efficient multiplication. (A) *In vitro* degradation of a 5'- $\gamma$ -<sup>32</sup>P-labeled dsRNA probe by the recombinant C-terminal domain of WT or D390A/G393A mutant MOPV NP. Purified ExoN domains and substrate probes were incubated with 5 mM MnCl<sub>2</sub> for up to 30 min. The WT ExoN domain was incubated with EDTA (10 mM) as a positive control for the abrogation of ExoN activity. T, time. (B) Inhibition of SeV-induced IRF3 activation by ExoN activity of MOPV NP. HEK293T cells were transfected with plasmids encoding WT or ExoN mutant NP of MOPV or LASV along with a plasmid with FF-Luc under the control of an IRF3 response element (p55CIB-Luc) for 24 h prior to infection with SeV. At 24 h postinfection, cells were lysed, and Luc activities were measured by using the Dual-Glo luciferase assay (Promega). FF-Luc activity was normalized to that of renilla Luc. Both levels of luciferase activity are expressed as arbitrary units, and the results are expressed as the means  $\pm$  standard errors of the means of data from three independent experiments performed in triplicate. \*\*\*, *P* < 0.001. The vertical lines indicate where the original blots were spliced together. NI, noninfected. (C) Reverse genetics for MOPV. Transfection of mouse Pol-I-driven expression plasmids for the S (with the WT or D390A/G393A mutant NP ORF) and WT L segments with plasmids encoding WT NP and L-polymerase (Lpol) ORFs of MOPV allowed the rescue of rec-MOPV<sub>WT</sub> and rec-MOPV<sub>ExoN</sub>. The replication kinetics of passage 2 recombinant viruses were compared to those of nat-MOPV<sub>WT</sub> in Vero E6 cells infected at an MOI of 0.001. Supernatants were collected and titrated. Results are expressed as FFU per milliliter. Plaque phenotypes for the three viruses harvested 72 h after infection are shown.

with Vero E6 cells infected at an MOI of 0.01 (data not shown). Both versions of MOPV<sub>WT</sub> had similar plaque phenotypes, whereas rec-MOPV<sub>ExoN</sub> had a small-plaque phenotype. The delayed and reduced multiplication of MOPV ExoN in Vero E6 cells suggests that the introduction of these mutations is responsible for the observed attenuation.

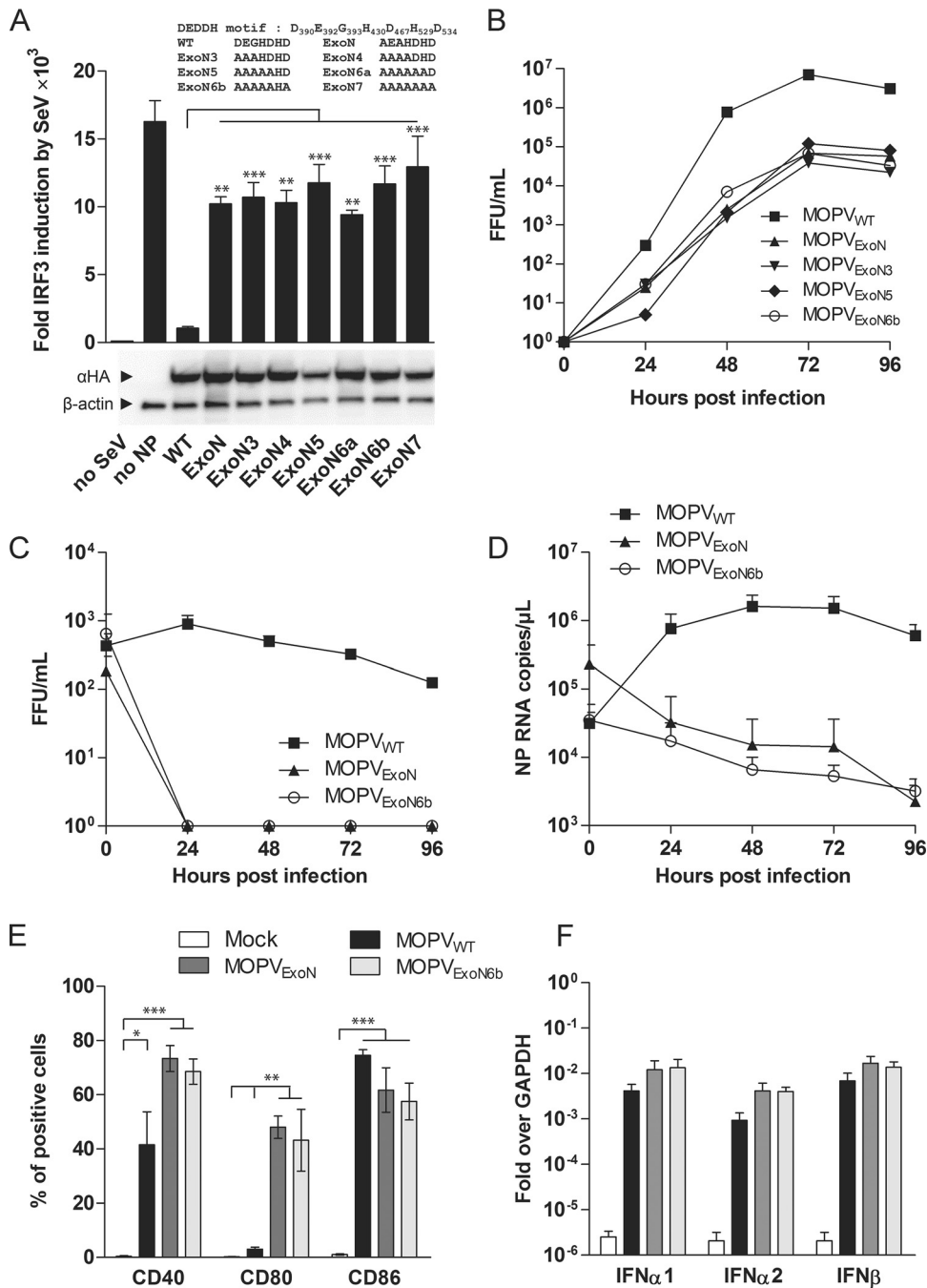
To verify the attenuated profile of our rec-MOPV<sub>ExoN</sub>, we infected monocyte-derived MP along with nat-MOPV<sub>WT</sub> or rec-MOPV<sub>WT</sub>. MP were infected with all three viruses at an MOI of 0.1, and the cell culture supernatants were collected for 4 days and titrated in order to compare their capacities to replicate (Fig. 2A). Both natural and recombinant strains of MOPV<sub>WT</sub> were able to sustain multiplication throughout the experiments. We were unable to detect infectious rec-MOPV<sub>ExoN</sub> in the supernatants of MP. To compare the immunogenicity of rec-MOPV<sub>ExoN</sub> with those of the WT viruses, MP infected with



**FIG 2** ExoN mutant MOPV is a potent activator of MP and the type I IFN response. MP were infected with nat-MOPV<sub>WT</sub>, rec-MOPV<sub>WT</sub>, or rec-MOPV<sub>ExoN</sub> for 1 h; washed twice; and cultured in complete MP medium. (A) The supernatants of MP infected at an MOI of 0.1 were collected after infection, and every 24 h for 4 days, and titrated. (B) MP infected at an MOI of 1 were detached 48 h after infection; saturated with human IgG; surface stained with antibodies to CD40, CD80, and CD86 before final fixation in PBS–1% PFA; and analyzed by flow cytometry (BD Biosciences). \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (C) RT-qPCR analysis of IFN- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2, and - $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; and CXCL10 mRNA levels in mock-infected MP and MP infected at an MOI of 1, 24 h after infection. The expression levels of all genes were normalized to GAPDH mRNA levels. The final results are expressed as fold induction relative to GAPDH. The results represent the means  $\pm$  standard errors of the means of data gathered from four different donors.

these viruses at an MOI of 1 were monitored for the cell surface expression of activation markers 48 h after infection (Fig. 2B). Infection with nat- or rec-MOPV<sub>WT</sub> promoted similar increases in the expression levels of CD40 and CD80 in MP compared to those under mock conditions, but this difference was not significant. In contrast, there was a large and significant increase in the percentage of cells that were positive for the surface expression of both molecules following rec-MOPV<sub>ExoN</sub> infection ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively). All three viruses promoted similar increases in CD86 expression levels in MP compared to mock-infected MP ( $P < 0.001$ ). We then compared the type I IFN responses to infection with the three viruses by the quantification of mRNA levels of IFN- $\beta$ , IFN- $\alpha$ 1, and IFN- $\alpha$ 2 in infected MP. All viruses promoted robust increases in the mRNA levels of all three IFNs compared to mock infection. Our results indicate that the knockdown of ExoN activity in MOPV prevents the replication of the virus and promotes strong cellular activation in MP but has a limited impact on increasing an already strong type I IFN response. We reasoned that the generation of this hyperattenuated MOPV could constitute the starting point for a MOPV-based vaccine platform for pathogenic arenaviruses.

**Reinforcement of the mutation at the ExoN site of MOPV NP.** The attenuation of ExoN of MOPV relies on the introduction of two mutations, in the active site of the enzyme, of residues involved in the divalent cation binding site. Since we previously observed reversion to the WT in a single ExoN NP mutant of LASV, we substituted up to five additional residues (mutant 3 [M3] to M7) (Fig. 3A) of the DEDDH domain of MOPV NP that are in direct or close contact with the divalent cation required for ExoN activity to strongly minimize the probability of the reversion of the ExoN-mutated NP



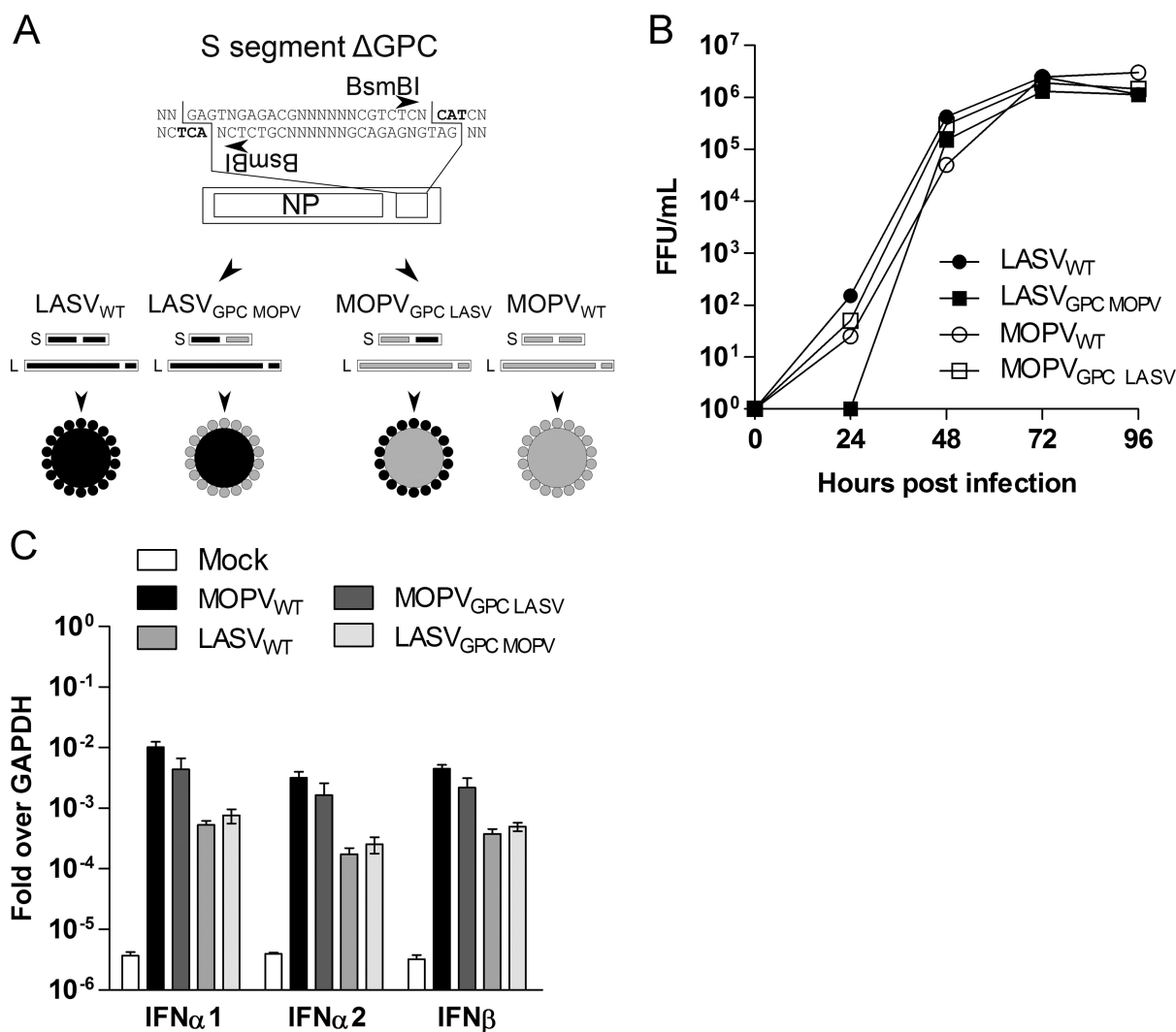
**FIG 3** Reinforcement of the mutated ExoN site of MOPV NP. (A) Schematic representation of the DEDDH domain of MOPV NP and nomenclature of the introduced mutations. The capacities of WT and mutated NP to inhibit the IRF3-dependent expression of FF-Luc activity in HEK293T cells infected by SeV were measured and normalized as described in the legend of Fig. 1B. The results obtained are shown as the means  $\pm$  standard errors of the means of data from three independent experiments performed in triplicate. (B) Reverse genetics for the NP mutant viruses MOPV<sub>ExoN3</sub>, MOPV<sub>ExoN5</sub>, and MOPV<sub>ExoN6b</sub> and comparison of growth kinetics with those of MOPV<sub>WT</sub> and MOPV<sub>ExoN</sub> in Vero E6 cells. Infected-cell supernatants were collected and titrated as described in the legend of Fig. 1D. (C to F) MP were infected with MOPV<sub>WT</sub>, MOPV<sub>ExoN</sub>, and MOPV<sub>ExoN6b</sub> for 1 h; washed twice; and cultured in complete MP medium. (C and D) The supernatants of MP infected at an MOI of 0.1 were collected and titrated (C), and NP RNA was quantified from total RNA extracted from infected cells by using an in-house RT-qPCR assay (D). (E) MP infected at an MOI of 1 were stained 48 h after infection for cell surface expression of the CD40, CD80, and CD86 activation markers before analysis by flow cytometry. (F) RT-qPCR quantification of IFN- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2, and - $\beta$  mRNA levels in mock-infected MP and MP infected at an MOI of 1, 24 h after infection, normalized to GAPDH mRNA levels, as described in the legend of Fig. 2C. The results represent the means  $\pm$  standard errors of the means of data collected from three different donors. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

ORF to the WT (27). The selected mutations were first introduced into an HA-tagged MOPV NP expression plasmid, and their capacity to block the IRF3-driven response to SeV infection in HEK293T cells was measured. All mutated NP had similar expression profiles, regardless of the number of mutations of the ExoN active site (Fig. 3A). WT MOPV NP inhibited 95% of FF-Luc IRF3-dependent induction, whereas all other mutants had at least a 10-fold decrease in ExoN activity (Fig. 3A). We then introduced these mutations into the NP ORF of the MOPV S segment, and the corresponding viruses were rescued. The ExoN4, ExoN6a, and ExoN7 mutant viruses were discontinued, as they had low titers and delayed kinetics incompatible with further studies. The ExoN3, ExoN5, and ExoN6b variants had titers, growth kinetics, and plaque phenotypes in Vero E6 cells that were similar to those of MOPV<sub>ExoN</sub> (Fig. 3B).

The MOPV<sub>ExoN6b</sub> variant was selected for further analysis, as it contained the highest number of mutations. We investigated its capacity to replicate and induce an immune response in MP. MP were infected at an MOI of 0.1, and cell culture supernatants were titrated. Similar to MOPV<sub>ExoN</sub>, MOPV<sub>ExoN6b</sub> was not released from infected MP, in contrast to MOPV<sub>WT</sub> (Fig. 3C). Quantification of viral RNA in infected MP showed an increase in viral RNA copy numbers for MOPV<sub>WT</sub> starting 24 h after infection. In contrast, the viral RNA content in MOPV<sub>ExoN</sub>- and MOPV<sub>ExoN6b</sub>-infected cells decreased throughout the experiment (Fig. 3D). We monitored the cell surface activation markers CD40, CD80, and CD86 after infection at an MOI of 1. Both MOPV<sub>ExoN</sub> and MOPV<sub>ExoN6b</sub> promoted enhanced numbers of CD40- and CD80-positive MP compared to MOPV<sub>WT</sub>, but only CD80 expression was significantly increased between WT and mutated MOPV ( $P < 0.01$ ). CD86 was highly upregulated in infected MP relative to mock-infected cells for all three viruses ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3E). The type I IFN response of infected MP was 1,000- to 10,000-fold greater than that in noninfected MP for all three viruses (Fig. 3F). MOPV<sub>ExoN6b</sub> showed the same growth characteristics as those of MOPV<sub>ExoN</sub>, despite the four additional mutations being introduced into the ExoN active site of the NP. Both viruses were unable to replicate in MP but promoted stronger activation than did the WT virus and a comparable type I IFN response. We thus propose the use of hyperattenuated MOPV<sub>ExoN6b</sub> with the reinforced knockout of ExoN activity, as a platform for the design of vaccine candidates against pathogenic arenaviruses and name it "MOPEVAC."

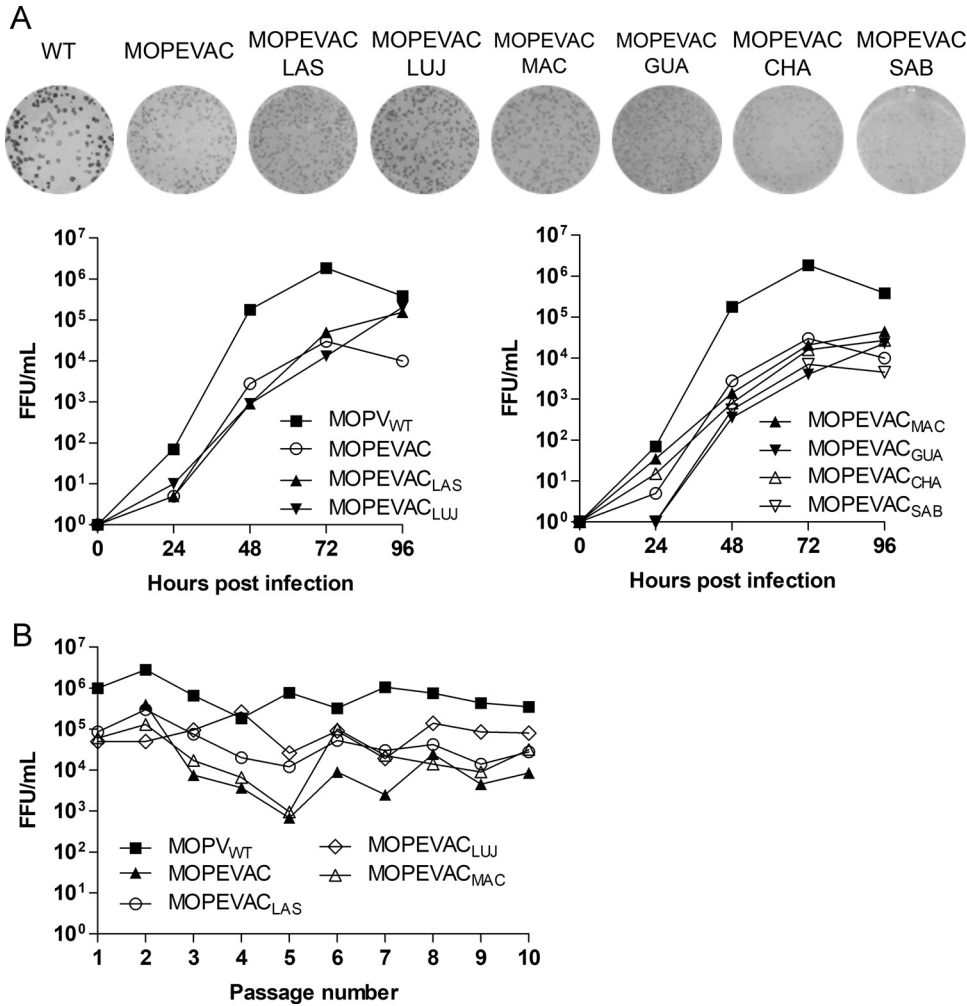
**Swapping the GPC ORF of LASV and MOPV to generate a vaccine specific for Lassa fever.** In order to use GPC of pathogenic arenaviruses as specific antigens for immune activation in the MOPEVAC backbone, we investigated whether the envelopes of MOPV and LASV might be involved in virulence. We modified the S segments of both viruses and used reverse genetics to generate MOPV expressing GPC of LASV (MOPV<sub>GPC LASV</sub>) and LASV expressing GPC of MOPV (LASV<sub>GPC MOPV</sub>) (Fig. 4A). We first analyzed their replication along with those of their WT counterparts in Vero E6 cells and found that all four viruses had similar titers and growth kinetics, reaching a plateau 3 days after infection. Only LASV<sub>GPC MOPV</sub> showed a slight delay 24 h after infection relative to the other viruses (Fig. 4B). We then used these viruses to infect MP at an MOI of 1 and quantified the type I IFN response by reverse transcription-quantitative PCR (qRT-PCR) 24 h after infection (Fig. 4C). We confirmed that MOPV<sub>WT</sub> is more immunogenic than LASV<sub>WT</sub>, as type I IFN mRNA levels induced by MOPV were higher than those induced by LASV. The GPC chimeric viruses induced type I IFN mRNA levels comparable to those of their respective WT counterparts. Our results provide direct evidence that GPC does not play a role in the control of the type I IFN response in MP.

**MOPEVAC as a vaccine platform for pathogenic Old World and New World arenaviruses.** Based on the use of the MOPEVAC platform, we developed a common strategy to produce vaccines against pathogenic arenaviruses. A GPC-deleted version of the MOPV<sub>ExoN6b</sub> S segment was generated for the direct insertion of the GPC ORF of related pathogenic Old World or New World arenaviruses (Fig. 5A). We generated six chimeric MOPV<sub>ExoN6b</sub> expressing GPC from LASV, Lujo virus (LUJV), Machupo virus (MACV), Guanarito virus (GUAV), Chapare virus (CHAV), and Sabia



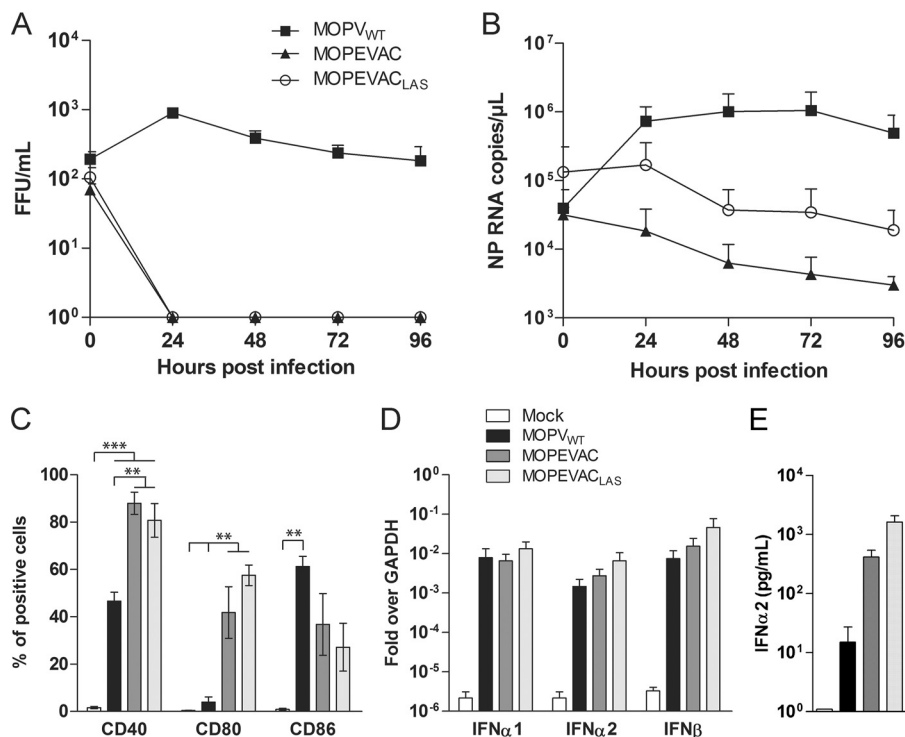
**FIG 4** GPC of LASV and MOPV are not involved in the type I IFN response. (A) Schematic representation of the GPC-deleted version of the LASV or MOPV S segments used to generate the chimeric viruses MOPV<sub>GPC LASV</sub> and LASV<sub>GPC MOPV</sub>. (B) Growth kinetics of the recombinant viruses MOPV<sub>WT</sub>, MOPV<sub>GPC LASV</sub>, LASV<sub>WT</sub>, and LASV<sub>GPC MOPV</sub> in Vero E6 cells infected at an MOI of 0.01. Supernatants of infected cells were titrated as described above. (C) RT-qPCR quantification of IFN- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2, and - $\beta$  mRNA levels in mock-infected MP and MP infected at an MOI of 1, 24 h after infection, normalized to GAPDH mRNA levels. Results represent the means  $\pm$  standard errors of the means of data collected from three different donors.

virus (SABV). The GPC chimeras of LASV (MOPEVAC<sub>LAS</sub>), LUJV (MOPEVAC<sub>LUJ</sub>), and MACV (MOPEVAC<sub>MAC</sub>) had plaque phenotypes, titers, and growth rates similar to those of the parental MOPEVAC in Vero E6 cells (Fig. 5A). The GPC chimeras of GUAV (MOPEVAC<sub>GUAV</sub>), CHAV (MOPEVAC<sub>CHA</sub>), and SABV (MOPEVAC<sub>SAB</sub>) had 5- to 10-fold-lower titers and smaller-plaque phenotypes (Fig. 5A, right). To assess their stability, MOPEVAC, MOPEVAC<sub>LAS</sub>, MOPEVAC<sub>LUJ</sub>, and MOPEVAC<sub>MAC</sub> were passaged iteratively up to 10 times in Vero E6 cells at an MOI of 0.01. The titers of the mutated viruses were compared with that of MOPV<sub>WT</sub> obtained under identical conditions (Fig. 5B). We observed a general decrease in the titers of all viruses from passage 2 to passage 5, which was more pronounced for MOPEVAC and MOPEVAC<sub>MAC</sub> than for the others. Except for MOPEVAC, all other viruses recovered titers similar to titers obtained at passage 1 from passages 6 to 10. We then investigated the stability of the genome of MOPV<sub>WT</sub>, MOPEVAC<sub>LAS</sub>, MOPEVAC<sub>LUJ</sub>, and MOPEVAC<sub>MAC</sub> throughout these passages. Viral RNA was extracted from stocks obtained at passages 1 and 5 and submitted to deep-sequencing analysis. The results showed an almost total coverage of the genome sequence, except for the intergenic region of the S segment, which is notably difficult



**FIG 5** Generation of a vaccine strain platform for arenaviruses based on attenuated recombinant MOPV. (A) Reverse-genetics strategy for the generation of MOPV<sub>ExoN6b</sub> expressing GPC of the pathogenic arenaviruses LASV, LUJV, MACV, GUAV, CHAV, and SABV. Passage 2 viruses were used to infect Vero E6 cells at an MOI of 0.01, and supernatants were collected and titrated. A representative example of the plaque phenotype of passage 2 viruses is shown. (B) Multiple passages of MOPV<sub>WT</sub>, MOPV<sub>ExoN6b</sub>, MOPV<sub>ExoN6b</sub> GPC LASV, MOPV<sub>ExoN6b</sub> GPC LUJV, and MOPV<sub>ExoN6b</sub> GPC MACV in Vero E6 cells. *De novo* stocks of all five viruses, from passage 1 to passage 10, were used to infect cells for 4 days at an MOI of 0.01.

to sequence because of the repeated sequences and secondary structures (data not shown). At passage 5, sequences were identical to the respective cloned sequences used for rescue, with no mutation in MOPV<sub>WT</sub> and only the ExoN mutations in the MOPEVAC-based viruses. All heterologous GPC sequences introduced into MOPEVAC were also identical to their respective sequences of reference. We did not detect the emergence of mutations in heterologous GPC or other regions of the MOPEVAC genome. Notably, we noted the presence of WT NP sequences in the first passages that likely originated from the residual presence of the pTM1-NP plasmid transfected at the time of rescue. However, 100% of the sequences were ExoN6b at passage 5. We then evaluated the ability of MOPEVAC<sub>LAS</sub> to activate the immune response in MP and compared it to those of MOPV<sub>WT</sub> and MOPEVAC. The kinetics of replication in MP after infection at an MOI of 0.1 showed that MOPEVAC<sub>LAS</sub> was unable to proliferate in MP, similarly to MOPEVAC and in contrast to MOPV<sub>WT</sub> (Fig. 6A). Viral RNA levels in cells infected with the MOPEVAC-based constructs slowly decreased during the course of the infection (Fig. 6B). Forty-eight hours after infection, 80% of MP infected with MOPEVAC and MOPEVAC<sub>LAS</sub> at an MOI of 1 expressed CD40 at their cell surface, a 2-fold increase compared to MOPV<sub>WT</sub>-infected MP ( $P < 0.01$ ). An 8- to 10-fold increase in the



**FIG 6** The MOPEVAC<sub>LAS</sub> strain is an effective activator of MP and the type I IFN response. MP were infected with MOPV<sub>WT</sub>, MOPV<sub>ExoN6b</sub>, or MOPV<sub>ExoN6b GPC LASV</sub> for 1 h, washed twice, and cultured in complete MP medium. (A) The supernatants of MP infected at an MOI of 0.1 were collected after infection for 4 days and titrated as described in Materials and Methods. (B) Total RNA was extracted from the cells, and NP RNA levels were quantified by using an in-house RT-qPCR assay. (C) Cell surface expression of CD40, CD80, and CD86 in mock-infected MP and MP infected at an MOI of 1, 48 h after infection. (D) Total RNA in MP infected at an MOI of 1 were collected 24 h after infection and DNase treated, and mRNA levels of IFN- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2, and - $\beta$  were quantified after oligo(dT) cDNA-driven RT and primer/probe PCR quantification (Applied Biosystems). The expression levels of all genes were normalized to GAPDH mRNA levels. The final results are expressed as fold induction relative to GAPDH. (E) Quantification of IFN- $\alpha$ 2 levels in supernatants of infected MP (MOI of 0.1) harvested 24 h postinfection by an ELISA. For panels C to E, results represent the means  $\pm$  standard errors of the means of data collected from three different donors. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

number of CD80-positive MP was observed for MOPEVAC- and MOPEVAC<sub>LAS</sub>-infected cells compared to MOPV<sub>WT</sub>-infected cells ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ). On the contrary, CD86 was expressed at the surface of fewer MOPEVAC- and MOPEVAC<sub>LAS</sub>-infected cells than in MOPV<sub>WT</sub>-infected MP ( $P < 0.01$ ) (Fig. 6C). The type I IFN response for the MOPEVAC-based constructs was similar to that for MOPV<sub>WT</sub>, which was at least 3 logs higher than those under mock conditions (Fig. 6D). The quantification of IFN- $\alpha$ 2 levels in the supernatants of the corresponding infected MP (MOI of 0.1) confirmed the robust induction observed at the mRNA level. We detected 27- and 108-fold more IFN- $\alpha$ 2 in the supernatants of MOPEVAC- and MOPEVAC<sub>LAS</sub>-infected cells, respectively, than in the supernatants of WT MOPV-infected MP (Fig. 6E). Taken together, our results show that MOPEVAC<sub>LAS</sub> induced cellular activation and a strong type I IFN response in infected MP similar to those induced by its parental MOPEVAC. Therefore, the GPC ORF present on the surface of our vaccine candidates does not modify their capacity to activate APC.

**A single shot of MOPEVAC<sub>LAS</sub> protects cynomolgus monkeys against LASV challenge.** To confirm the potential of our MOPEVAC<sub>LAS</sub> candidate as an effective vaccine against LASV, we immunized four cynomolgus monkeys with  $6 \times 10^6$  focus-forming units (FFU) 37 days before challenge with LASV (Josiah strain). Three animals were treated with an irrelevant vaccine and used as controls. A single dose of either vaccine was injected during the study. Following the subcutaneous injection of MOPEVAC<sub>LAS</sub>, we did not record any sign of clinical symptoms or viremia during the 37



**TABLE 1** Immunogenicity and efficacy of MOPEVAC<sub>LAS</sub> in LASV NHP challenge

Animal	Vaccine	MOPEVAC <sub>LAS</sub> -NAb titer <sup>a</sup>	% of CD8 <sup>+</sup> T cells producing TNF- $\alpha$ <sup>b</sup>	% of CD4 <sup>+</sup> T cells producing TNF- $\alpha$ <sup>b</sup>	Day of death
1	MeV Schwarz	Neg	Neg	Neg	12
2	MeV Schwarz	Neg	Neg	Neg	14
3	MeV Schwarz	Neg	Neg	Neg	15
4	MOPEVAC <sub>LAS</sub>	1:100	0.07 <sup>c</sup>	0.15	Survived
5	MOPEVAC <sub>LAS</sub>	1:250	0.05	0.11 <sup>d</sup>	Survived
6	MOPEVAC <sub>LAS</sub>	1:100	2.62	1.12	Survived
7	MOPEVAC <sub>LAS</sub>	1:100	0.37	0.39	Survived

<sup>a</sup>Fifty percent MOPEVAC<sub>LAS</sub>-neutralizing antibody (NAb) titers.

<sup>b</sup>Percentages of LASV GPC-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells producing TNF- $\alpha$  at day 21 postimmunization. Neg, negative.

<sup>c</sup>Percentage of LASV GPC-specific CD8<sup>+</sup> T cells producing TNF- $\alpha$  at day 30 postimmunization.

<sup>d</sup>Percentage of LASV GPC-specific CD4<sup>+</sup> T cells producing TNF- $\alpha$  at day 14 postimmunization.

days before challenge, except for low-grade fever observed for all animals on the day of immunization. Blood samples were collected at several time points, and the activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was measured after stimulation with LASV GPC-derived peptides. Our results showed that tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )-producing CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells were induced 14 days after immunization in most immunized animals in response to LASV GPC-derived peptides. In one animal, GPC-specific CD8<sup>+</sup> T cells were rather detected 30 days after immunization, while in another one, GPC-specific CD4 T cells circulated for 14 days postimmunization (Table 1). Importantly, neutralizing antibodies specific for MOPEVAC<sub>LAS</sub> were detected in the plasma of all immunized animals 23 days after immunization. Thus, a single shot of MOPEVAC<sub>LAS</sub> was able to induce both cellular and humoral immune responses against LASV.

All animals were then submitted to a challenge with LASV injected subcutaneously (1,500 FFU). The three control animals presented severe clinical signs, including fever, anorexia, prostration, and final hypothermia, and were killed at between days 12 and 15 after reaching the endpoint defined in the protocol. The four animals immunized with MOPEVAC<sub>LAS</sub> survived the challenge. Three animals presented a fever from days 5 to 10, while the temperature of the fourth animal remained within the normal range. No other symptoms were recorded throughout the course of the challenge. Our results showed that MOPEVAC<sub>LAS</sub> fully protects animals against a lethal challenge with LASV. Taken together, these results showed that our hyperattenuated MOPV-based LASV vaccine candidate is effective.

## DISCUSSION

The close relatedness of MOPV to LASV makes it a live-attenuated vaccine against LASV (5, 25, 28). However, the lack of a complete understanding of MOPV behavior in NHP and, more importantly, the lack of data concerning MOPV infection in humans impede its use as a vaccine against LASV. The reassorted virus ML29 allows the presentation of LASV GP1 and GP2 to the immune system, both of which are antigens that are known to be sufficient for protection against LASV (19, 28–31). Indeed, ML29 is highly immunogenic in NHP, and a single shot fully protects them against a lethal LASV challenge (31). The viability and attenuation profile of ML29 likely rely on the close relationship between both viruses, but such a strategy to generate vaccines for other pathogenic arenaviruses may not be extendable. Moreover, the prolonged presence of infectious material in blood and/or organs, including brain and lungs, after immunization and also the possibility of shedding through oral, rectal, and vaginal secretions make it difficult to cope with today's standard for human vaccine purposes (31). These results suggest that WT LASV ExoN activity renders ML29 capable of multiplying in monkey cells, thereby explaining the presence of infectious material weeks after immunization in NHP and an even higher level of viremia in immunocompromised NHP. Taken together, these results raise questions regarding the host control of this vaccine strain despite its efficacy (31, 32). Here, we developed a rationally designed

vaccine platform that is easily applicable to Old World and New World arenaviruses and quickly adaptable to new emerging viruses. Our approach is based on the modification of MOPV, which is possible by using a reverse-genetics system similar to the one that we developed for LASV (26). The ExoN activity located in the C-terminal domain of NP of LASV digests the dsRNA intermediates generated during viral replication, making its RNA less visible to retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and MDA5, the main cellular sensors involved in the type I IFN response induced by arenaviruses (22, 33). The DEDDH motif characteristics of this ExoN activity is conserved among arenaviruses, even in those not associated with pathogenicity in humans or NHP, including MOPV. We show here that the ExoN activity of MOPV is functional, is capable of digesting dsRNA, and inhibits type I IFN induction. We have not been able to compare the activity of MOPV ExoN with the one of LASV at the enzymatic level, but it seems that the increases of type I IFN mRNA synthesis in infected MP compared to the mock-infected counterparts are equivalent (about 3 logs) after the abrogation of LASV (26) and MOPV ExoN (this study) activities. However, the variations of type I IFN mRNA synthesis and IFN- $\alpha$ 2 release between MOPV or LASV and its ExoN-deficient counterpart are more elevated in the case of LASV (26). This result suggests that a more efficacious ExoN activity of LASV, fine-tuning of NP expression, the ability to interact and inhibit the cellular partner's activity, and/or other virulence factors may be responsible for the differences in type I IFN inhibition and pathogenicity between LASV and MOPV. A recent report suggested that the Z protein of LASV, but not that of MOPV, can bind RIG-I and MDA5 and suppress subsequent type I IFN induction (34). Moreover, LASV NP has been shown to bind I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ) and to inhibit the further phosphorylation of IRF3 (35). The ability of MOPV NP to bind this factor is not known, and no cellular partners have been identified so far. Finally, it was recently demonstrated that the polymerase of MOPV, but not that of LASV, is able to induce the activation of RIG-I and MDA5, probably through the synthesis of dsRNA (36). Altogether, these additional mechanisms may account for the differences in pathogenicity and immunogenicity between LASV and MOPV, thereby explaining the attenuation of ML29.

The ExoN mutation in MOPV<sub>ExoN</sub> induced attenuation in Vero E6 cells, which are unable to produce type I IFN, and completely impeded replication in human MP, in contrast to the WT virus. Furthermore, MOPV<sub>ExoN</sub> was more immunogenic than its WT counterpart in human MP, with a slight increase of type I IFN mRNA synthesis and a strong upregulation of surface activation molecules. The abrogation of the ExoN activity of NP gave rise to a hyperattenuated MOPV, which is immunogenic in APC but unable to replicate in these cells and constitutes the cornerstone for the development of our live-attenuated vaccine against LASV. The risk of reversion toward a WT genotype/phenotype during virus passages was considered, as the abrogation of the ExoN domain of MOPV<sub>ExoN</sub> relied on only two amino acid changes. Additional mutations targeting the residues involved in the catalytic site of the enzyme were introduced to circumvent this issue. We generated MOPV<sub>ExoN6b</sub>, in which the abrogation of ExoN activity relies on six amino acid changes, and found that this virus is stable and retained the same replication and immunogenic properties as those of the initial MOPV<sub>ExoN</sub>. This virus therefore constituted our vaccine backbone and was named MOPEVAC (Fig. 3).

Anti-GP immunity is mandatory for an arenavirus vaccine (19, 25). As this antigen has been shown to be sufficient to induce protective immunity, it would be unreasonable to use WT MOPV GPC as a heterologous antigen considering the wide array of circulating LASV strains (37). Previous studies suggested that GPC of New World arenaviruses may be involved in virulence (38–41). On the contrary, a large body of evidence arises from ML29 studies and argues against a role of LASV GPC in the virulence of LASV compared to MOPV. Indeed, no adverse effect has been observed after the inoculation of ML29, expressing LASV GPC, in guinea pigs or NHP (30, 31). To confirm that LASV GPC will not modify the virulence of MOPV, we assessed whether exchanging GPC of MOPV with that of LASV modifies the profile of the type I IFN response in ExoN mutant and WT viruses. Chimeric LASV and MOPV carrying GPC of the other virus had the same type I IFN response as their WT counterparts (Fig. 4C). These

results suggest that MOPEVAC will be a safe platform, regardless of the GPC encoded. The knockdown of the ExoN function abrogates effective replication within human APC, despite infection, thereby preventing any virulence from the expression of the viral envelope. Consequently, it is likely that this vector will not persist in the host and will be rapidly eliminated without spreading. This property is an important feature for an arenavirus-based vaccine, given the ability of some arenaviruses, such as LCMV, to induce persistent infection. We therefore swapped GPC of MOPV with GPC of Old World and New World arenaviruses known to induce VHF, thereby allowing the rescue of six potential vaccine candidates.

To demonstrate that MOPEVAC is a safe and immunogenic vaccine platform that is able to provide protection after a single shot, we performed a proof-of-concept experiment with MOPEVAC<sub>LAS</sub> in the relevant cynomolgus monkey model. Previous results demonstrated that MOPV can induce robust T-cell responses, including cytotoxic T cells, in an *in vitro* model for the induction of primary T-cell responses (10). We show here that the MOPEVAC<sub>LAS</sub> is able to generate robust humoral and T-cell responses within weeks following immunization. The LASV challenge succeeded with 100% protection in immunized animals, while all mock-treated animals were euthanized due to advanced LF symptoms. Further studies are still required to assess the complete potential of our MOPV-based vaccine platform. First, the safety of the MOPV backbone must be confirmed by investigating the presence or the absence of shedding and of sterilizing immunity in NHP. We also need to understand the molecular mechanisms that drive the antigen presentation of the MOPEVAC<sub>LAS</sub> live-attenuated virus for T- and B-cell activation. We detected the presence of neutralizing antibodies specific for MOPEVAC<sub>LAS</sub> in immunized NHP before challenge. This significant amount of neutralizing antibodies demonstrates that the vaccine has been able to induce a functional humoral response directed against LASV GPC. Also of note is the potency of MOPEVAC in inducing neutralizing antibodies, suggesting that this platform will probably be efficient against New World arenaviruses, given the role of neutralizing antibodies for the control of these viruses (42–45). The induction of humoral and cellular responses against MOPV NP and the possible cross-reactivity against LASV NP, as well as their role in the control of LASV infection in NHP, will be further addressed. Nevertheless, the ability of vaccine candidates based only on LASV GPC to provide full protection against LASV infection was demonstrated previously (19, 25), suggesting that the protective immunity induced by MOPEVAC<sub>LAS</sub> is probably mainly GPC mediated.

The specifications of an “ideal” vaccine against LASV, or other arenaviruses, would be (i) to induce T-cell responses, which are mandatory for protection; (ii) to be effective after a single inoculation, to facilitate vaccination programs in countries of endemicity and because ring vaccination is very useful for the control of outbreaks (46); (iii) to use homologous GPC, as this antigen is necessary and sufficient for protection; (iv) to be rapidly eliminated by the host and not persist; (v) to be genetically stable and safe; and (vi) to induce long-lasting protection. We believe that MOPEVAC<sub>LAS</sub> presents all these characteristics. Outbreaks of VHF due to arenaviruses occur mainly in rural areas with poor health care infrastructures and a limited ability for diagnosis. The human and economic consequences of these outbreaks are a major threat to public health and require an appropriate answer. Given the dynamics of the *Arenaviridae* family, with reports of newly identified viruses as well as the emergence of known *Arenaviridae* in areas where they have not been reported previously (exemplified by the recent outbreaks of LF in Benin and Togo), the most efficient means to combat these diseases is to immunize people at risk. One of the advantage of our platform-based vaccine approach is its versatility toward known arenaviruses and their genetic diversity but also toward these new viruses (47, 48). We have demonstrated that the MOPEVAC<sub>LAS</sub> vaccine showed promising results in the NHP model, and further investigations will be performed to confirm the complete efficacy, safety, and immunogenicity of our platform.

## MATERIALS AND METHODS

**Cells and viruses.** BHK7/9 cells were used to rescue recombinant viruses and were maintained as described previously (26). Vero E6 cells and HEK293T cells were grown in GlutaMAX Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 1% HEPES, and 0.5% penicillin-streptomycin. Blood samples were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS) (Lyon, France). Mononuclear cells were purified by Ficoll density gradient centrifugation (GE Healthcare). Monocytes were first separated from peripheral blood mononuclear cells by centrifugation on a cushion of 50% Percoll (GE Healthcare, Velizy, France) in phosphate-buffered saline (PBS) and then purified by using monocyte isolation kit II according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Paris, France). MP were obtained by incubating monocytes for 6 days in a solution containing RPMI, 10% FCS, and 10% autologous serum supplemented with 50 ng/ml of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). M-CSF was added every 2 days, and 40% of the culture medium was replaced. Strain AN21366 (GenBank accession numbers [JN561684](#) and [JN561685](#)) was used for infection and to establish the reverse-genetics system for MOPV. The LASV AV reverse-genetics system was described previously (26). The GPC ORF for LASV (strain Josiah; GenBank accession number [J04324](#)), LUJV (GenBank accession number [NC\\_012776](#)), MACV (GenBank accession number [AY619643](#)), GUAV (strain INH 95551; GenBank accession number [AY129247](#)), CHAV (GenBank accession number [NC\\_010562](#)), and SABV (GenBank accession number [NC\\_006317](#)) were used in this study. The DI-H4 strain of SeV was a gift from D. Garcin (University of Geneva, Switzerland).

**Plasmid constructs.** For exonuclease activity experiments, the regions spanning residues 365 to 570 of WT and D390A/G393A ExoN mutant MOPV NP were cloned in frame with the N-terminal cleavable thioredoxin-hexahistidine tag into the pETG20A expression vector (Gateway; Life Technologies, Carlsbad, CA). For the reverse-genetics system of MOPV, a four-plasmid strategy was used for virus rescue. The L and S segments of MOPV were reverse transcribed from viral RNA extracts, and the resulting cDNA was cloned into the pRF108 plasmid between mouse polymerase I (Pol-I) promoter/terminator signals. An extra nontemplated G base was included at the 5' end of the cloned sequences. The L and NP ORF were cloned into the pTM1 plasmid (T7 promoter/terminator signals) to support both the transcription and replication of the viral segments. To generate the S-segment-derived GPC chimera, GPC ORF-deleted versions of the plasmids encoding the S segments of either MOPV or LASV were generated with BsmBI restriction sites introduced downstream and upstream of the start and stop codons of the deleted ORF, respectively. The GPC ORF of heterologous arenaviruses were then cloned into the modified plasmids. For the SeV-dependent IRF3 activation reporter assay, MOPV NP with a C-terminal HA tag was expressed from the pHCMV plasmid. All mutations were introduced by using a site-directed mutagenesis strategy according to the manufacturer's instructions (Agilent). All plasmid constructs were verified by sequencing.

**Protein expression and exonuclease activity assay.** Transformed bacteria were grown in LB medium at 37°C to an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.5. Expression was induced with 0.5 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), and bacteria were grown at 17°C overnight after supplementation of the medium with  $ZnCl_2$  to 100  $\mu$ M. Cell pellets were frozen, stored at  $-80^\circ C$ , and then resuspended in a buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, and 5% glycerol, to which 0.04 mg/ml of DNase and 0.08 mg/ml of lysozyme had been added. The solution was lysed by using a sonicator, and the lysate was clarified by centrifugation at 20,000 rpm for 30 min at 4°C. The protein was first purified by cobalt affinity chromatography. To remove the fusion tag, the elution fraction containing the protein sample was cleaved with tobacco etch virus (TEV) and reapplied onto a second cobalt resin column. A final purification was performed by size exclusion chromatography (Superdex 75 column) in a solution containing 20 mM Tris (pH 7.5), 300 mM NaCl, 2 mM  $MnCl_2$ , and 5% glycerol. High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade synthetic 20-nucleotide (nt)-long RNA probes were purchased from Dharmacon (GE Healthcare) or Biomers (Ulm, Germany) and 5' labeled with [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP, using protein nucleotide kinase, according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, Ipswich, MA). In brief, standard reaction mixtures contained 0.25  $\mu$ M NP C-terminal domains, 5 mM  $MnCl_2$ , and 1.25  $\mu$ M radiolabeled dsRNA probe. Reactions were quenched at intervals with buffer containing formamide and EDTA (10 mM), and the samples were resolved by separation on a 20% polyacrylamide gel containing 8 M urea. Gels were exposed to a phosphor screen and visualized by using a FLA-300 phosphorimager (Fujifilm, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

**Virus rescue and titration.** The rescue procedure for the recombinant viruses was reported previously (26). Briefly,  $1 \times 10^6$  BHK7/9 cells were transfected with plasmids encoding NP and L, as well as S and L segments, by using Fugene HD (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Supernatants of the BHK7/9 cells constituted the seed stock used to infect Vero E6 cells. Virus from this first passage was titrated and used to infect Vero E6 cells at an MOI of 0.01. Titrated viruses from the second passages in Vero E6 cells provided the viral stocks for all other experiments. The absence of mycoplasma contamination was confirmed for all viral stocks. For neutralization experiments, Vero E6 cells were infected with 50 to 60 FFU/well of MOPEVAC<sub>LAS</sub> incubated previously for 1 h at 37°C with serial dilutions of NHP plasma samples (starting 1/40 to 1/1,500). For viral titration, cells were fixed with formaldehyde (FA) and permeabilized with PBS-0.1% Triton X-100 prior to the revelation of the presence of virus by immunostaining with a polyclonal rabbit antibody that recognizes either the LASV or the MOPV Z protein (Agrobio, France), a phosphatase alkaline-conjugated polyclonal goat anti-rabbit antibody (Sigma), and the 1-Step Nitro Blue Tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/BCIP) substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Results are expressed in FFU per milliliter.

**Quantitative RNA analysis.** For RT-qPCR experiments, total RNA was isolated from mock-infected or infected cells by using the RNeasy minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's

instructions, and a supplementary DNase step was added using the Turbo DNA-free kit (Ambion; Thermo Fisher Scientific). Synthesis of cDNA was performed by using SuperScript III, and amplification was performed by using the gene expression master mix kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). For type I IFN, the primer/probe mix was developed in-house (9). Runs of qPCR assays were performed with a LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France). The expression levels of all genes were standardized to that of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene and expressed as fold induction relative to GAPDH. For viral RNA quantification, an RNA probe of the region spanning bp 771 to 934 of the NP ORF was cloned into the pGEM vector (Promega) to generate T7 polymerase-driven transcripts. The RNA probe was DNase treated, purified, and quantified (Dropsense96; Trinean, Ghent, Belgium). Quantitative PCR for viral RNA was performed with the EuroBioGreen Lo-ROX qPCR mix (Eurobio, Les Ulis, France), using primers 5'-CTTCCCTGGCGTGCA-3' and 5'-GAATTTGAA GGCTGCCTGA-3'.

**Detection of IFN- $\alpha$ 2 in supernatants of macrophages.** The IFN- $\alpha$ 2 level in the supernatants of macrophages was quantified by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) matched-pair antibodies (IFN- $\alpha$  human ELISA kit; Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

**Deep-sequencing analysis of viral genomes.** Purified RNAs were treated with 6 U Turbo DNase (Ambion) to digest contaminating DNA. First- and second-strand cDNA syntheses were conducted with random hexamer primers using SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) and 5 U Klenow fragment (New England Biolabs), respectively. Finally, double-stranded cDNAs were purified with the MinElute PCR purification kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Libraries were prepared by using the NEBNext fast DNA fragmentation and library prep for Ion Torrent. Size selection using AMPure XP beads (Agencourt, Beckman Coulter, Brea, CA) to obtain 200-bp reads was performed, and 14 to 20 cycles of amplification were done. Finally, the enriched libraries were purified with Agencourt AMPure XP beads. The 2100 bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA) and the high-sensitivity DNA kit (Agilent) were used to determine the quality and concentration of the libraries. Sequencing was performed by using the Personal Genome Machine (PGM) Ion Torrent technology. Emulsion PCR and enrichment steps were carried out by using the Ion PGM Hi-Q OT2 kit. Sequencing was undertaken by using a 318v2 chip and the Ion PGM Hi-Q sequencing kit according to the manufacturer's instructions. Automated read data sets provided by Torrent software suite 5.0 were trimmed according to the quality score (99%) and length (reads of <75 bp were removed). Trimmed fastq files were then mapped onto a reference genome using bowtie2 and filtering to remove PCR duplicates (Picard tools). Finally, variants were called by using SAMtools mpileup and varscan 2.3.6. Tables of nucleotide frequencies generated were then used to call the consensus genome in fasta format with a custom python script.

**Flow cytometry for MP activation and LASV-specific T-cell activation.** Mock-infected MP and MP infected at an MOI of 1 were detached 48 h after infection, saturated with human IgG, and surface stained with antibodies to CD40, CD80, and CD86 (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France) before final fixation in PBS-1% paraformaldehyde (PFA). During the NHP challenge, LASV antigen-specific T cells from fresh whole blood incubated with a pool of overlapping GPC peptides in the presence of CD28 and CD49d antibodies (2  $\mu$ g/ml) and brefeldin A (10  $\mu$ g/ml) for 6 h at 37°C were analyzed. Staphylococcal enterotoxin A (SEA) (1  $\mu$ g/ml) or PBS was used as the positive or negative control, respectively, for activation. Peptides are 15-mer long (1  $\mu$ g/ml each), with an overlap of 11 residues, and spanned the complete GPC ORF of the LASV Josiah strain. PBS-20 mM EDTA was added to samples before cell surface staining for CD3, CD4, and CD8 (BD Biosciences). Red blood cells were then lysed by using PharmLyse (BD Biosciences). Cells were then fixed and permeabilized for intracellular staining with antibodies to TNF- $\alpha$  (BioLegend). Cells were analyzed by flow cytometry using an LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed by using Kaluza software (Beckman Coulter).

**Cynomolgus monkey challenge with LASV.** Briefly, a group of 4 male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*; 31 to 38 months of age and 3.2 to 4 kg) were immunized in biosafety level ABSL2 facilities (SILABE, Strasbourg, France) by the intramuscular injection of  $6 \times 10^6$  FFU of MOPEVAC<sub>LASV</sub>. Another group of 3 monkeys was immunized with measles virus (MeV) vaccine strain Schwarz, as an irrelevant vaccine. Blood draws were performed at 2 weeks postimmunization in order to assess T-cell responses against LASV GP. After 5 weeks, monkeys were transported to biosafety level 4 (BSL4) facilities (Laboratoire P4-INSERM Jean Mériéux) and challenged subcutaneously by using 1,500 FFU of the LASV Josiah strain. Animals were monitored for clinical signs of disease and euthanized according to scoring made based on body temperature, body weight, feeding, hydrating, behavior, and clinical signs. All animals still alive at 29 days postchallenge were euthanized according to validated experimental procedures. This study was approved by the Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (APAFIS 6543-20160826144775) and by the Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale Rhône Alpes (CECCAPP 20161110143954).

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed by using SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA, USA) and GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with a Bonferroni posttest.

## ACKNOWLEDGMENTS

All experiments using LASV, LASV<sub>GPC MOPV</sub>, and MOPV<sub>GPC LASV</sub> were carried out in the Laboratoire Jean Mériéux-INSERM BSL4 facility. We are grateful to the BSL4 team members for support while performing the experiments. We thank R. Flick and M. Bouloy for providing the pRF108 and pTM1 plasmids and BHK7/9 cells. p55C1B-Luc was kindly provided by T. Fujita (Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto,

Japan) and Luiz Martinez-Sobrido (University of Rochester, Rochester, NY, USA). We also thank D. Garcin (University of Geneva, Switzerland) for providing the DI-H4 strain of Sendai virus. We thank C. Clegg and G. Lloyd (Public Health England, Porton Down, Salisbury, United Kingdom) for the gift of MOPV; S. Becker for providing us with the AV strain of LASV; M. Bouloy for the tools used to develop the LASV and MOPV reverse-genetics systems; T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, and P. Jahrling for LASV monoclonal antibodies; and the Etablissement Français du Sang for providing human blood.

This work was supported by the Fondation pour l'Innovation en Infectiologie (FINOVI) (Lyon, France), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (France), French National Research Agency grant ANR-11-BSV\_019-02, and the Fondation Méditerranée Infection. This work was also supported by Labex Ecofect (grant ANR-11-LABX-0048, Lyon University) within the program Investissements d'Avenir (grant ANR-11-IDEX-0007, French National Research Agency).

## REFERENCES

- McCormick JB, Webb PA, Krebs JW, Johnson KM, Smith ES. 1987. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J Infect Dis* 155:437–444. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.3.437>.
- Cummins D, McCormick JB, Bennett D, Samba JA, Farrar B, Machin SJ, Fisher-Hoch SP. 1990. Acute sensorineural deafness in Lassa fever. *JAMA* 264:2093–2096. <https://doi.org/10.1001/jama.1990.03450160063030>.
- Buchmeier MJ, de la Torre J-C, Peters CJ. 2007. *Arenaviridae: the viruses and their replication*, p 1791–1827. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Wulff H, McIntosh B, Hamner D, Johnson K. 1977. Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from Mastomys natalensis in south-east Africa. *Bull World Health Organ* 55:441–444.
- Kiley MP, Lange JV, Johnson KM. 1979. Protection of rhesus monkeys from Lassa virus by immunisation with closely related arenavirus. *Lancet* ii:738–745.
- Walker DH, Johnson KM, Lange JV, Gardner JJ, Kiley MP, McCormick JB. 1982. Experimental infection of rhesus monkeys with Lassa virus and a closely related arenavirus, Mozambique virus. *J Infect Dis* 146:360–368. <https://doi.org/10.1093/infdis/146.3.360>.
- Baize S, Kaplon J, Faure C, Pannetier D, Georges-Courbot MC, Deubel V. 2004. Lassa virus infection of dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *J Immunol* 172:2861–2869. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2861>.
- Pannetier D, Faure C, Georges-Courbot MC, Deubel V, Baize S. 2004. Human macrophages, but not dendritic cells, are activated and produce type I interferons in response to Mopeia virus infection. *J Virol* 78: 10516–10524. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10516-10524.2004>.
- Baize S, Pannetier D, Faure C, Marianneau P, Marendat I, Georges-Courbot MC, Deubel V. 2006. Role of interferons in the control of Lassa virus replication in human dendritic cells and macrophages. *Microbes Infect* 8:1193–1202. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.006>.
- Pannetier D, Reynard S, Russier M, Journeaux A, Tordo N, Deubel V, Baize S. 2011. Human dendritic cells infected with the non-pathogenic Mopeia virus induce stronger T-cell responses than with Lassa virus. *J Virol* 85:8293–8306. <https://doi.org/10.1128/JVI.02120-10>.
- Rieger T, Merkler D, Günther S. 2013. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072290>.
- Bergthaler A, Gerber NU, Merkler D, Horvath E, De la Torre J, Pinschewer DD. 2006. Envelope exchange for the generation of live-attenuated arenavirus vaccines. *PLoS Pathog* 2:e51. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020051>.
- Martínez-Sobrido L, de la Torre JC. 2017. Development of recombinant arenavirus-based vaccines, p 133–149. In Ferran MC, Skuse GR (ed), *Recombinant virus vaccines: methods and protocols*. Springer, New York, NY.
- Cheng BYH, Ortiz-Riaño E, Nogales A, de la Torre JC, Martínez-Sobrido L. 2015. Development of live-attenuated arenavirus vaccines based on codon deoptimization. *J Virol* 89:3523–3533. <https://doi.org/10.1128/JVI.03401-14>.
- Cheng BYH, Ortiz-Riaño E, de la Torre JC, Martínez-Sobrido L. 2015. Arenavirus genome rearrangement for the development of live attenuated vaccines. *J Virol* 89:7373–7384. <https://doi.org/10.1128/JVI.00307-15>.
- Cheng BYH, Nogales A, de la Torre JC, Martínez-Sobrido L. 2017. Development of live-attenuated arenavirus vaccines based on codon deoptimization of the viral glycoprotein. *Virology* 501:35–46. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.001>.
- Iwasaki M, Ngo N, Cubitt B, Teijaro JR, de la Torre JC. 2015. General molecular strategy for development of arenavirus live-attenuated vaccines. *J Virol* 89:12166–12177. <https://doi.org/10.1128/JVI.02075-15>.
- Iwasaki M, Cubitt B, Sullivan BM, de la Torre JC. 2016. The high degree of sequence plasticity of the arenavirus noncoding intergenic region (IGR) enables the use of a nonviral universal synthetic IGR to attenuate arenaviruses. *J Virol* 90:3187–3197. <https://doi.org/10.1128/JVI.03145-15>.
- Geisbert TW, Jones S, Fritz EA, Shurtleff AC, Geisbert JB, Liebscher R, Grolla A, Ströher U, Fernando L, Daddario KM, Guttieri MC, Mothé BR, Larsen T, Hensley LE, Jahrling PB, Feldmann H. 2005. Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med* 2:537–545. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020183>.
- Safronetz D, Mire C, Rosenke K, Feldmann F, Haddock E, Geisbert T, Feldmann H. 2015. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003736>.
- Regules JA, Beigel JH, Paolino KM, Voell J, Castellano AR, Hu Z, Muñoz P, Moon JE, Ruck RC, Bennett JW, Twomey PS, Gutiérrez RL, Remich SA, Hack HR, Wisniewski ML, Joselyn MD, Kwilas SA, Van Deusen N, Mbaya OT, Zhou Y, Stanley DA, Jing W, Smith KS, Shi M, Ledgerwood JE, Graham BS, Sullivan NJ, Jagodzinski LL, Peel SA, Alimonti JB, Hooper JW, Silvera PM, Martin BK, Monath TP, Ramsey WJ, Link CJ, Lane HC, Michael NL, Davey RT, Jr, Thomas SJ. 2017. A recombinant vesicular stomatitis virus Ebola vaccine. *N Engl J Med* 376:330–341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414216>.
- Reynard S, Russier M, Fizez A, Carnec X, Baize S. 2014. Exonuclease domain of the Lassa virus nucleoprotein is critical to avoid retinoic acid-inducible gene I signaling and to inhibit the innate immune response. *J Virol* 88:13923–13927. <https://doi.org/10.1128/JVI.01923-14>.
- Martínez-Sobrido L, Zuniga El, Rosario D, Garcia-Sastre A, de la Torre JC. 2006. Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 80:9192–9199. <https://doi.org/10.1128/JVI.00555-06>.
- Qi X, Lan S, Wang W, Schelde LM, Dong H, Wallat GD, Ly H, Liang Y, Dong C. 2010. Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* 468:779–785. <https://doi.org/10.1038/nature09605>.
- Fisher-Hoch SP, Hutwagner L, Brown B, McCormick JB. 2000. Effective vaccine for Lassa fever. *J Virol* 74:6777–6783. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.15.6777-6783.2000>.
- Carnec X, Baize S, Reynard S, Diancourt L, Caro V, Tordo N, Bouloy M. 2011. Lassa virus nucleoprotein mutants generated by reverse genetics induce robust type I interferon response in human dendritic cells and macrophages. *J Virol* 85:12093–12097. <https://doi.org/10.1128/JVI.00429-11>.
- Yekwa E, Khourieh J, Canard B, Papageorgiou N, Ferron F. 2017. Activity

- inhibition and crystal polymorphism induced by active-site metal swapping. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 73:641–649. <https://doi.org/10.1107/S205979831700866X>.
28. Fisher-Hoch SP, McCormick JB, Auferin D, Brown BG, Castor M, Perez G, Ruo S, Conaty A, Brammer L, Bauer S. 1989. 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* 86:317–321.
  29. Lukashevich IS. 1992. Generation of reassortants between African arenaviruses. *Virology* 188:600–605. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90514-P](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90514-P).
  30. Lukashevich IS, Patterson J, Carrion R, Moshkoff D, Ticer A, Zapata J, Brasky K, Geiger R, Hubbard GB, Bryant J, Salvato MS. 2005. A live attenuated vaccine for Lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia viruses. *J Virol* 79:13934–13942. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13934-13942.2005>.
  31. Lukashevich IS, Carrion R, Jr, Salvato MS, Mansfield K, Brasky K, Zapata J, Cairo C, Goicochea M, Hoosien GE, Ticer A, Bryant J, Davis H, Hammamieh R, Mayda M, Jett M, Patterson J. 2008. Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates. *Vaccine* 26:5246–5254. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.057>.
  32. Zapata JC, Poonia B, Bryant J, Davis H, Ateh E, George L, Crasta O, Zhang Y, Slezak T, Jaing C, Pauza CD, Goicochea M, Moshkoff D, Lukashevich IS, Salvato MS. 2013. An attenuated Lassa vaccine in SIV-infected rhesus macaques does not persist or cause arenavirus disease but does elicit Lassa virus-specific immunity. *J Virol* 87:1052. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-52>.
  33. Zhou S, Cerny AM, Zacharia A, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA, Finberg RW. 2010. Induction and inhibition of type I interferon responses by distinct components of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 84:9452–9462. <https://doi.org/10.1128/JVI.00155-10>.
  34. Xing J, Ly H, Liang Y. 2015. The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production. *J Virol* 89:2944–2955. <https://doi.org/10.1128/JVI.03349-14>.
  35. Pythoud C, Rodrigo WWSI, Pasqual G, Rothenberger S, Martínez-Sobrido L, de la Torre JC, Kunz S. 2012. Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKKε. *J Virol* 86:7728–7738. <https://doi.org/10.1128/JVI.00187-12>.
  36. Zhang L-K, Xin Q-L, Zhu S-L, Wan W-W, Wang W, Xiao G. 2016. Activation of the RLR/MAVS signaling pathway by the L protein of Mopeia virus. *J Virol* 90:10259–10270. <https://doi.org/10.1128/JVI.01292-16>.
  37. Andersen KG, Shapiro BJ, Matranga CB, Sealfon R, Lin AE, Moses LM, Folarin OA, Goba A, Ochiai I, Ehiane PE, Momoh M, England EM, Winnicki S, Branco LM, Gire SK, Phelan E, Tariyal R, Tewhey R, Omoniwa O, Fullah M, Fonnies R, Fonnies M, Kanneh L, Jalloh S, Gbakie M, Saffa S, Karbo K, Gladden AD, Qu J, Stremmlau M, Nekoui M, Finucane HK, Tabrizi S, Vitti JJ, Birren B, Fitzgerald M, McCowan C, Ireland A, Berlin AM, Bochicchio J, Tazon-Vega B, Lennon NJ, Ryan EM, Bjornson Z, Milner DA, Jr, Lukens AK, Broodie N, Rowland M, Heinrich M, Akdag M, et al. 2015. Clinical sequencing uncovers origins and evolution of Lassa virus. *Cell* 162:738–750. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.020>.
  38. Seregin AV, Yun NE, Miller M, Aronson J, Smith JK, Walker AG, Smith JN, Huang C, Manning JT, de la Torre JC, Paessler S. 2015. The glycoprotein precursor gene of Junin virus determines the virulence of the Romero strain and the attenuation of the Candid #1 strain in a representative animal model of Argentine hemorrhagic fever. *J Virol* 89:5949–5956. <https://doi.org/10.1128/JVI.00104-15>.
  39. Kumar N, Wang J, Lan S, Danzy S, McLay Schelde L, Seladi-Schulman J, Ly H, Liang Y. 2012. Characterization of virulence-associated determinants in the envelope glycoprotein of Pichinde virus. *Virology* 433:97–103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.07.009>.
  40. Albariño CG, Bird BH, Chakrabarti AK, Dodd KA, Flint M, Bergeron É, White DM, Nichol ST. 2011. The major determinant of attenuation in mice of the Candid1 vaccine for Argentine hemorrhagic fever is located in the G2 glycoprotein transmembrane domain. *J Virol* 85:10404–10408. <https://doi.org/10.1128/JVI.00856-11>.
  41. Golden JW, Maes P, Kwilas SA, Ballantyne J, Hooper JW. 2016. Glycoprotein-specific antibodies produced by DNA vaccination protect guinea pigs from lethal Argentine and Venezuelan hemorrhagic fever. *J Virol* 90:3515–3529. <https://doi.org/10.1128/JVI.02969-15>.
  42. Mahmutovic S, Clark L, Levis SC, Briggiler AM, Enria DA, Harrison SC, Abraham J. 2015. Molecular basis for antibody-mediated neutralization of New World hemorrhagic fever mammarenaviruses. *Cell Host Microbe* 18:705–713. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.11.005>.
  43. Brouillette RB, Phillips EK, Ayithan N, Maury W. 2017. Differences in glycoprotein complex receptor binding site accessibility prompt poor cross-reactivity of neutralizing antibodies between closely related arenaviruses. *J Virol* 91:e01454-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01454-16>.
  44. Zeltina A, Krumm SA, Sahin M, Struwe WB, Harlos K, Nunberg JH, Crispin M, Pinschewer DD, Doores KJ, Bowden TA. 2017. Convergent immunological solutions to Argentine hemorrhagic fever virus neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:7031–7036. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702127114>.
  45. Zeitlin L, Geisbert JB, Deer DJ, Fenton KA, Bohorov O, Bohorova N, Goodman C, Kim D, Hiatt A, Pauly MH, Velasco J, Whaley KJ, Altmann F, Gruber C, Steinkellner H, Honko AN, Kuehne AI, Aman MJ, Sahandi S, Enterlein S, Zhan X, Enria D, Geisbert TW. 2016. Monoclonal antibody therapy for Junin virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:4458–4463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600996113>.
  46. Henao-Restrepo AM, Camacho A, Longini IM, Watson CH, Edmunds WJ, Egger M, Carroll MW, Dean NE, Diatta I, Doumbia M, Draguez B, Durafour S, Enwere G, Grais R, Gunther S, Gsell P-S, Hossmann S, Wattle SV, Kondé MK, Kéita S, Kone S, Kuisma E, Levine MM, Mandal S, Maugé T, Norheim G, Riveros X, Soumah A, Trelle S, Vicari AS, Røttingen J-A, Kieny M-P. 2017. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *Lancet* 389:505–518. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32621-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32621-6).
  47. Blasdel KR, Duong V, Eloit M, Chretien F, Ly S, Hul V, Deubel V, Morand S, Buchy P. 2016. Evidence of human infection by a new mammarenavirus endemic to Southeastern Asia. *Elife* 5:e13135. <https://doi.org/10.7554/eLife.13135>.
  48. Gryseels S, Rieger T, Oestereich L, Cuypers B, Borremans B, Makundi R, Leirs H, Günther S, Goüy de Bellocq J. 2015. Gairo virus, a novel arenavirus of the widespread *Mastomys natalensis*: genetically divergent, but ecologically similar to Lassa and Morogoro viruses. *Virology* 476:249–256. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.011>.

# High Dengue Burden and Circulation of 4 Virus Serotypes among Children with Undifferentiated Fever, Kenya, 2014–2017

Melisa M. Shah, Bryson A. Ndenga, Francis M. Mutuku, David M. Vu, Elyse N. Grossi-Soyster, Victoria Okuta, Charles O. Ronga, Philip K. Chebii, Priscilla Maina, Zainab Jembe, Carren M. Bosire, Jael S. Amugongo, Malaya K. Sahoo, ChunHong Huang, Jenna Weber, Sean V. Edgerton, Jimmy Hortion, Shannon N. Bennett, Benjamin A. Pinsky, A. Desiree LaBeaud

Little is known about the extent and serotypes of dengue viruses circulating in Africa. We evaluated the presence of dengue viremia during 4 years of surveillance (2014–2017) among children with febrile illness in Kenya. Acutely ill febrile children were recruited from 4 clinical sites in western and coastal Kenya, and 1,022 participant samples were tested by using a highly sensitive real-time reverse transcription PCR. A complete case analysis with genomic sequencing and phylogenetic analyses was conducted to characterize the presence of dengue viremia among participants during 2014–2017. Dengue viremia was detected in 41.9% (361/862) of outpatient children who had undifferentiated febrile illness in Kenya. Of children with confirmed dengue viremia, 51.5% (150/291) had malaria parasitemia. All 4 dengue virus serotypes were detected, and phylogenetic analyses showed several viruses from novel lineages. Our results suggests high levels of dengue virus infection among children with undifferentiated febrile illness in Kenya.

Dengue virus (DENV) is a reemerging arbovirus with an expansive worldwide range (1). Recent modeling studies suggest wider dengue circulation in Africa than previously recognized (2). In addition, both major dengue vectors (*Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes) are present in Africa (3,4). The true burden of dengue is likely underestimated because most infections are never accounted for among patients who have self-limited disease or are misdiagnosed as malaria (2).

Dengue viremia among returning travelers from Africa and scattered reports from individual countries suggest ongoing dengue circulation in Africa (2). Each DENV serotype (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4) is structured into major lineages referred to as genotypes which have been defined (5–7). Relatively few DENV sequences are available from Africa (Figure 1), and DENV-2 is the predominant serotype in Africa to date (2).

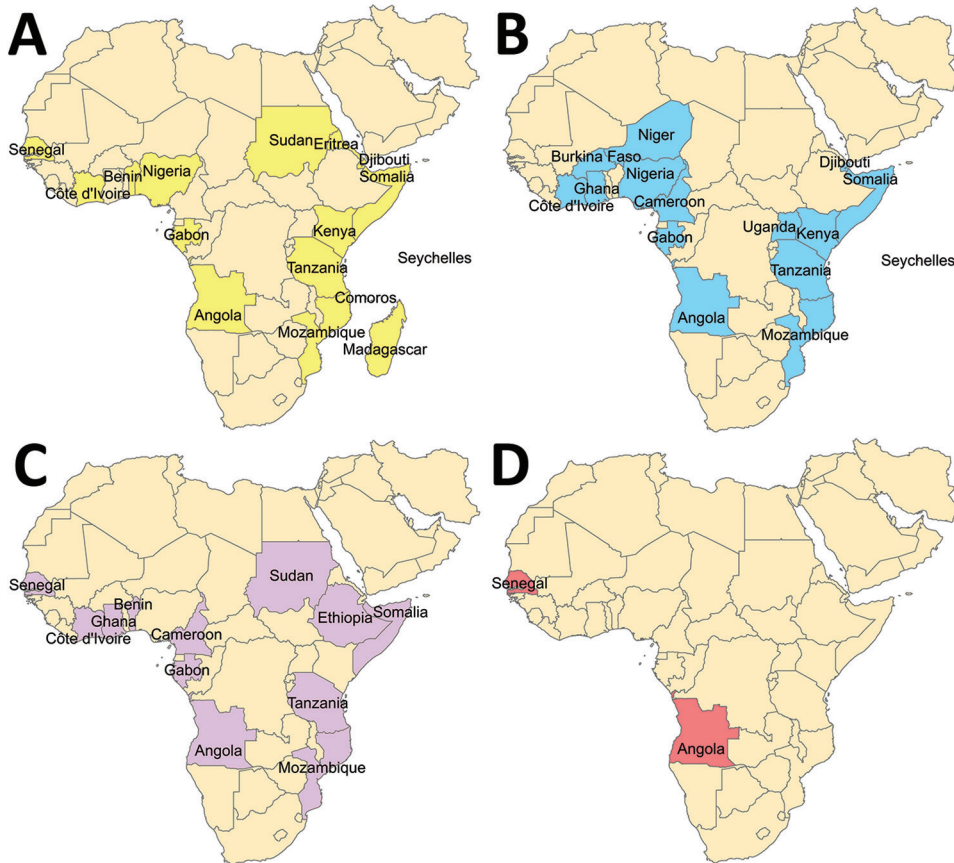
Isolation of DENV-1 and DENV-2 in Africa was made in Nigeria during 1968 (8). The first DENV-3 strains isolated from humans from Africa were reported from Mozambique during 1984 (9). Only 2 human DENV-4 sequences are publicly available from Africa, 1 from Senegal during 1986 and 1 from Angola during 2014 (10).

A laboratory-confirmed outbreak of dengue occurred in coastal Kenya during 1982, followed by a large dengue outbreak in northeastern Kenya during 2011 (11,12). Circulation of DENV-1, DENV-2, and DENV-3 was reported in northern and coastal Kenya during 2011–2014 (13).

Author affiliations: Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA (M.M. Shah, D.M. Vu, E.N. Grossi-Soyster, M.K. Sahoo, C. Huang, J. Weber, J. Hortion, B.A. Pinsky, A.D. LaBeaud); Kenya Medical Research Institute, Kisumu, Kenya (B.A. Ndenga, V. Okuta, C.O. Ronga); Technical University of Mombasa, Mombasa, Kenya (F.M. Mutuku, C.M. Bosire, J.S. Amugongo); Msambweni County Referral Hospital, Msambweni, Kenya (P.K. Chebii, P. Maina); Diani Health Center, Ukunda, Kenya (Z. Jembe); California Academy of Sciences, San Francisco, California, USA (S.V. Edgerton, S.N. Bennett); École Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France (J. Hortion)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2611.200960>





**Figure 1.** Countries in Africa (indicated by colors) for which dengue virus (DENV) sequences isolated from humans are available in GenBank. A) DENV-1, B) DENV-2, C) DENV-3, D) DENV-4. Further details on search strategy used for this map are available in Appendix Table 2 (<https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/26/11/20-0960-T2.App1.pdf>).

Given the mounting evidence for dengue in Africa, we evaluated the presence of dengue viremia during 4 years of surveillance (2014–2017) among children with febrile illness in coastal and western Kenya by using a highly-sensitive, multiplexed, real-time reverse transcription PCR (rRT-PCR) and genomic sequencing. We report the clinical manifestations, associated factors, serotypes, and phylogenetic relationships.

## Methods

### Study Sites and Enrollment

Children in Kenya who had undifferentiated febrile illness from 4 outpatient clinics located in Chulaimbo, Kisumu, Msambweni, and Ukunda were enrolled during January 24, 2014–August 15, 2017 (Figure 2). The clinics in Chulaimbo (a rural setting) and Kisumu (an urban setting) are located near Lake Victoria in western Kenya. Msambweni District Hospital (a rural setting) and Ukunda/Diani Health Centre (an urban setting) are located in coastal Kenya. All clinics are operated by the Kenyan Ministry of Health. Each child 1–17 years of age who came for care (Monday–Friday) because of an acute febrile illness (defined as reported illness during the previous 14 days and current observed temper-

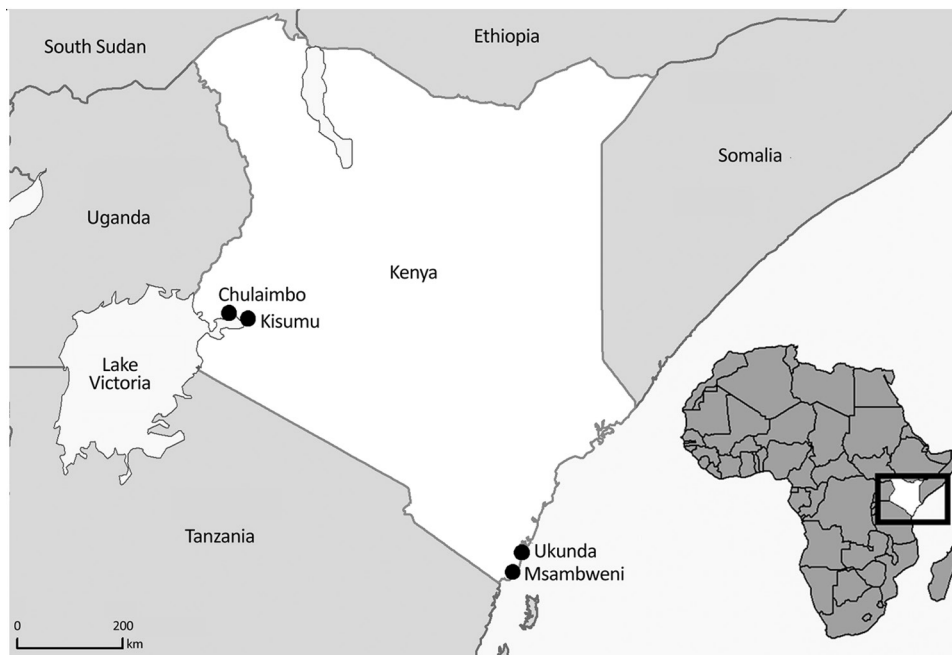
ature  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) and no localizing symptoms were recruited. Participants or their parents/guardians provided consent. We obtained detailed clinical histories and performed physical examinations. Comprehensive demographic and household data were recorded. Blood from each of the study participants was collected for serologic analysis, molecular testing, and malaria parasite smear. Data were stored in REDCap (14).

### RNA Extraction and cDNA Synthesis

An aliquot of whole blood from each participant was collected in Kenya. RNA was extracted by using the GeneJET RNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com>), and purified RNA was synthesized into complementary DNA (cDNA) by using the Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturers' instructions. All samples, including serum and cDNA, were shipped on dry ice and maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  once received at Stanford University.

### RT-PCR and Envelope Gene Sequencing

PCR was performed at the Stanford Clinical Virology Laboratory. The rRT-PCRs used in this study, including



**Figure 2.** Study recruitment sites (black dots) for dengue burden and circulation of 4 virus serotypes among children with undifferentiated fever, Kenya, 2014–2017. Inset map shows location of Kenya in Africa.

a pan-DENV assay that detects all serotypes but does not distinguish between them, and a DENV serotyping assay, have been described (15,16). The pan-DENV assay uses primers and probes targeting RNaseP, which serves as an internal control. Specimens negative for DENV RNA with an internal control cycle threshold value  $>45$  were considered to have failed extraction, cDNA generation, or PCR. Samples with cycle thresholds  $<35$  by the pan-DENV assay or serotype-specific assay underwent sequencing attempts.

On the basis of the serotypes identified by rRT-PCR, serotype-specific envelope gene primers were used to generate amplicons for sequencing (Appendix Table 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/26/11/20-0960-App1.pdf>). Each 25- $\mu$ L reaction contained LongAmp Hot Start Taq 2 $\times$  Master Mix (New England BioLabs, <https://www.neb.com>), 400 nmol/L of forward and reverse primers, 3% dimethyl sulfoxide, and 5  $\mu$ L of cDNA. Amplification was performed in an Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific) by using the following cycling parameters: 94°C for 2 min; 40 cycles of 94°C for 30 s, 70°C for 1 s (ramp rate 20%), 55°C for 45 s (ramp rate 20%), and 65°C for 3 min, 20 s; and final extension for 10 min at 65°C. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide. Dideoxynucleotide chain-termination sequencing (Sanger) was performed by Elim Biopharmaceuticals (<https://www.elimbio.com>) using the same primers used for amplification.

### Whole-Genome Sequencing

Whole-genome sequencing was performed on a subset of convenience samples at the California Academy of Sciences' Center for Comparative Genomics (<https://www.calacademy.org>). cDNA was purified by using the Zymo Clean and Concentrator Kit (Zymo Research, <https://www.zymoresearch.com>). Library preparation was performed by using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (96 samples) and the Nextera XT Index Kit (96 indices, 384 samples) (both from Illumina, <https://www.illumina.com>) according to manufacturer's instructions with modifications: 3 ng of input cDNA with 4  $\mu$ L index was used per reaction (rather than the suggested 1 ng input with 5  $\mu$ L index because of low cDNA concentrations). Samples were tagged with a molecular identification tag. Libraries were quantified and assessed for quality on a BioAnalyzer (Agilent, <https://www.agilent.com>) before equimolar pooling for sequencing on the Illumina MiSeq platform using reagent run kits in series Nano, V2, and V3. Raw reads were uploaded by using CLC Genomics Workbench version 7.0.3 (<https://www.qiagen.com>) after being sorted by sample. DENV sample reads were mapped to complete, reference genome sequences downloaded from GenBank for each serotype. Virus consensus sequences were extracted in CLC Genomics Workbench version 7.0.3 and exported for phylogenetic analyses.

### Serologic Tests

Serum samples obtained at each patient visit were tested by using an indirect IgG ELISA for flavivirus

IgG (17). An ELISA result positive for DENV IgG in serum was indicative of previous exposure. Participants who had DENV IgG at the febrile visit were identified as having past exposure to dengue. All samples were tested in duplicate.

### Phylogenetic Analysis and Consensus Generation

Consensus sequences were deposited in GenBank under accession nos. MT076932–62. Multiple sequence alignment of both partial and complete genome sequences was performed by using the Multiple Alignment and Fast Fourier Transform plug-in in Geneious Prime 2020.0.5 (<https://www.geneious.com>). Reference genomes were selected to represent all genotype lineages and wide sampling of time periods focusing on sequences from Africa. To classify taxa, a maximum likelihood tree supported with maximum likelihood bootstrap replicates was inferred by using RAXML (<https://raxml-ng.vital-it.ch>) for each dengue serotype. Bootstrapping values were estimated starting with 100 replicates. The resulting trees were mid-point rooted to maintain consistency. Sylvatic strains were initially included to check for spillover, but then excluded from subsequent analyses to highlight differences in human-derived sequences.

### Statistical Testing and Cartography

Complete cases with cDNA specimens available for DENV rRT-PCR were included. Univariate analysis and a  $\chi^2$  test for categorical variables and a *t*-test for continuous variables was used to compare participants on the basis of infection status with  $\alpha = 0.05$ . One-way analysis of variance was used for >2 group mean comparisons. A comprehensive GenBank search term (Appendix Table 2) was used to obtain a list of original, verified, human dengue sequences from Africa through February 19, 2020. Maps were made by using QGIS version 3.4.14 (<https://qgis.org>).

### Ethics

The study protocol was approved by the Stanford University Institutional Review Board (IRB-31488) and Kenya Medical Research Institute Scientific and Ethical Review Unit in Kenya (protocol 2611). Participation in the study did not affect routine clinical evaluation and treatment provided by the Ministry of Health.

### Results

During January 24, 2014–August 15, 2017, a total of 5,178 participants met eligibility for having an ongoing febrile illness without localization and documented body temperature  $\geq 38^\circ\text{C}$  when care was sought. Of eligible participants at clinics in the

western region, 72.4% consented to participate in the study; 97.2% from clinics in the coastal region consented. RNA extraction and cDNA synthesis were successful for 1,022 specimens that were shipped to the United States for DENV nucleic acid analysis. The mean number of illness days before seeking care was 2 days (range 1–14 days). The study included 11 participants who had 2 separate visits for febrile illness. Of the 1,022 specimens tested by using the internally controlled, pan-DENV rRT-PCR, 15.7% (160/1,022) showed negative results for extraction, cDNA production, or PCR on the basis of the internal control and absence of DENV nucleic acid amplification. Dengue viremia was observed in 41.9% (361/862) of samples that passed quality control, including 46.2% (255/552) from western Kenya and 34.2% (106/310) from coastal Kenya. Overall, 92.2% (333/361) were classified as primary infections (DENV IgG not present) and 3.9% (14/361) as secondary infections (DENV IgG present); 3.9% (14/361) lacked DENV IgG data because of sample unavailability.

We provide baseline characteristics for participants by clinical site (Table 1). The mean age of enrolled children from the coastal region was higher than that for children from the western region (6.7 years vs. 4.6 years;  $p < 0.001$ ). Overall, girls were less represented than boys (467/1,022, 45.7%), and this trend was consistent across sites (44.5% girls in the coastal region, 46.5% girls in the western region). Bednet use was higher in the coastal region than in the western region (94.8% vs. 69.7%;  $p < 0.001$ ). Children in the coastal region had lower household wealth, defined as having <3 of a domestic worker, bicycle, telephone, radio, motor vehicle, or television (64.5% vs. 54.8%;  $p = 0.003$ ). The number of illness days before seeking care was lower in the coastal region than in the western region (2.3 vs. 3.1 days;  $p < 0.001$ ). Malaria smear positivity was lower in the coastal region than in the western region (47.1% vs. 56.8%;  $p = 0.006$ ) (Table 1). A higher proportion of febrile children in the western region had dengue viremia than children in the coastal region (46.2% vs. 34.2%;  $p = 0.001$ ). Participants from the coastal region were more likely to be positive for DENV IgG at the febrile visit than participants from the western region (19/420 4.5% vs. 7/568 1.2%;  $p = 0.003$ ) (Table 1). The mean age was 11.0 years for participants who were positive for DENV IgG compared with 5.4 years for participants who were negative for DENV IgG at the febrile visit ( $p < 0.001$ ).

Mean age of children with DENV detected by rRT-PCR did not differ from all others (5.2 years vs. 5.6 years;  $p = 0.13$ ) (Table 2). In children with and without dengue, mean body temperature, sex, and

**Table 1.** Characteristics of participants by geographic location in study of dengue burden and circulation of 4 virus serotypes among children with undifferentiated fever, Kenya, 2014–2017\*

Characteristic	Coastal clinics (Msambweni and Ukunda), n = 422	Western clinics (Chulaimbo and Kisumu), n = 600	p value
Mean (SD) age, y	6.7 (4.4)	4.6 (2.9)	<0.001
Sex			
F	188 (44.5)	279 (46.5)	0.58
M	234 (55.5)	321 (53.5)	0.58
Always uses bednet	400 (94.8)	418 (69.7)	<0.001
Wealth index <3†	272 (64.5)	329 (54.8)	0.003
Mean (SD) no. illness days before seeking care	2.3 (0.72)	3.1 (1.9)	<0.001
Dengue viremic by rRT-PCR	106 (34.2)	255 (46.2)	0.001
DENV IgG present at febrile visit	19 (4.5)	7 (1.2)	0.003
Malaria smear positive	194 (47.1)	247 (56.8)	0.006

\*Values are no. (%) unless indicated otherwise. DENV, dengue virus; rRT-PCR, real-time reverse transcription PCR.

†Defined as a household having <3 of the following: domestic worker, bicycle, telephone, radio, motor vehicle, and television.

malaria smear positivity were not different (Table 2). DENV viremic participants commonly reported headache (49.6%), poor appetite (46.8%), cough (45.7%), and joint pains (36.8%). Poor appetite was more often reported in dengue patients than in children without dengue (46.8% vs. 36.3%;  $p = 0.001$ ). Antimicrobial drug prescriptions were significantly more common for children who had dengue viremia than for febrile patients without DENV (50.4% vs. 43.9%;  $p = 0.05$ ). Antimalarial drug prescriptions were also more likely for DENV viremic patients (48.8% vs. 36.8%;  $p < 0.001$ ), although malaria smear positivity was not different between the groups (Table 2).

Among all 1,022 study participants, 419 (41.0%) were given an antimalarial. Malaria microscopy results were available for 847 (82.9%) participants; 441 (52.1%) were smear positive. Among study participants who had confirmed dengue and without malaria, 29/141 (20.6%) were given an antimalarial drug,

75/141 (53.2%) were given an antimicrobial drug, and 12/141 (8.5%) were given antimalarial and antimicrobial drugs. Fourteen (6.6%) of 213 participants who did not have dengue or malaria were given antimalarial and antimicrobial drugs.

Serotypes were obtained for 61.2% (221/361) of DENV-positive samples. Samples that were able to be serotyped had higher mean virus loads than untypeable samples (6.5  $\log_{10}$  cDNA copies/ $\mu$ L vs. 4.6  $\log_{10}$  cDNA copies/ $\mu$ L;  $p < 0.001$ ). Of the serotyped samples, 16.3% (36/221) were DENV-1, 47.5% (105/221) were DENV-2, 4.5% (10/221) were DENV-3, 4.5% (10/221) were DENV-4, and in 26.7% (59/221)  $\geq 2$  serotypes were identified. Among the 59 mixed infections, the most common was DENV-2/DENV-3 (59.3%, 35/59); a total of 26/35 occurred during July 2015. The other serotype combinations were DENV-1/DENV-2 (20/59, 33.9%) and DENV-1/DENV-4 (4/59, 6.8%). Patients infected with DENV-3 had highest virus loads, but participant

**Table 2.** Clinical characteristics of febrile children stratified by dengue viremia status in study of dengue burden and circulation of 4 virus serotypes among children with undifferentiated fever, Kenya, 2014–2017\*

Characteristic	Participants with dengue viremia, n = 361	Participants without dengue viremia, n = 661	p value
Mean (SD) age, y	5.2 (3.4)	5.6 (3.9)	0.13
Mean (SD) temperature, °C	38.8 (0.6)	38.9 (0.7)	0.14
Mean (SD) no. illness days before seeking care	2.8 (1.6)	2.7 (1.5)	0.21
Sex			
F	168 (46.5)	299 (45.2)	0.74
M	193 (53.5)	362 (54.8)	0.74
Signs and symptoms			
Headache	179 (49.6)	326 (49.3)	0.99
Poor appetite	169 (46.8)	240 (36.3)	0.001
Cough	165 (45.7)	278 (42.1)	0.29
Joint pain	133 (36.8)	259 (39.2)	0.50
Nausea or vomiting	128 (35.5)	219 (33.1)	0.50
Chills	66 (18.3)	118 (17.9)	0.93
Abdominal pain	46 (12.7)	134 (20.3)	0.003
Diarrhea	42 (11.6)	68 (10.3)	0.58
Muscle aches	30 (8.3)	54 (8.2)	1.00
Malaria smear positive	150 (51.5)	291 (52.3)	0.88
DENV IgG present at febrile visit	14 (4.0)	12 (1.9)	0.07
Prescribed antimicrobial drugs	182 (50.4)	290 (43.9)	0.05
Prescribed antimalarial drugs	176 (48.8)	243 (36.8)	<0.001

\*Values are no. (%) unless indicated otherwise. DENV, dengue virus.

**Table 3.** Characteristics of participants by DENV serotype in study of dengue burden and circulation of 4 virus serotypes among children with undifferentiated fever, Kenya, 2014–2017\*

Characteristic	DENV-1, n = 36	DENV-2, n = 105	DENV-3, n = 10	DENV-4, n = 11	Mixed, n = 59	p value
Mean (SD) age, y	4.4 (2.8)	5.2 (3.3)	5.8 (3.9)	3.8 (1.6)	5.6 (3.3)	0.21
Mean (SD) viral load, log <sub>10</sub> cDNA copies/μL	6.1 (2.5)	5.7 (2.2)	9.7 (3.8)	5.2 (2.7)	7.9 (1.8)	<0.001
Site						<0.001
Chulaimbo	5 (13.9)	53 (50.5)	2 (20.0)	1 (9.1)	26 (49.2)	
Kisumu	10 (27.8)	28 (26.7)	7 (70.0)	10 (90.9)	25 (42.4)	
Msambweni	21 (58.3)	12 (11.4)	1 (10.0)	0	0	
Ukunda	0	12 (11.4)	0	0	0	
Mean (SD) no. illness days before seeking care	2.6 (1.6)	2.9 (1.9)	3.5 (1.5)	2.8 (1.47)	2.6 (1.3)	0.46
Malaria smear positive	18 (51.4)	42 (55.3)	3 (42.9)	4 (45.5)	23 (62.2)	0.78

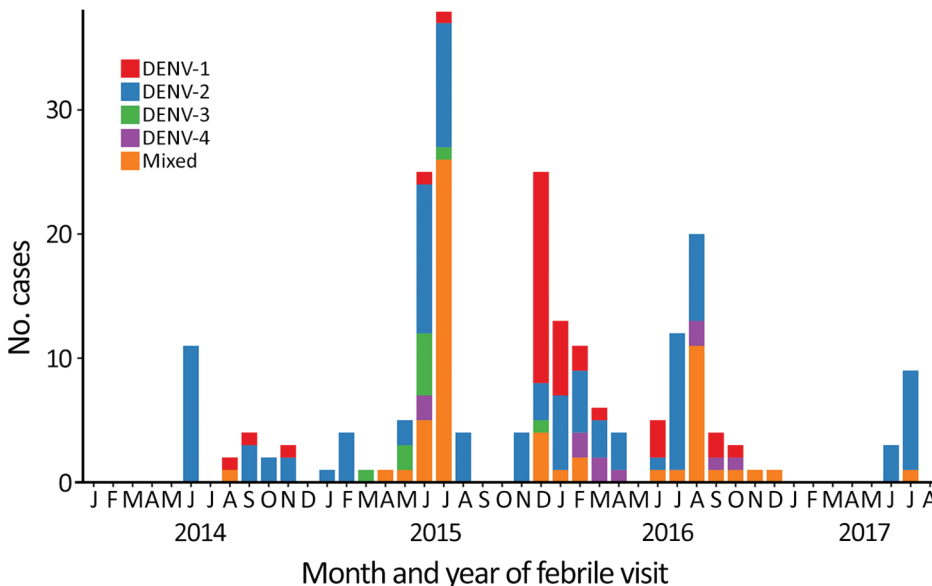
\*Values are no. (%) unless indicated otherwise. cDNA, complementary DNA; DENV, dengue virus.

age, number of illness days before seeking care, and malaria smear positivity rate did not differ by serotype (Table 3). In Ukunda (urban coastal region), only DENV-2 was identified. In Msambweni, DENV-1 was the most common serotype. DENV-2 was most common serotype in Kisumu. DENV-4 was found mostly in Kisumu; there were a few cases in Msambweni. We provide the distribution of dengue serotypes over the study period (Figure 3).

We provide phylogenetic relationships of 31 DENV sequences, including 7 whole genomes, from the current study (Figures 4–7). The samples span July 2014–June 2017 and are derived from participants in coastal and western Kenya. Both DENV-2 and DENV-3 were sequenced from 1 participant sample (MT076939 and MT076951). Many of the samples belong to genotypes that differ from existing reference sequences from Africa. One DENV-2 sample in genotype IV aligns near reference sequences from Malindi, Kenya, and other countries in Africa, and all other DENV-2 samples cluster in genotype I (Figure 5).

**Discussion**

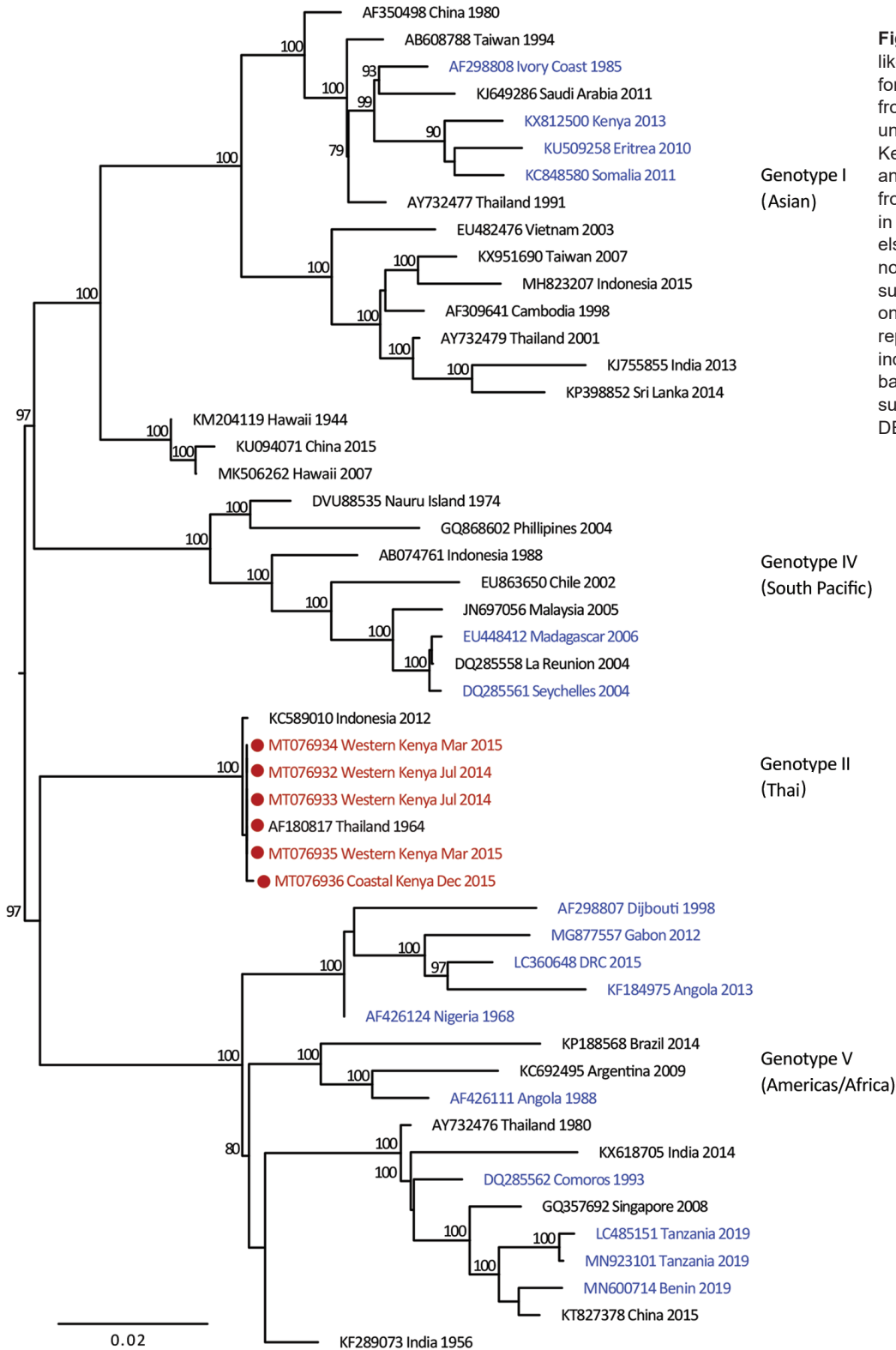
Our study characterized the epidemiology of dengue among children with fever who came to clinics for outpatient care and the phylogenetic relationships of all 4 detected virus serotypes in Kenya. Of 1,022 febrile pediatric visits in western and coastal Kenya, >40% had evidence of dengue viremia. This unprecedented finding suggests an enormous burden of dengue fever among children with undifferentiated febrile illness in Kenya. The higher proportion of dengue in children from the western region than in children from the coastal region might be explained by a reported dengue outbreak in western Kenya during July 2014–June 2015 (18). Similar to previous findings showing 25% dengue viremia by RT-PCR for febrile patients in Kenya during 2011–2014 (13), the current study also identified a major proportion of febrile illness attributable to dengue. Similarly, Bhatt et al. estimated a burden of dengue disease in Africa similar to that in the Americas (>16% of the total global burden) (19). Our study supports the notion of an underrecognized dengue burden in Africa.



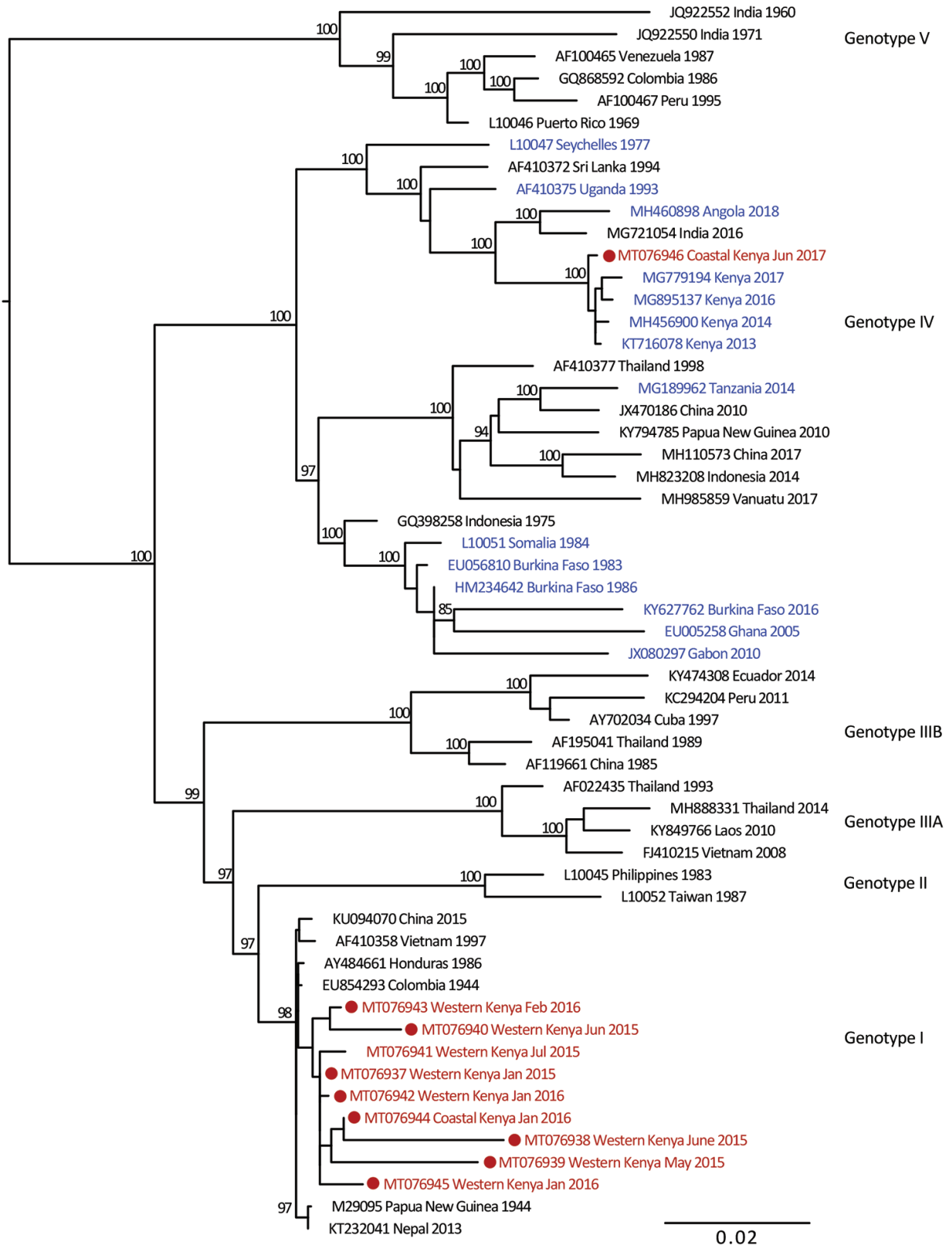
**Figure 3.** Dengue virus serotypes detected over time for children tested during a medical visit for fever, Kenya, 2014–2017. Data from 4 sites are included. DENV, dengue virus.

Our study identified circulation of multiple serotypes of DENV and adds valuable field strains to the public repository. Compilation of available

DENV sequences from Africa into the phylogenetic analyses illustrates the dearth of sequences from Africa and is particularly evident for DENV-1 and



**Figure 4.** Maximum-likelihood phylogenetic tree for DENV-1 sequences from children with undifferentiated fever in Kenya, 2014–2017 (red), and reference sequences from other locations in Africa (blue) and elsewhere. Numbers at nodes represent bootstrap support values based on maximum-likelihood replicates. Genotypes are indicated at right. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site. DENV, dengue virus.



**Figure 5.** Maximum-likelihood phylogenetic tree for DENV-2 sequences from children with undifferentiated fever in Kenya, 2014–2017 (red), and reference sequences from other locations in Africa (blue) and elsewhere. Numbers at nodes represent bootstrap support values based on maximum-likelihood replicates. Genotypes are indicated at right. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site. DENV, dengue virus.

DENV-4 (Figure 1). The DENV-1 samples align closely with a historical Thailand 1964 strain in genotype II. Although such a finding might suggest laboratory error or viral contamination, the Thailand 1964 strain is not a publicly available strain and has never been present in our laboratories. A DENV-1 strain in genotype II was curiously noted to cause human disease in Indonesia during 2012 and is similar to the Thailand 1964 strain (20). We postulate that viral strains related to the Thailand 1964 strain might be circulating at low levels in Kenya, but further surveillance for DENV-1 in other regions of Kenya and Africa is needed.

DENV-2 has been reported as the predominant serotype circulating in Africa (2). One study participant from coastal Kenya in June 2017 was infected with DENV-2 genotype IV, which clustered with previously reported DENV-2 sequences from Africa. However, 9 study samples from 2015 and 2016 clustered in genotype I and were related to sequences from China isolated during 2015 and Nepal during 2013. Commercial trade between Asia and Kenya has increased in recent years, and further sampling is needed to examine the role of such ties in the importation of dengue virus (21).

Several samples from western Kenya isolated during 2015 cluster in a DENV-3 lineage (genotype V, first documented in the Philippines in 1956). Samples from this lineage have been reported only rarely over the years, most recently in 2004 when they were recovered from human cases in Brazil (22). DENV-3 outbreaks and disease in returning travelers have been reported in Africa occurring within the genotype III (Indian) lineage, including the 2011 Manderu and 2013 coastal Kenya outbreaks (13,23). Observation of DENV-3 genotype V might indicate strains with low-level circulation endemically in eastern Africa or arrival by importation.

Of the 4 DENV serotypes, DENV-4 has been the least documented in Africa. During 2016, we documented a DENV-4 cluster in samples from western Kenya and in 1 sample from coastal Kenya. These serotypes group together in genotype II (Indonesia) in which related sequences come from the Americas and Asia. The recovery of DENV-4 sequences in our study was unexpected, in light of the paucity of DENV-4 documentation on the continent. Importation might be driver of dengue circulation in Kenya, but a clear source of DENV-4 introduction was not identified in this study. The findings suggest active DENV-4 circulation in eastern Africa for which robust surveillance is needed.

Human movement by modern transportation is a critical behavioral component underlying dengue cir-

ulation (24,25). The current study raises the possibility that dengue circulation in Africa might be driven by importations of disease, rather than by endemic strains. The similarity of some study samples to those of studies from Asia and Southeast Asia could also reflect movement along trade routes. Further sampling in Africa is required to unravel how the study isolates fit within the global circulation of DENV genotypes and to delineate the role of human movement in dengue transmission.

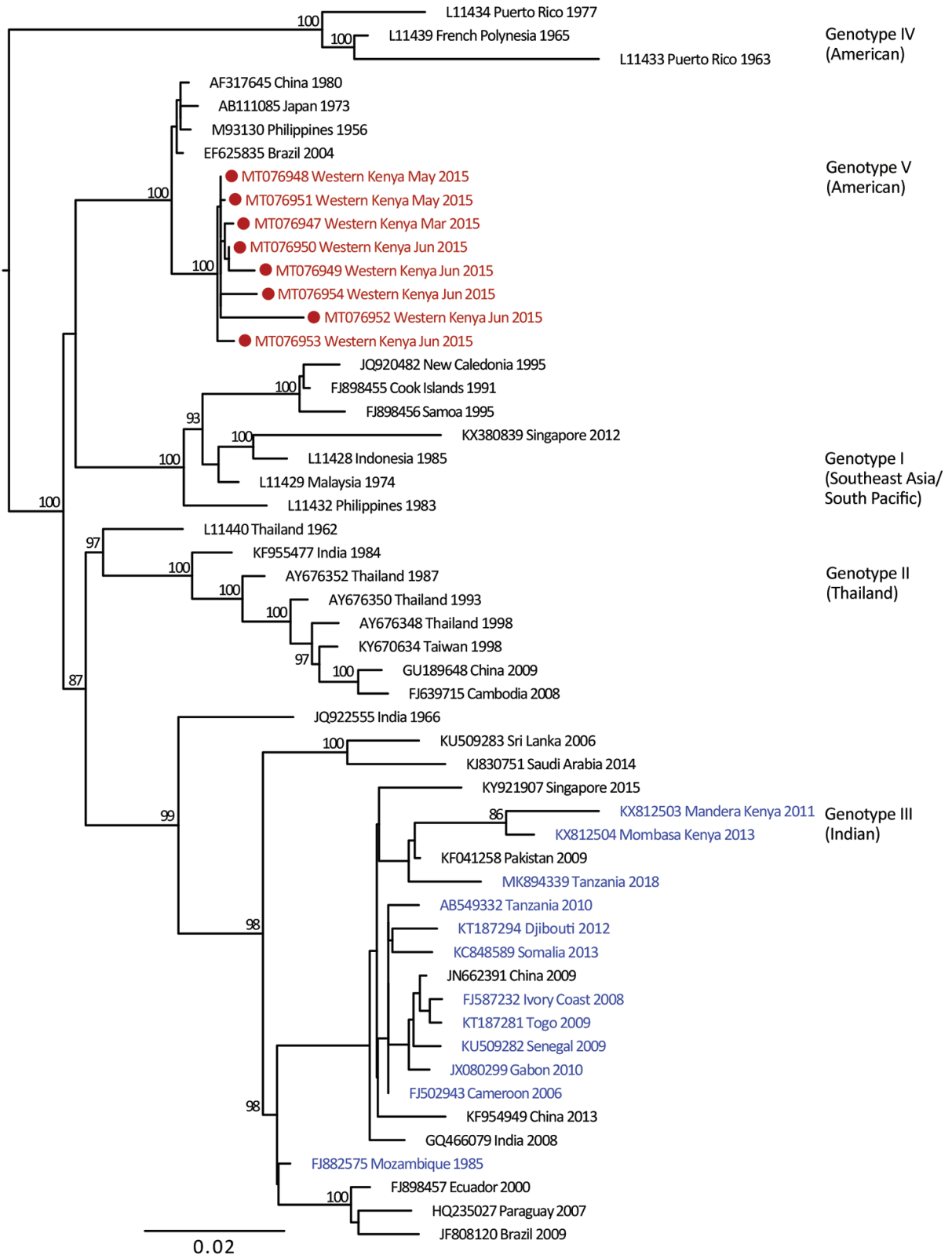
We document DENV circulation in Kenya over a 4-year period interspersed with small outbreaks as described (17). This pattern of disease is not consistent with large-scale dengue outbreaks flanked by long periods of disease quiescence as described in some settings (26). Whether underlying host susceptibility and host dengue viremia determine such patterns is an interesting avenue for further study, especially since persons of African ancestry might be less susceptible to dengue (27,28). Primary DENV infections comprised most of our samples, but interpretation is limited because our study was not representative of the general population.

Although there is no question that DENV circulates in Kenya, it is worth noting that the level of dengue we detected was surprisingly high. In addition, the number of concomitant serotype infections was also high and unexpected. The high percentage of dengue we document in febrile samples could be the result of the highly sensitive rRT-PCR used in this study (16). Another consideration is that RNA extraction was performed on whole blood as opposed to serum. In a study of hospitalized patients, when serum was compared with whole blood for rRT-PCR testing, whole blood yielded higher levels of dengue viremia and increased the detectable viremic window to 9 days (29). Testing of whole blood might have enabled detection of low-level viremia that would otherwise have not been detected in serum or plasma samples.

Half of the study participants who had dengue viremia also had malaria parasitemia. Some participants might have had fevers driven by malaria infection with asymptomatic dengue, and others had dengue plus asymptomatic malaria (30). This distinction is essential because asymptomatic dengue infections provide a major reservoir for human-to-mosquito dengue transmission (19). The higher rates of antimalarial and antimicrobial drug prescriptions for dengue viremic participants suggest more severe disease in this group and supports dengue as the driver of acute illness.

Our results confirm results of previous studies that showed overtreatment and diagnosis of malar-



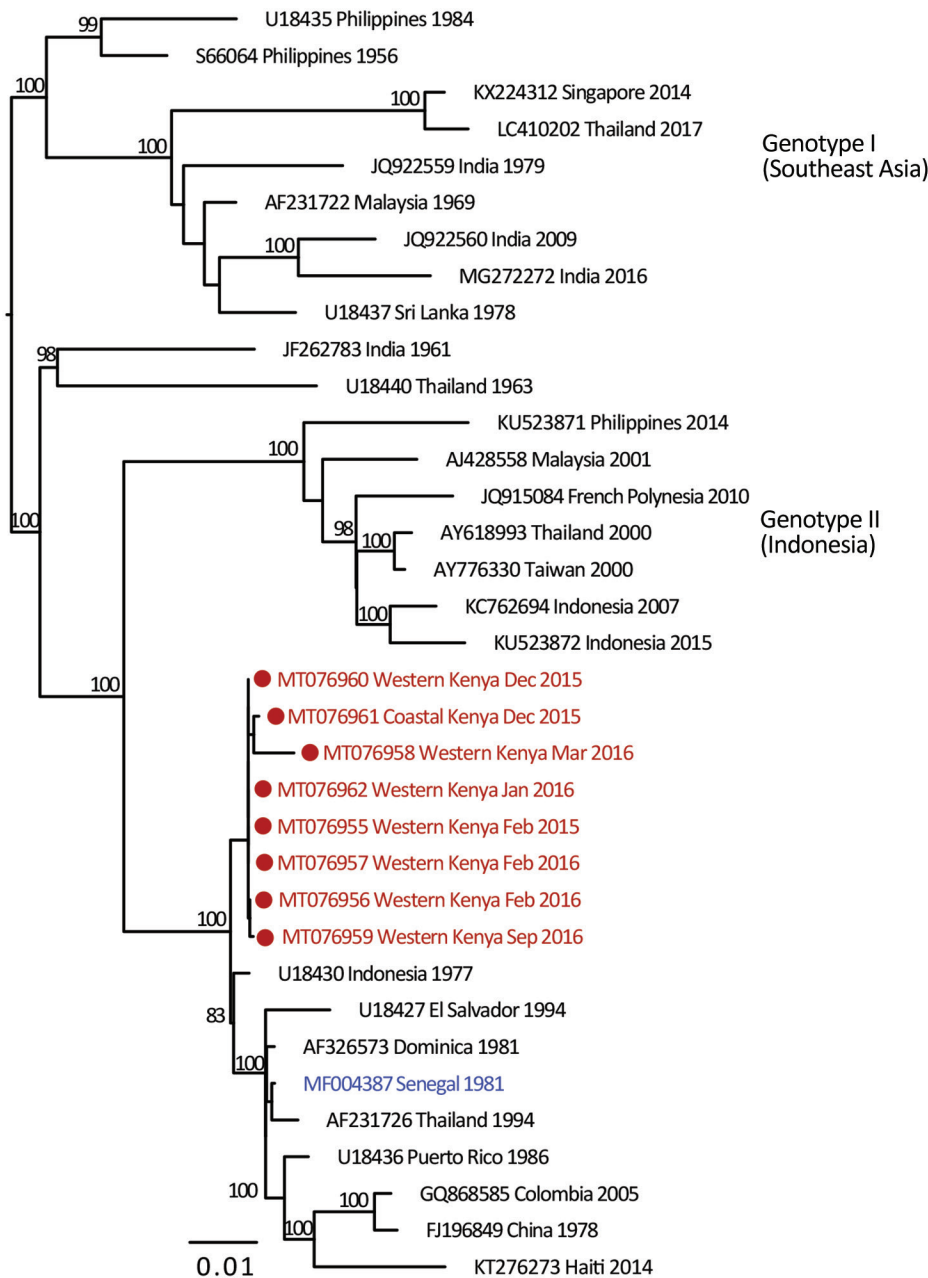


**Figure 6.** Maximum-likelihood phylogenetic tree for DENV-3 sequences from children with undifferentiated fever in Kenya, 2014–2017 (red), and reference sequences from other locations in Africa (blue) and elsewhere. Numbers at nodes represent bootstrap support values based on maximum-likelihood replicates. Genotypes are indicated at right. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site. DENV, dengue virus.

ia parasitemia (31,32). Persons with dengue symptoms should receive antibacterial and antimalarial therapies in the absence of point-of-care diagnostics for dengue. The similar clinical manifestations for persons with and without dengue also make treatment decisions difficult. Antimicrobial drug use for undifferentiated fever is a common practice, given challenges in ensuring close follow-up, expectations for prescriptions, and practice norms in developing countries. The consequences of untreated bacterial infections can be fatal because of limited access to care, but development of drug resistance and treatment for

adverse effects must also be considered. Dedicated investments to develop a reliable dengue point-of-care diagnostic is urgently needed.

There are several limitations to this study. First, participants recruited were outpatients who had undifferentiated febrile illness and did not represent the general population. Studies designed to estimate dengue disease incidence and how febrile illness surveys can be extrapolated to estimate incidence are lacking. Sample testing by PCR occurred inconsistently throughout the study because of logistical considerations (availability of electricity, reliable



**Figure 7.** Maximum-likelihood phylogenetic tree for DENV-4 sequences from children with undifferentiated fever in Kenya, 2014–2017 (red), and reference sequences from other locations in Africa (blue) and elsewhere. Numbers at nodes represent bootstrap support values based on maximum-likelihood replicates. Genotypes are indicated at right. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site. DENV, dengue virus.

transportation, access to laboratory equipment, strikes among healthcare workers), and the possibility of sampling bias exists. In addition, a proportion of total samples failed quality control measures because of suboptimal handling of specimens, inefficient nucleic acid extraction, or the presence of inhibitors in the PCR. This study cannot detangle the role of malaria versus dengue in symptomatic illness. Given the descriptive focus of this study, the clinical and statistical interpretation is limited, and further studies are needed to account for confounding and effect modification.

Our study provides insights into the phylogeny of DENV serotypes in eastern Africa and raises many more unanswered questions and avenues for further research. Phylogenetic analysis of circulating DENVs is crucial to clarifying movement of dengue into and throughout Africa. Viral movement will help identify dengue hotspots and ultimately provide clearer targets for prevention efforts. In addition, serotype circulation to the level of genotype is needed for assessing and predicting the efficacy of dengue vaccines. The paucity of dengue surveillance studies and sequence data from Africa is striking. Dengue activity will likely continue to spread in Africa because of rapid land use change, climate change, urbanization, increased human travel, and international trade (33). Knowledge of the spatial-temporal dynamics of dengue circulation throughout Africa is critically needed to inform a coordinated public health response in an increasingly interconnected world.

This study and A.D.L were supported by grant R01 AI102918, and M.M.S was supported by a T32 Epidemiology Training grant (T32 AI 52073-11 A1) and a Child Health Research Institute Stephen Bechtel Endowed Postdoctoral Fellowship.

## About the Author

Dr. Shah is a postdoctoral researcher and infectious diseases fellow in the laboratory of A. Desiree LaBeaud, at Stanford University, Stanford, CA. Her research interests focus on how human movement and environmental conditions impact arbovirus disease transmission.

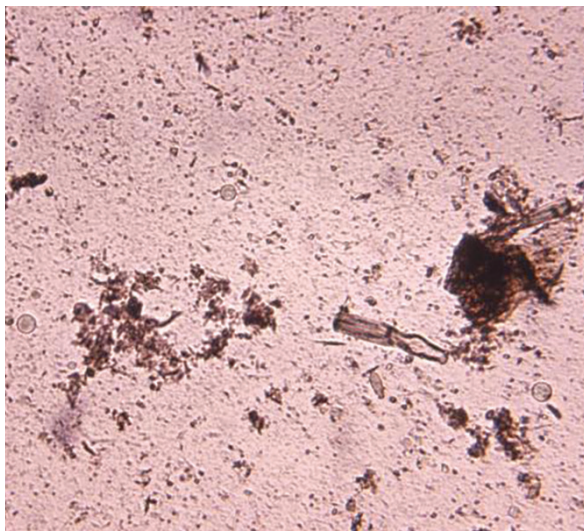
## References

1. Wilson ME, Chen LH. Dengue: update on epidemiology. *Curr Infect Dis Rep.* 2015;17:457. <https://doi.org/10.1007/s11908-014-0457-2>
2. Amarasinghe A, Kuritsk JN, Letson GW, Margolis HS. Dengue virus infection in Africa. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1349–54.
3. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife.* 2015;4:e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
4. Paupy C, Ollomo B, Kamgang B, Moutailler S, Rousset D, Demanou M, et al. Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of dengue and chikungunya in central Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10:259–66. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0005>
5. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol.* 1997;78:2279–84. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-9-2279>
6. Lewis JA, Chang G-J, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology.* 1993;197:216–24. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1582>
7. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol.* 2000;74:3227–34. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3227-3234.2000>
8. Carey DE, Causey OR, Reddy S, Cooke AR. Dengue viruses from febrile patients in Nigeria, 1964–68. *Lancet.* 1971;1:105–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)90840-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)90840-3)
9. Gubler DJ, Sather GE, Kuno G, Cabral JR. Dengue 3 virus transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1986;35:1280–4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.1280>
10. Saluzzo JF, Cornet M, Castagnet P, Rey C, Digoutte JP. Isolation of dengue 2 and dengue 4 viruses from patients in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80:5. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90182-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90182-3)
11. Johnson BK, Musoke S, Ocheng D, Gichogo A, Rees PH. Dengue-2 virus in Kenya. *Lancet.* 1982;320:208–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)91047-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)91047-9)
12. Obonyo M, Fidhow A, Ofula V. Investigation of laboratory confirmed dengue outbreak in north-eastern Kenya, 2011. *PLoS One.* 2018;13:e0198556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198556>
13. Konongoi L, Ofula V, Nyunja A, Owaka S, Koka H, Makio A, et al. Detection of dengue virus serotypes 1, 2 and 3 in selected regions of Kenya: 2011–2014. *Virology.* 2016;13:182. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0641-0>
14. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap): a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009;42:377–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2008.08.010>
15. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. Comparison of the FDA-approved CDC DENV-1-4 real-time reverse transcription-PCR with a laboratory-developed assay for dengue virus detection and serotyping. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3418–20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01359-13>
16. Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Davila MJ, Tellez Y, et al. Single-reaction multiplex reverse transcription PCR for detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:1295–7. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160326>
17. Hortion J, Mutuku FM, Eyherabide AL, Vu DM, Boothroyd DB, Grossi-Soyster EN, et al. Acute flavivirus and alphavirus infections among children in two different areas of Kenya, 2015. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;100:170–3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0297>
18. Vu DM, Mutai N, Heath CJ, Vulule JM, Mutuku FM, Ndenga BA, et al. Unrecognized dengue virus infections in children, western Kenya, 2014–2015. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:1915–7. <https://doi.org/10.3201/eid2311.170807>

19. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496:504–7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
20. Fahri S, Yohan B, Trimarsanto H, Sayono S, Hadisaputro S, Dharmana E, et al. Molecular surveillance of dengue in Semarang, Indonesia revealed the circulation of an old genotype of dengue virus serotype-1. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2354. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002354>
21. Busse M, Erdogan C, Mühlen H. China's impact on Africa: the role of trade, FDI and aid. *Kyklos*. 2016;69:228–62. <https://doi.org/10.1111/kykl.12110>
22. Araújo JM, Bello G, Schatzmayr HG, Santos FB, Nogueira RM, Araújo JM, et al. Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:526–9. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000300021>
23. Franco L, Di Caro A, Carletti F, Vapalahti O, Renaudat C, Zeller H, et al. Recent expansion of dengue virus serotype 3 in west Africa. *Euro Surveill*. 2010;15:19490.
24. Sessions OM, Khan K, Hou Y, Meltzer E, Quam M, Schwartz E, et al. Exploring the origin and potential for spread of the 2013 dengue outbreak in Luanda, Angola. *Glob Health Action*. 2013;6:21822. <https://doi.org/10.3402/gha.v6i0.21822>
25. Adams B, Kapan DD. Man bites mosquito: understanding the contribution of human movement to vector-borne disease dynamics. *PLoS One*. 2009;4:e6763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006763>
26. Stewart-Ibarra AM, Lowe R. Climate and non-climate drivers of dengue epidemics in southern coastal Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88:971–81. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0478>
27. Chacón-Duque JC, Adhikari K, Avendaño E, Campo O, Ramírez R, Rojas W, et al. African genetic ancestry is associated with a protective effect on dengue severity in Colombian populations. *Infect Genet Evol*. 2014;27:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.003>
28. Xavier-Carvalho C, Cardoso CC, de Souza Kehdy F, Pacheco AG, Moraes MO. Host genetics and dengue fever. *Infect Genet Evol*. 2017;56:99–110. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.009>
29. Klungthong C, Gibbons RV, Thaisomboonsuk B, Nisalak A, Kalayanarooj S, Thirawuth V, et al. Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2480–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.00305-07>
30. Sow A, Loucoubar C, Diallo D, Faye O, Ndiaye Y, Senghor CS, et al. Concurrent malaria and arbovirus infections in Kedougou, southeastern Senegal. *Malar J*. 2016;15:47. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1100-5>
31. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Carneiro I, Mwakasungula E, Mwerinde O, et al. Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ*. 2004;329:1212. <https://doi.org/10.1136/bmj.328251.658229.55>
32. Hooft AM, Ripp K, Ndenga B, Mutuku F, Vu D, Baltzell K, et al. Principles, practices and knowledge of clinicians when assessing febrile children: a qualitative study in Kenya. *Malar J*. 2017;16:381. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2021-7>
33. Messina JP, Brady OJ, Golding N, Kraemer MU, Wint GR, Ray SE, et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol*. 2019;4:1508–15. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8>

Address for correspondence: Melisa M. Shah, Stanford University, Lane Bldg, Ste 134, 300 Pasteur Dr, Stanford, CA 94305-5107, USA; email: melisas@stanford.edu or melisa.shah@gmail.com

## EID podcast A Decade of *E. coli* Outbreaks in Leafy Greens in the U.S. and Canada



Most people love leafy greens—about fifty percent have eaten romaine lettuce in the past week. But favorite vegetables can also be a source of deadly disease. From 2009 through 2018, the United States and Canada experienced 40 outbreaks of Shiga toxin-producing *E. coli* related to leafy greens. But how do these vegetables get contaminated in the first place?

In this EID podcast, Katherine Marshall, an epidemiologist at CDC, walks listeners through the steps of a foodborne outbreak investigation.

**Visit our website to listen:**  
<http://go.usa.gov/xGGx3>

**EMERGING  
INFECTIOUS DISEASES®**

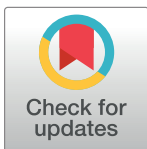
## RESEARCH ARTICLE

## Evidence of transovarial transmission of Chikungunya and Dengue viruses in field-caught mosquitoes in Kenya

Claire J. Heath<sup>1</sup>, Elysse N. Grossi-Soyster<sup>1</sup>, Bryson A. Ndenga<sup>2</sup>, Francis M. Mutuku<sup>3</sup>, Malaya K. Sahoo<sup>1</sup>, Harun N. Ngugi<sup>4</sup>, Joel O. Mbakaya<sup>2</sup>, Peter Siema<sup>5</sup>, Uriel Kitron<sup>6</sup>, Nayer Zahiri<sup>7</sup>, Jimmy Hortion<sup>1</sup>, Jesse J. Waggoner<sup>6</sup>, Charles H. King<sup>8</sup>, Benjamin A. Pinsky<sup>1</sup>, A. Desiree LaBeaud<sup>1\*</sup>

**1** Stanford University School of Medicine, Stanford, California, United States of America, **2** Kenya Medical Research Institute, Kisumu, Kenya, **3** Technical University of Mombasa, Mombasa, Kenya, **4** Chuka University, Chuka, Kenya, **5** Vector Borne Disease Unit, Msambweni, Kenya, **6** Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America, **7** San Mateo County Mosquito and Vector Control District, Burlingame, California, United States of America, **8** Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, United States of America

\* [dlabeaud@stanford.edu](mailto:dlabeaud@stanford.edu)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Heath CJ, Grossi-Soyster EN, Ndenga BA, Mutuku FM, Sahoo MK, Ngugi HN, et al. (2020) Evidence of transovarial transmission of Chikungunya and Dengue viruses in field-caught mosquitoes in Kenya. *PLoS Negl Trop Dis* 14(6): e0008362. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362>

**Editor:** Lyric C. Bartholomay, University of Wisconsin Madison, UNITED STATES

**Received:** October 7, 2019

**Accepted:** May 4, 2020

**Published:** June 19, 2020

**Copyright:** © 2020 Heath et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are available at <https://purl.stanford.edu/tr890xw5305>.

**Funding:** This research was supported by National Institutes of Health (NIH) grant R01AI102918 (ADL). The funders had no role in the collection, analysis, or reporting of the data.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Arboviruses are among the most important emerging pathogens due to their increasing public health impact. In Kenya, continued population growth and associated urbanization are conducive to vector spread in both urban and rural environments, yet mechanisms of viral amplification in vector populations is often overlooked when assessing risks for outbreaks. Thus, the characterization of local arbovirus circulation in mosquito populations is imperative to better inform risk assessments and vector control practices. *Aedes* species mosquitoes were captured at varying stages of their life cycle during different seasons between January 2014 and May 2016 at four distinct sites in Kenya, and tested for chikungunya (CHIKV), dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses by RT-PCR. CHIKV was detected in 45 (5.9%) and DENV in 3 (0.4%) mosquito pools. No ZIKV was detected. Significant regional variation in prevalence was observed, with greater frequency of CHIKV on the coast. DENV was detected exclusively on the coast. Both viruses were detected in immature mosquitoes of both sexes, providing evidence of transovarial transmission of these arboviruses in local mosquitoes. This phenomenon may be driving underlying viral maintenance that may largely contribute to periodic re-emergence among humans in Kenya.

## Author summary

Transovarial transmission, or vertical transmission, is the spread of a pathogen from parent to offspring. It has been observed that some mosquito-borne viruses can be transmitted from female mosquitoes to their offspring during follicle development or during oviposition. The occurrence of transovarial transmission is evident in the presence of virally infected male mosquitoes, which typically do not take bloodmeals, and the presence

of virus in immature mosquitoes of any sex. Transovarial transmission aids in the amplification of mosquito-borne viruses in the environment by increasing the number of infected mosquitoes in a given region, thus expanding the possibility of viral transmission to humans. The combination of transovarial transmission and the preservation of viable eggs during dry seasons may trigger sudden amplification of the virus after rainy periods, resulting in an outbreak. This study provides some of the first evidence of transovarial transmission of chikungunya and dengue viruses in *Aedes aegypti* mosquitoes in Africa during interepidemic periods, which has important implications for local virus persistence and epidemic patterns.

## Introduction

Arthropod-borne viruses (arboviruses) comprise some of the most important emerging pathogens due to their geographic spread and increasing impact on vulnerable human populations. Over 100 arboviruses are known to cause pathology in humans, creating a significant global health burden, yet the transmission, epidemiology, and incidence of arbovirus-related human disease remain poorly defined, particularly in sub-Saharan Africa. Kenya has had multiple arbovirus outbreaks in the past 2 decades including yellow fever [1, 2], chikungunya [3], Rift Valley fever [4–6] and dengue fever [7], which have resulted in significant effects to local economies and community health [8–13]. Thus, the characterization of arboviral circulation in the rapidly changing Kenyan environments that support vector proliferation is essential to better inform human risk assessment and vector control practices.

Transovarial transmission (TOT) is a mechanism by which infective female mosquitoes pass the virus to their offspring via their eggs. TOT is believed to be a mechanism by which arboviruses maintain a local presence during environmental conditions that are adverse for mosquito proliferation, e.g. during dry seasons and winter. Quiescence of vertically infected mosquito eggs in response to environmental conditions may contribute to viral persistence or re-emergence within a region [14]. A recent review of modeling studies suggests that, for DENV, TOT is likely not an important mechanism of viral propagation in Southeast Asia and the Americas, but rather asymptomatic infections in humans and the movement of people account for DENV persistence [15]. Others theorize that selective pressures arise from different vector-virus system combinations that influence the success of horizontal and vertical transmission in a population, as well as overall virulence [16, 17]. Although comprehensive evidence exists demonstrating that TOT of CHIKV and DENV occurs in many distinct endemic regions, complex mechanisms and a lack of field data lead to an incomplete understanding of the contributions of TOT to viral persistence during interepidemic times. In particular, the propagation and maintenance of DENV and CHIKV in Africa and the role of TOT in this viral maintenance is not well understood. This study describes the prevalence and spatiotemporal distribution of CHIKV, DENV, and ZIKV in field-caught mosquitoes in Kenya. We further investigate the rate of TOT of these viruses to determine its possible contribution to viral maintenance in this endemic setting.

## Methods

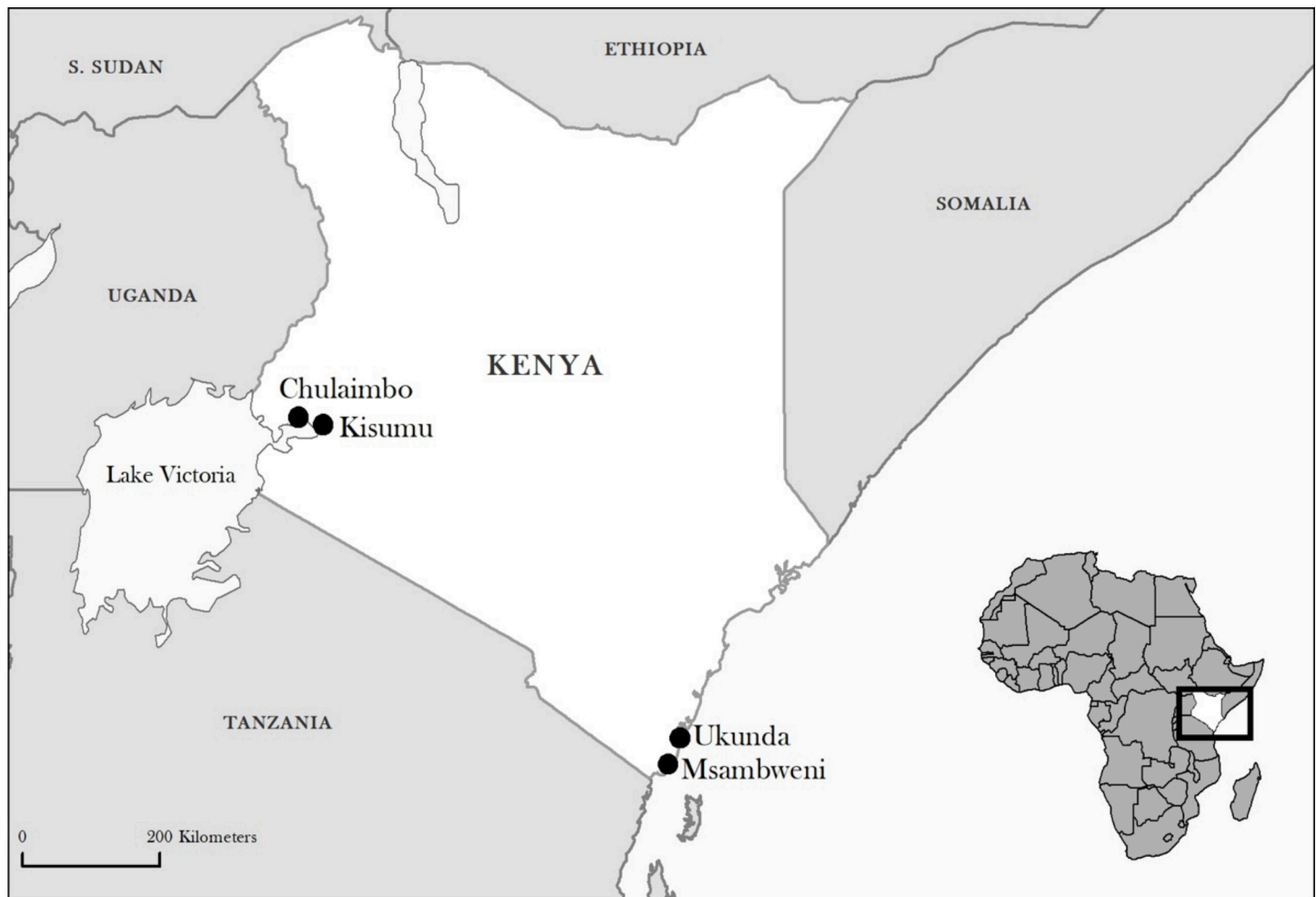
### Ethics statement

The study protocol was approved by the Stanford University Institutional Review Board (Protocol ID #31488) and the Kenya Medical Research Institute (KEMRI) National Scientific and

Ethical Review Committee (SSC # 2611). Meetings were held at all four sites with local government administrators (village elders, chiefs, and assistant chiefs) and with the local residents in each sub-location to introduce the research study and staff to the public. Written informed consent was obtained from the adults who volunteered to participate in Human Landing Catches (HLC) before they were trained and began sampling for mosquitoes. Oral consent was obtained from household heads to sample mosquitoes within their houses and their compounds.

### Mosquito collection

**Study sites:** This study was conducted in four sites in Kenya: two western sites, Kisumu (urban) and Chulaimbo (rural) in Kisumu County, and two coastal sites, Ukunda (urban) and Msambweni (rural) in Kwale County (Fig 1). Kisumu is the third largest city in Kenya located at the shore of Lake Victoria. Chulaimbo village is located 19 kilometers from Kisumu. Ukunda is an emerging urban center located 30 kilometers south of Mombasa in Kwale County along the Indian Ocean coastline. Msambweni village is also in Kwale County, near the shore of the Indian Ocean. It is located 30 kilometers south of Ukunda nearer the Tanzanian border. The climate in both regions is tropical with a bimodal monthly rainfall pattern,



**Fig 1. Map of study sites in Kenya.** Created in QGIS 2.18.11 using MapBox.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362.g001>

with a long rainy period from March to June and a short rainy period from August to October. Sampling for *Aedes* mosquitoes in each of the four sites was done in a selected area of approximately 1.5 x 1.0 km.

The mosquito collection methods have been previously described in detail [18, 19] and are briefly summarized here:

**Human Landing Catches (HLC):** Two homesteads were selected in each of the sites for sampling of blood-seeking mosquitoes using HLC both indoors and outdoors. Paired teams worked together, with one exposing the legs, and the other collecting mosquitoes landing on their partner's legs. Team members changed roles hourly. Captured mosquitoes were placed in collection vessels provided with 10% sugar solution on cotton wool. Vessels were transported on ice to insectaries at KEMRI at Kisian in Kisumu County (for the western sites) and the Vector Borne Disease Control Unit in Msambweni County Referral Hospital, Kwale County (for coastal sites).

**Prokopack Automated Aspirators:** Twenty houses were randomly selected in each of the sites and sampled indoors and outdoors monthly for resting mosquitoes using Prokopack aspirators [20]. Sampling was performed simultaneously, both indoors and outdoors, for 20 minutes by a pair of entomology team members. The collection vessel, which was fitted with a wire mesh on the underside, was used on the aspirator and was capped and removed at the end of each sampling period. Mosquito specimens were stored on ice and transported to each insectary as described above.

**Biogents-Sentinel traps (BGS):** Two houses were selected in each of the four sites for adult mosquito sampling using Biogents (BGS)-traps (Biogents AG Weissenburgstr 22 93055 Regensburg, Germany). Initially, the BGS traps were set indoors in the sitting room without lure. In May 2015, the houses were changed, the trap location was changed from indoors to open, secure verandas, and the traps were baited with CO<sub>2</sub>. The BGS trap was set to sample mosquitoes for five consecutive days every month. Trapped specimens were collected daily and stored and transported as above.

**Sampling of immature mosquitoes: Pupal and Larval sampling:** Forty houses in each of the four study sites were selected by random sampling: 20 houses for larval sampling and 20 for ovitrap sampling. Houses were assessed for immature mosquito infestation on a monthly basis over the study period. All natural and artificial water-holding containers in and around each household were inspected for mosquito larvae and pupae. All pupae and larvae (3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> instars) from positive containers were collected with pipettes and ladles [19, 21]. Water from large containers was first sieved and mosquito samples were placed in a white plastic tray with some water from which the immatures were pipetted. Mosquito samples were placed in 10mL Falcon tubes (Fisher Scientific, Waltham, MA) and/or Whirl-pak plastic bags (Nasco, Fort Atkinson, WI), labeled, and taken to the insectaries. There, immature mosquitoes were reared in 200 mL plastic cups under laboratory conditions at an average temperature of 28.15 ± 1.8°C and relative humidity of 80.9 ± 6.3%, and larvae were fed on TetraMinbaby fish food until adult mosquitoes emerged.

**Ovitrap Sampling:** Ovitrap traps were placed in 20 households that were randomly selected as fixed sampling points in each of our four study sites. Each ovitrap consisted of a black plastic cup filled with 350 mL of tap, borehole, or rainwater. The inside of the cup was lined by a brown paper towel that was partially submerged. Eggs were laid on the damp paper towel just above the water line. Ovitrap traps were set once a week for the duration of the study. To obtain the eggs, the paper towel in each trap was removed, placed into a plastic storage bag and transported to the insectary facilities. Each paper towel was examined under the dissecting microscope for identification of *Aedes* species eggs. To confirm the species, the eggs were submerged in tap water for hatching and the larvae reared to adults under the conditions described above.



**Mosquito identification:** In the insectaries, once mature, all mosquitoes were killed by placing them at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes. They were then sorted by genus (*Aedes* spp., *Anopheles* spp., or *Culex* spp.) and sex, using a standard identification key [22]. Further analyses described only detail data pertaining to *Aedes* spp. collected, with only *Ae. aegypti* specimens pooled and tested by methods described below.

**Sample storage and transport for viral testing:** A single leg was removed from each mosquito specimen and transferred to a 2mL Cryotube (Sarstedt, Rommelsdorf, Germany) with 0.5mL of RNA later (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to preserve any viral nucleic acids. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until they were shipped to Stanford, CA, USA on dry ice for processing.

### Collection of rainfall data

To monitor rainfall at each of our sampling sites, one rain gauge (HOBO Onset data loggers, Onset Computer Corporation 470 Bourne, MA USA), was installed at each of the four sites to collect daily rainfall. The sites were: Chulaimbo Sub-District Hospital (Chulaimbo) ( $0^{\circ}02'16.5''\text{S}$ ,  $34^{\circ}38'20.1''\text{E}$ ), Jaramogi Oginga Odinga Teaching and Referral Hospital (Kisumu) ( $0^{\circ}05'17.5''\text{S}$ ,  $34^{\circ}46'13.6''\text{E}$ ), Msambweni County Referral Hospital (Msambweni) ( $4^{\circ}28'12''\text{S}$ ,  $39^{\circ}28'48''\text{E}$ ) and Diani Health Centre (Ukunda) ( $4^{\circ}16'44.5''\text{S}$ ,  $39^{\circ}35'25.0''\text{E}$ ). Data from rain gauges were downloaded monthly.

### Sample processing

Mosquito legs taken from mosquitoes that had been sorted by species, sex, trap type, and date of capture, were grouped into 714 pools of ~25 individual legs (range 1–36). Specimens of each type (sex etc.) were independently isolated, and all instruments were cleaned and decontaminated with 10% bleach solution between isolations to mitigate any potential for cross-contamination. Each pool of mosquito legs was then transferred into a 2.0 mL microcentrifuge tube with six 2 mm ceramic lysis beads (OMNI International GA USA) with 700  $\mu\text{L}$  of MagMAX Lysis/Binding Solution Concentrate (Applied Biosystems, CA, USA). Samples were then homogenized in a Bead Ruptor 24 (OMNI International, GA, USA), according to the following program: Strength = 5.65, Time = 0:30, Cycles = 2, Delay = 0:05. Sample lysates were then centrifuged at 15,000 rpm for 6 minutes at room temperature to remove debris. Nucleic acid isolation was then performed using MAGMAX 96-Viral Isolation Kit (Life Technologies, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The manufacturer's decontamination protocol was performed after every run to prevent nucleic acid transfer between samples.

### Molecular testing

Pooled legs of *Aedes aegypti* mosquitoes were tested for the presence of ZIKV, CHIKV, and DENV RNA with a triplex real-time reverse transcription PCR (rRT-PCR), as previously described [23]. Briefly, ZIKV-CHIKV-DENV rRT-PCR reactions were performed using the SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR kit (Life Technologies) with a total reaction volume of 25  $\mu\text{L}$  and 5  $\mu\text{L}$  of eluate. Reactions were performed on a Rotor-Gene Q instrument (Qiagen). Thresholds were set according to the published validation, and all exponential curves that crossed the threshold prior to cycle 45 were considered positive [24]. Negative controls containing no RNA template were included on every run of the assay, and amplicon curves were not observed in any of these controls. To validate our assay results, we performed multiplex PCR assays, using the same primer sets included in the multiplex reaction, on a subset of 18 CHIKV positive samples, and all 3 of the DENV positive samples to confirm infection.

## Statistical analysis

Multi-way chi-square ( $\chi^2$ ) analyses were performed to determine statistical differences among the levels of positivity for the recovered samples from different trap types. Maximum likelihood estimates of viral infection rates were calculated using the Poolscreen methodology developed by Katholi and Unnasch [25].

## Results

### Prevalence of infection

Between January 2014 and May 2016 mosquitoes were collected using multiple trapping methods at 4 study sites in Kenya; Chulaimbo (rural) and Kisumu (urban) in the west of the country, and Msambweni (rural) and Ukunda (urban) on the coast (Fig 1).

A total of 714 pools of *Aedes aegypti* species legs were tested. Of these 180 (25%) were caught in Chulaimbo, 123 (17%) in Kisumu, 178 (25%) in Msambweni, and 233 (33%) in Ukunda (Fig 2). The distribution of mosquito leg pools amongst each of the trap types was as follows: Ovitrap—248/714 pools (35.0%), Larval—193 (27.0%), Pupal—72 (10.1%), BGS—61 (8.5%), Prokopack—88 (12.3%) HLC—52 (7.3%) (Fig 2).

### Mosquito infection rates

Of the 714 pools tested, 43 (5.9%) were positive for CHIKV (Table 1, Fig 2) and 3 pools (0.4%) were positive for DENV, including 1 pool that was positive for both viruses (Table 2, Fig 2). ZIKV was not detected in any mosquito pool tested in this study.

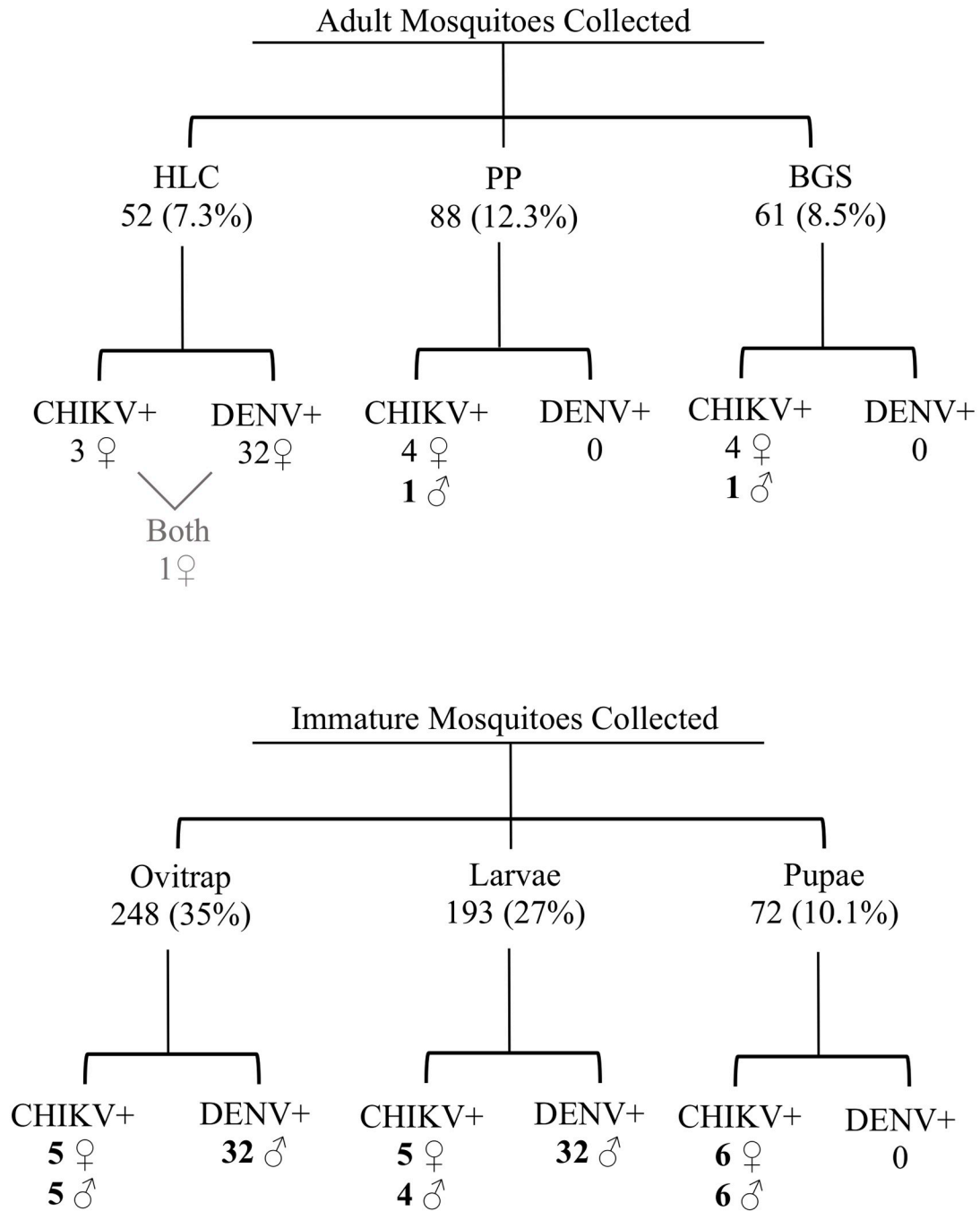
### Spatiotemporal distribution

Of the 45 arbovirus-positive pools 17/45 (37.7%) were from mosquitoes from western Kenya and 28/45 (62.2%) were from the coast. All three of the DENV positive mosquito samples were from the coastal sites. The maximum-likelihood CHIKV infection rate for the coast was 0.7% (95% CI 0.43–1.10%), compared to 0.33% (95% CI 0.18% - 0.54%) in the west (Table 1). The infection rates for both CHIKV and DENV on the coast exceeded the upper confidence intervals for infection rate in the west, confirming regional variation in the circulation of CHIKV and DENV. Although the rural study sites of Chulaimbo and Msambweni yielded more arbovirus-positive pools than their urbanized counterparts, the calculated infection rates did not significantly differ between rural and urban sites (Tables 1 and 2).

CHIKV was identified in pools of both immature and mature mosquitoes and across all years and seasons of the study (Fig 2). CHIKV and DENV were not detected in western Kenya in the latter half of 2014 nor in 2015, although the detection of CHIKV resumed in the early part of 2016. On the coast, both viruses were more frequently detected throughout the study, with peaks of infected mosquitoes roughly corresponding to peak periods of rainfall (Fig 3). Of note, 22/42 (52.3%) of the CHIKV positive pools and 2/3 (66.6%) of the DENV positive samples were collected between January and May 2016.

### Life cycle stages

When grouped either as field-caught adult samples (those caught by BGS, HLC and Prokopack) or as immature form samples (caught by larval and pupal sampling or by ovitraps) the contribution of each group to the total number of positives is proportional to its size. Legs from adult mosquitoes accounted for 28% of the total sample pools tested (Table 3), and contributed 27.9% of all positive pools (Fig 2). Of the sample pools collected and tested, 72% were captured as immature mosquitoes and reared to adulthood prior to leg removal and pooling,



**Key:** HLC = Human Landing Catch; PP = Prokopak trap; BGS = BG Sentinal trap; ♀ = female, ♂ = male

**Fig 2. Flow chart describing pools of *Ae. aegypti* mosquito legs by age, sex, and virus detected.** All mosquito leg pools described were collected from four distinct study sites: Kisumu and Chulaimbo (urban and rural sites, respectively, in western Kenya), and Ukunda and Msambweni (urban and rural sites, respectively, in coastal Kenya) between January 2014 and May 2016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362.g002>

contributing 72.1% of the positive pools. Due to the collection yield rates, adult pools were generally smaller (mean 7.2 individuals) than the overall study average pool size (15.2) and the immature form pool size (18.4). When expressed as a maximum likelihood infection rate [25],

**Table 1. Chikungunya.** Poolscreen estimates for the minimum infection rate for CHIKV [16]. Kisumu and Ukunda represent the urban sites for the West and Coast, respectively. Rural collection sites were located in Chulaimbo and Msambweni for the West and Coast, respectively.

Sites	No. Pools	No. positive pools	Estimated infection rate (95% CI)
All	714	43	0.49% (0.34–0.68%)
West	321	17	0.33% (0.18–0.54%)
West rural	180	9	0.28% (0.12–0.53%)
West urban	123	8	0.42% (0.17–0.84%)
Coast	411	25	0.70% (0.43–1.10%)
Coast rural	178	13	0.85% (0.43–1.50%)
Coast urban	233	12	0.58% (0.28–1.00%)
All rural	369	22	0.46% (0.27–0.71%)
All urban	347	20	0.51% (0.29–0.81%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362.t001>

*i.e.*, the estimated number of mosquitoes infected per 1,000 tested, the rate of CHIKV positivity was higher in adult mosquitoes (mean 61.8/1,000, range 30–100) than in immature mosquitoes (mean 9.0/1,000, range 2–24).

Ovitrap samples accounted for 35% of all pools tested, but with a proportionally smaller number of positives (23.3%). Conversely, pools of legs collected from pupal mosquitoes reared to adulthood contributed only 10.1% to the specimen total, but had 27.9% of positives. Indeed, the positivity rate in the larval collection was significantly increased in pairwise comparisons to both ovitraps ( $\chi^2 = 7.90$ ,  $p = 0.005$ ) and larval collection ( $\chi^2 = 10.35$ ,  $p = 0.001$ ). Rates for ovitraps and collected larvae did not significantly differ ( $\chi^2 = 0.12$ ,  $p = 0.74$ ). Likewise, there were no significant differences among the adult groups ( $\chi^2 = 0.63$ ,  $p = 0.73$ ) and no differences in positivity rates among adults and larvae ( $\chi^2 = 1.73$ ,  $p = 0.79$ ).

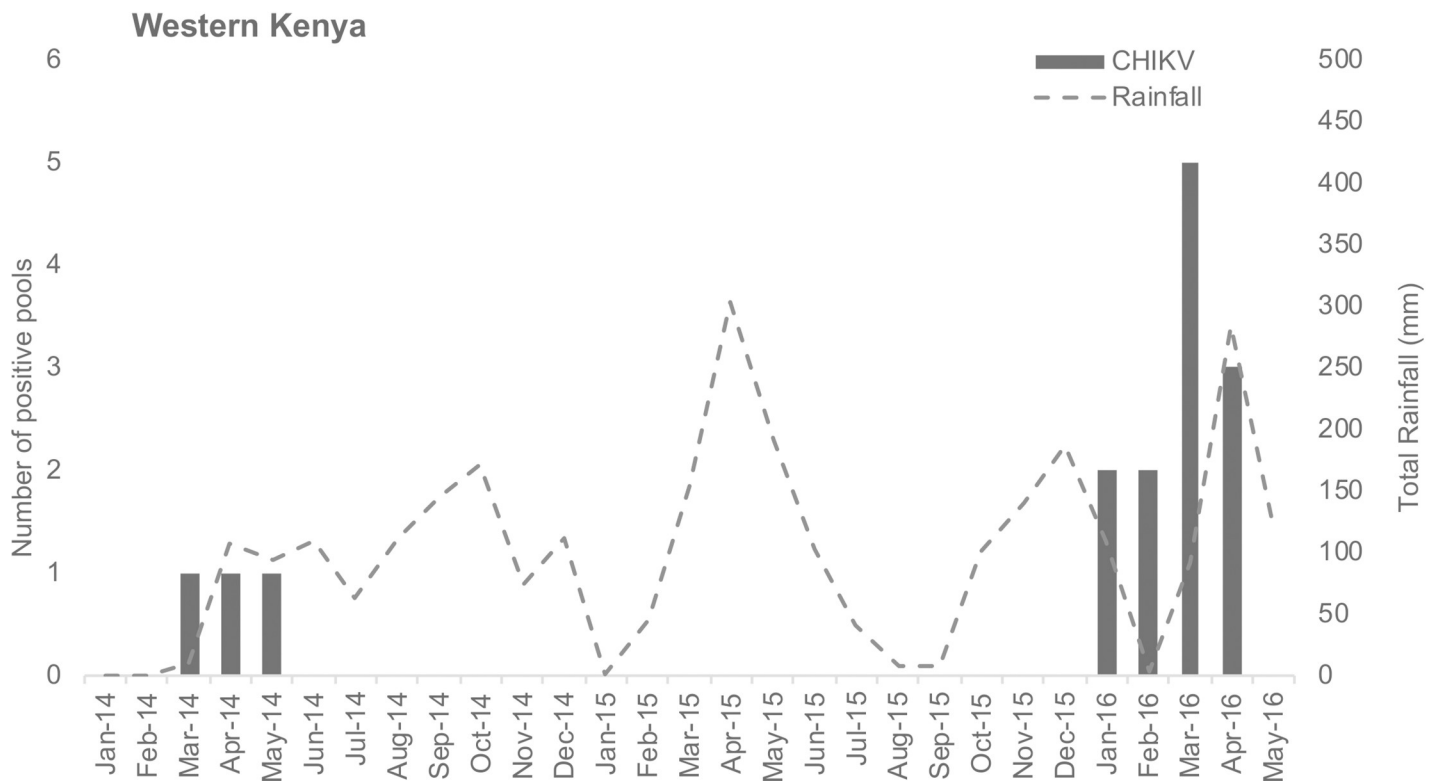
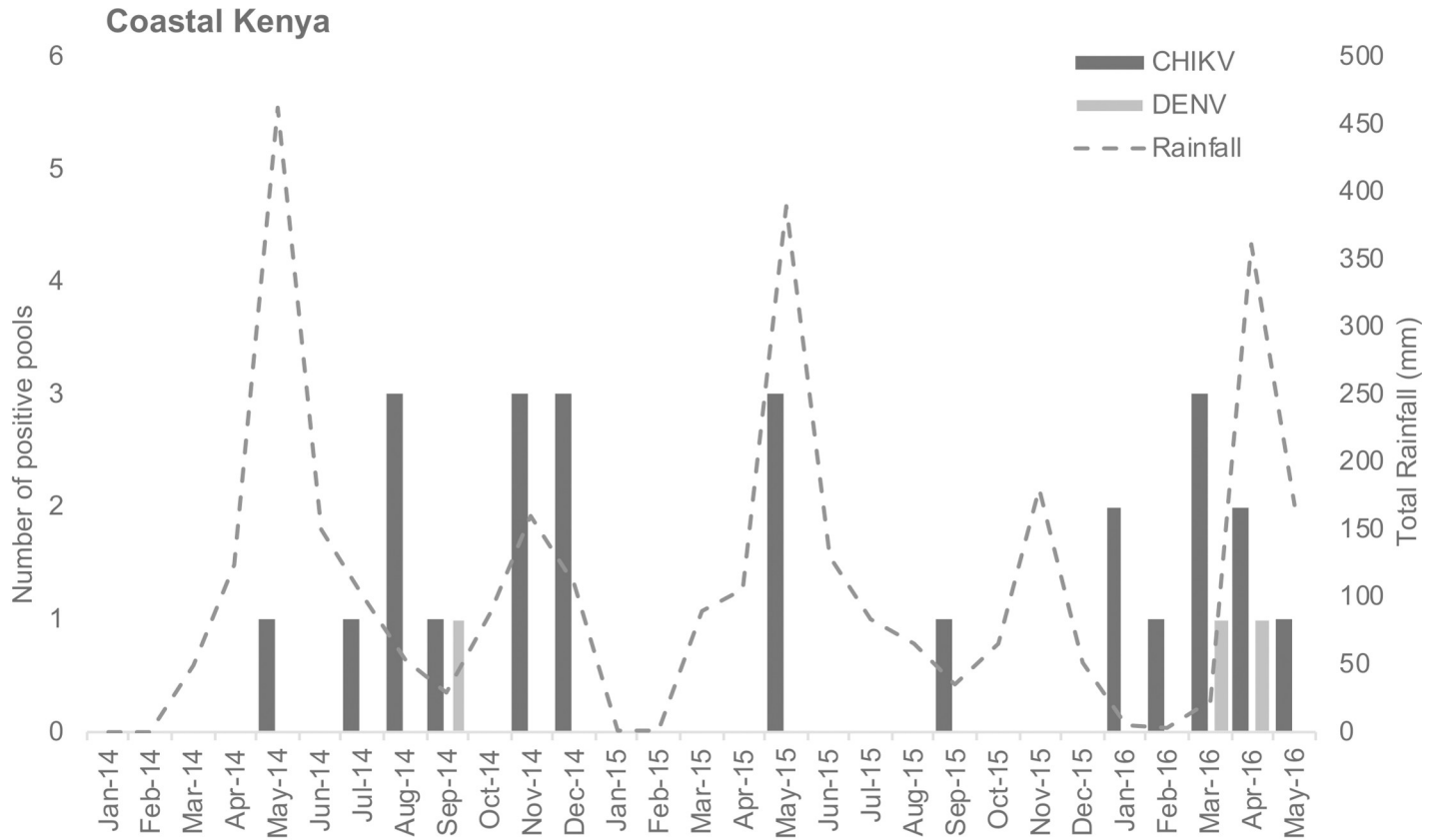
In our adult mosquito samples, 9/11 (81.8%) of positive samples were bloodmeal-seeking female mosquitoes, with one positive male pool each from the BGS sentinel traps and the Prokopack aspirator trapping. No male mosquitoes caught by HLC were positive for arboviruses. However, in the immature form samples, arbovirus positivity was relatively evenly distributed between sexes (Fig 2).

Sample pools from each sex and lifecycle stage were found to be positive for both DENV and CHIKV. Of note, two of the three DENV positive pools were from male adult mosquitoes that had been reared in the laboratory from eggs or larvae (one pool each) collected in Msambweni, suggesting that DENV was vertically transmitted to these mosquitoes. The third DENV

**Table 2. Dengue.** Poolscreen estimates for the minimum infection rate for DENV [16]. Kisumu and Ukunda represent the urban sites for the West and Coast, respectively. Rural collection sites were located in Chulaimbo and Msambweni for the West and Coast, respectively.

Sites	No. pools	No. positive pools	Estimated infection rate (95% CI)
All	714	3	0.03% (0.01–0.10%)
West	321	0	0.00% (0.00–0.03%)
West rural	180	0	0.00% (0.00–0.06%)
West urban	123	0	0.00% (0.00–0.10%)
Coast	395	3	0.08% (0.02–0.24%)
Coast rural	178	2	0.13% (0.02–0.44%)
Coast urban	233	1	0.05% (0.00–0.25%)
All rural	369	2	0.04% (0.00–0.14%)
All urban	347	1	0.03% (0.00–0.13%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362.t002>



**Fig 3. Temporal distribution of arbovirus positive mosquito leg pools and total rainfall across each study region.** Mosquitoes and rainfall data collected between January 2014 and May 2016. Further study site details within western and coastal Kenya can be found in Fig 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362.g003>

positive pool were adult female mosquitoes caught by HLC in Ukunda, suggesting that DENV was continuing to circulate at a low level at that time.

## Discussion

Results of our study suggest that both DENV and CHIKV, but particularly CHIKV, remains in circulation at low levels in Kenyan vectors in both rural and urban settings. The viruses are maintained through all seasons, although peaks of infected mosquito abundance coincide with periods of increased rainfall. An association between rainfall and CHIKV incidence has been documented in other settings [26], but our detection of CHIKV in immature mosquitoes across all years and seasons of the study now indicates that this virus can be maintained by vertical transmission mechanisms during environmental conditions that are adverse for mosquito proliferation. While evidence of DENV TOT in Kenya has recently been described during epidemic times [7], the present study is the first to describe vertical transmission of CHIKV in wild *Ae. aegypti* mosquitoes and DENV during interepidemic times in Africa.

Extensive evidence for the maintenance of DENV and CHIKV by TOT mechanisms in endemic regions illustrates the stability of the DENV and CHIKV in wild mosquito populations (S1 Table). Evidence from experimental infections of *Aedes* spp. mosquitoes with CHIKV has demonstrated the potential for transovarial transmission of the virus [27–29]. Experimental evidence of TOT of CHIKV was debated in the 1980s [30], but has been repeatedly observed in laboratory settings with *Aedes* spp. (S1 Table) [27–29, 31–34]. The isolation of

**Table 3. The numbers of total *Ae. aegypti* pools caught by each collection method. The number of CHIKV positive pools of legs is shown in parentheses (). The number of DENV positives is shown in brackets [] The sex distribution of positive samples is given in the sub-rows. \* One of the pools of mosquito legs from female mosquitoes was caught by HLC was positive for both viruses.**

Collection type	No. of pools tested (Pos)	% of total pools	% of positive pools
<b>BGS Sentinel</b>	<b>61 (4)</b>	<b>8.5</b>	<b>9.3</b>
Male	1		
Female	3		
<b>Human Landing Catch</b>	<b>52 (3) [32]</b>	<b>7.3</b>	<b>9.3</b>
Male	0		
Female	3 [32] *		
<b>Prokopack Aspirator</b>	<b>88 (4)</b>	<b>12.3</b>	<b>9.3</b>
Male	1		
Female	3		
<b>Ovitrap</b>	<b>248 (10) [32]</b>	<b>35.0</b>	<b>23.3</b>
Male	5 [32]		
Female	5		
<b>Larval Collection</b>	<b>193 (9) [32]</b>	<b>27.0</b>	<b>20.9</b>
Male	4 [32]		
Female	5		
<b>Pupal Collection</b>	<b>72 (12)</b>	<b>10.1</b>	<b>27.9</b>
Male	6		
Female	5		
<b>Total</b>	<b>714 (43) [3]</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362.t003>

CHIKV viral RNA (but not viable virus) in artificially infected *Aedes aegypti* has been previously reported by Wong *et al.* [29]. In contrast Vazeille *et al.* reported on the absence of vertical transmission of the East/Central/South African (ECSA) strain of the virus in *Aedes albopictus* in their studies of experimental infections [35]. CHIKV TOT has been confirmed in wild mosquito populations recently, with a report by Jain *et al.* identifying CHIKV in field-caught immature *Aedes aegypti* mosquitoes in India [36], and a report by Thavara *et al.* finding CHIKV in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* adult males in Thailand [37], both providing further evidence of vertical transmission in nature.

Our findings suggested the MIR for CHIKV was higher in adult mosquitoes as compared to immature mosquitoes. This might be expected if, in addition to vertical transmission of the virus (as suggested by our findings), adults may have also taken blood meals from CHIKV-positive humans. In addition, venereal infection of females by virus-positive male mosquitoes has been described as another potential route for infection of adult females [33]. Interestingly, the rate of infection of mosquitoes caught in larval collection was significantly higher than in the ovitraps. Bara *et al.* [38] suggest a mechanism of horizontal DENV transfer in *Aedes* mosquitoes, by which larvae may become infected by the ingestion of material from dead, vertically-infected immature mosquitoes or dead, infected adults [39, 40], yet such suggestions have yet to be documented with published data. In addition to its potential contribution to viral persistence, this mechanism may explain the proportionally increased rate of infection in our pupal samples.

We detected DENV in immature mosquito specimens and adult male pools, suggesting transovarial transmission of the virus in our samples. Thorough investigations have described DENV TOT in wild mosquitoes in many affected geographic regions [7, 41–63] (S1 Table), suggesting an important role in the interepidemic maintenance of DENV. Although TOT mechanisms are thought not to be an important method of viral transmission of DENV in SE Asia and the Americas [15], the significant genetic divergence of *Ae. aegypti* mosquitoes from these regions compared to those in Africa has been documented [64]. Thus, it is possible that transovarial transmission mechanisms are of greater importance to DENV persistence in Africa compared to the rest of the tropics. Moreover, differences in the vertical transmission rate of DENV between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* have been suggested previously [15], hence it is likely that that mosquito species also plays a defining role in the rate of vertical transmission of CHIKV. Future research comparing vertical transmission rates of different arboviruses in competent vector species could help to inform local vector and risk management policies. In future mosquito collections, we will endeavor to differentiate between different *Aedes* species in order to expand the understanding of species-specific TOT contributions to the global arboviral burden.

The increased presence of CHIKV in coastal Kenya, as observed in this study, is in agreement with previous studies that have shown high rates of alphavirus transmission in this region [65]. In addition, we only detected DENV-infected mosquitoes in the coastal study sites. This finding is in accord with previous epidemiologic findings on the regional variation in incidence of flavivirus infections in Kenya [12, 66–68]. During our 2014 to 2016 sampling period described in this study, we were also simultaneously collecting blood samples from child participants within acutely ill and healthy cohorts as a part of a larger, longitudinal study aiming to determine the incidence and prevalence of DENV and CHIKV in children in coastal and western Kenya, which has been previously described [10, 69]. Briefly, a primary diagnosis of acute DENV or CHIKV infection accounted for 24% ( $n = 93/385$  participants) of the participants tested by RT-PCR [69]. These data specifically highlight the incidence of clinical CHIKV and DENV disease in Kenyan children, with a greater frequency of confirmed incident CHIKV cases from western Kenya than from the coast [69]. This is the opposite of the

viral prevalence in mosquitoes that we have reported here. It is possible that CHIKV is persistently maintained in the mosquito population via transovarial transmission, particularly in regions where a larger proportion of the human population have some immunity to the virus. Moreover, in such regions of relatively higher immunity, local residents are hence less likely to present with symptomatic infections [70, 71]. We have previously noted that the presence of CHIKV in coastal Kenya may be misinterpreted by the presence of a closely related alphavirus, O'nyong'nyong virus [65], which is transmitted by anopheline mosquitoes [65], yet indistinguishable from CHIKV when utilizing common serological diagnostic tools due to antibody cross-reactivity [72]. Yet, repeated discovery of arboviruses in competent vectors and in human populations reiterates the public health importance of these findings, and the need for better integration into local vector control measures and community education.

Our study had limitations. An inherent sampling bias existed in our study due to the relative difficulty in capturing adult mosquitoes compared to eggs and larvae. We have, however, adjusted for this by expressing our data proportionally and, where relevant, as minimum infective rate. As with all studies, it is possible that some variation was introduced by the different trap operators and entomologists at the different study sites. We minimized such effects by ensuring that all personnel were briefed and trained together, by rotating staff between the 4 sites, and by holding regular conference calls between all staff to ensure consistency of our protocols and methodologies. This study focused on the detection of viral RNA from pooled mosquito legs, and data presented in this manuscript is not representative of potential live virus that may have been contained within our samples. We were unable to recover viable CHIKV and DENV in the laboratory as the test samples were stored in a lysis buffer, which rendered them unsuitable for inoculation into cell culture. However, we did confirm the presence of CHIKV in a subset of our samples using individual monoplex reactions, using the same primers as used in the multiplex reaction. The template used in these confirmatory monoplex assays was generated in a separate reaction to that used for the multiplex assay. Additionally, initial mosquito specimen processing occurred in laboratories that did not contain any live virus, and molecular testing was conducted in a laboratory in which structural measures including a one-way work flow and separate room for nucleic acid isolation and detection are instituted to mitigate the risk of contamination. Thus, we are confident that our positive findings are not the result of cross-contamination. Further confirmation of vertical transmission of CHIKV is important to the elucidation of the mechanisms by which the virus is sustained outside of its human host. To achieve this, future research should involve the appropriate collection and storage of mosquito samples so that live virus, when present, can be isolated and characterized.

Our findings highlight the health implications of regional variation in arboviral circulation, and underscore the importance of understanding mechanisms of arboviral transmission to local risk assessment and healthcare management. Importantly, we have provided evidence that CHIKV and DENV are vertically transmitted in *Ae. aegypti* mosquitoes, likely facilitating the maintenance of baseline levels of virus in the study locations. Low-level circulation may explain the lack of seasonal patterns in CHIKV and DENV epidemics in Kenya, yet regularly occurring TOT is likely to contribute to local viral maintenance and a continuous, low-level incidence of human infections that establish a higher baseline immunity to these viruses within the local population.

## Supporting information

**S1 Table. A summary of published evidence of TOT reported in both wild and experimental environments.** NS = Not Specified.

(XLSX)



## Acknowledgments

We would like to thank our field teams and entomologists in Kenya for the collection and identification of our mosquito samples.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Claire J. Heath, Bryson A. Ndenga, Francis M. Mutuku, Uriel Kitron, Charles H. King, A. Desiree LaBeaud.

**Data curation:** Claire J. Heath, Harun N. Ngugi.

**Formal analysis:** Claire J. Heath, Jesse J. Waggoner.

**Funding acquisition:** Bryson A. Ndenga, Charles H. King, A. Desiree LaBeaud.

**Investigation:** Claire J. Heath, Elysse N. Grossi-Soyster, Bryson A. Ndenga, Francis M. Mutuku, Malaya K. Sahoo, Harun N. Ngugi, Joel O. Mbakaya, Peter Siema, Nayer Zahiri, Jimmy Hortion, Jesse J. Waggoner, Benjamin A. Pinsky, A. Desiree LaBeaud.

**Methodology:** Bryson A. Ndenga, Francis M. Mutuku, Uriel Kitron, Charles H. King, Benjamin A. Pinsky, A. Desiree LaBeaud.

**Project administration:** Bryson A. Ndenga, A. Desiree LaBeaud.

**Resources:** Bryson A. Ndenga, Francis M. Mutuku, A. Desiree LaBeaud.

**Supervision:** Bryson A. Ndenga, Francis M. Mutuku, A. Desiree LaBeaud.

**Validation:** Claire J. Heath.

**Writing – original draft:** Claire J. Heath, Elysse N. Grossi-Soyster.

**Writing – review & editing:** Claire J. Heath, Elysse N. Grossi-Soyster, Bryson A. Ndenga, Francis M. Mutuku, Charles H. King, A. Desiree LaBeaud.

## References

1. Okello GBA AN, Ouma J, Cherogony SC, Tukey PM, Ochieng W, Den Boer JW, Sanders EJ. Outbreak of yellow fever in Kenya. *The Lancet*. 1993; 341(8843):489.
2. Sanders EJ, Marfin AA, Tukey PM, Kuria G, Ademba G, Agata NN, et al. First recorded outbreak of yellow fever in Kenya, 1992–1993. I. Epidemiologic investigations. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59(4):644–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.644> PMID: 9790446
3. Serگون K, Njuguna C, Kalani R, Ofula V, Onyango C, Konongoi LS, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 78(2):333–7. PMID: 18256441
4. Mwaengo D, Lorenzo G, Iglesias J, Warigia M, Sang R, Bishop RP, et al. Detection and identification of Rift Valley fever virus in mosquito vectors by quantitative real-time PCR. *Virus Res*. 2012; 169(1):137–43. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.07.019> PMID: 22841800
5. Woods CW, Karpati AM, Grein T, McCarthy N, Gaturuku P, Muchiri E, et al. An outbreak of Rift Valley fever in Northeastern Kenya, 1997–98. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(2):138–44. <https://doi.org/10.3201/eid0802.010023> PMID: 11897064
6. Center for Disease Control and Prevention. Rift Valley fever outbreak—Kenya, November 2006—January 2007. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2007; 56(4):73–6.
7. Lutemiah J, Barrera R, Makio A, Mutisya J, Koka H, Owaka S, et al. Dengue Outbreak in Mombasa City, Kenya, 2013–2014: Entomologic Investigations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(10):e0004981. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004981> PMID: 27783626
8. Grossi-Soyster EN, Cook EAJ, de Glanville WA, Thomas LF, Krystosik AR, Lee J, et al. Serological and spatial analysis of alphavirus and flavivirus prevalence and risk factors in a rural community in western Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(10):e0005998. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005998> PMID: 29040262

9. Gudo ES, Ali S, Antonio VS, Chelene IR, Chongo I, Demanou M, et al. Seroepidemiological Studies of Arboviruses in Africa. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1062:361–71. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_25) PMID: 29845545
10. Hortion J, Mutuku FM, Eyherabide AL, Vu DM, Boothroyd DB, Grossi-Soyster EN, et al. Acute Flavivirus and Alphavirus Infections among Children in Two Different Areas of Kenya, 2015. *Am J Trop Med Hyg.* 2019; 100(1):170–3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0297> PMID: 30457092
11. LaBeaud AD, Sutherland LJ, Muiruri S, Muchiri EM, Gray LR, Zimmerman PA, et al. Arbovirus prevalence in mosquitoes, Kenya. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(2):233–41. <https://doi.org/10.3201/eid1702.091666> PMID: 21291594
12. Vu DM, Banda T, Teng CY, Heimbaugh C, Muchiri EM, Mungai PL, et al. Dengue and West Nile Virus Transmission in Children and Adults in Coastal Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 96(1):141–3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0562> PMID: 27821697
13. Vu DM, Mutai N, Heath CJ, Vulule JM, Mutuku FM, Ndenga BA, et al. Unrecognized Dengue Virus Infections in Children, Western Kenya, 2014–2015. *Emerg Infect Dis.* 2017; 23(11):1915–7. <https://doi.org/10.3201/eid2311.170807> PMID: 29048283
14. Diniz DFA, de Albuquerque CMR, Oliva LO, de Melo-Santos MAV, Ayres CFJ. Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. *Parasit Vectors.* 2017; 10(1):310. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2235-0> PMID: 28651558
15. Grunnill M, Boots M. How important is vertical transmission of dengue viruses by mosquitoes (*Diptera: Culicidae*)? *J Med Entomol.* 2016; 53(1):1–19. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv168> PMID: 26545718
16. Ebert D, Herre EA. The evolution of parasitic diseases. *Parasitol Today.* 1996; 12(3):96–101. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)80668-5](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)80668-5) PMID: 15275238
17. Lambrechts L, Scott TW. Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. *Proc Biol Sci.* 2009; 276(1660):1369–78. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1709> PMID: 19141420
18. Ndenga BA, Mutuku FM, Ngugi HN, Mbakaya JO, Aswani P, Musunzaji PS, et al. Characteristics of *Aedes aegypti* adult mosquitoes in rural and urban areas of western and coastal Kenya. *PLoS One.* 2017; 12(12):e0189971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189971> PMID: 29261766
19. Ngugi HN, Mutuku FM, Ndenga BA, Musunzaji PS, Mbakaya JO, Aswani P, et al. Characterization and productivity profiles of *Aedes aegypti* (L.) breeding habitats across rural and urban landscapes in western and coastal Kenya. *Parasit Vectors.* 2017; 10(1):331. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2271-9> PMID: 28701194
20. Vazquez-Prokopec GM, Galvin WA, Kelly R, Kitron U. A new, cost-effective, battery-powered aspirator for adult mosquito collections. *J Med Entomol.* 2009; 46(6):1256–9. <https://doi.org/10.1603/033.046.0602> PMID: 19960668
21. Chadee DD, Doon R, Severson DW. Surveillance of dengue fever cases using a novel *Aedes aegypti* population sampling method in Trinidad, West Indies: the cardinal points approach. *Acta Trop.* 2007; 104(1):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.06.006> PMID: 17803949
22. Gillett J, Smith J. Common African mosquitoes and their medical importance. London: William Heinemann Medical Books Limited; 1972.
23. Waggoner JJ, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Ballesteros G, Davila MJ, Tellez Y, et al. Single-Reaction Multiplex Reverse Transcription PCR for Detection of Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(7):1295–7. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160326> PMID: 27184629
24. Waggoner JJ, Ballesteros G, Gresh L, Mohamed-Hadley A, Tellez Y, Sahoo MK, et al. Clinical evaluation of a single-reaction real-time RT-PCR for pan-dengue and chikungunya virus detection. *J Clin Virol.* 2016; 78:57–61. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.01.007> PMID: 26991052
25. Katholi CR, Unnasch TR. Important experimental parameters for determining infection rates in arthropod vectors using pool screening approaches. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74(5):779–85. PMID: 16687680
26. Wiwanitkit S aWV. Chikungunya virus infection and relationship to rainfall, the relationship study from southern Thailand. *Journal of Arthropod-Borne Diseases.* 2013; 7(2):185–7. PMID: 24409444
27. Agarwal A, Dash PK, Singh AK, Sharma S, Gopalan N, Rao PV, et al. Evidence of experimental vertical transmission of emerging novel ECSA genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(7):e2990. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002990> PMID: 25080107
28. Chompoosri J, Thavara U, Tawatsin A, Boonserm R, Phumee A, Sangkitporn S, et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasit Vectors.* 2016; 9:227. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1505-6> PMID: 27108077
29. Wong HV, Vythilingam I, Sulaiman WY, Lulla A, Merits A, Chan YF, et al. Detection of Persistent Chikungunya Virus RNA but not Infectious Virus in Experimental Vertical Transmission in *Aedes aegypti*

- from Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 94(1):182–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0318> PMID: 26598564
30. Mourya DT. Absence of transovarial transmission of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* & *Ae. albopictus* mosquitoes. *Indian J Med Res.* 1987; 85:593–5. PMID: 3666861
  31. Hailin Z YZ, Zhuqing M. Transovarial transmission of chikungunya virus in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Chin J Virol.* 1993; 9:222–7.
  32. Honorio NA, Wiggins K, Eastmond B, Camara DCP, Alto BW. Experimental Vertical Transmission of Chikungunya Virus by Brazilian and Florida *Aedes Albopictus* Populations. *Viruses.* 2019; 11(4).
  33. Mavale M, Parashar D, Sudeep A, Gokhale M, Ghodke Y, Geevarghese G, et al. Venereal transmission of chikungunya virus by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83(6):1242–4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0577> PMID: 21118928
  34. Zytoon EM, el-Belbasi HI, Matsumura T. Transovarial transmission of chikungunya virus by *Aedes albopictus* mosquitoes ingesting microfilariae of *Dirofilaria immitis* under laboratory conditions. *Microbiol Immunol.* 1993; 37(5):419–21. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1993.tb03232.x> PMID: 8394983
  35. Vazeille M, Mousson L, Failloux AB. Failure to demonstrate experimental vertical transmission of the epidemic strain of Chikungunya virus in *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(4):632–5. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000400017> PMID: 19722089
  36. Jain J, Kushwah RBS, Singh SS, Sharma A, Adak T, Singh OP, et al. Evidence for natural vertical transmission of chikungunya viruses in field populations of *Aedes aegypti* in Delhi and Haryana states in India—a preliminary report. *Acta Trop.* 2016; 162:46–55. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.004> PMID: 27282096
  37. Thavara U, Tawatsin A, Pongsakul T, Bhakdeenuan P, Chanama S, Anantapreecha S, et al. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009; 40(5):951–62. PMID: 19842379
  38. Bara JJ, Clark TM, Remold SK. Susceptibility of larval *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to dengue virus. *J Med Entomol.* 2013; 50(1):179–84. <https://doi.org/10.1603/me12140> PMID: 23427668
  39. Miller BR, DeFoliart GR, Hansen WR, Yuill TM. Infection rates of *Aedes triseriatus* following ingestion of La Crosse virus by the larvae. *Am J Trop Med Hyg.* 1978; 27(3):605–8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.605> PMID: 27990
  40. Turell MJ, Linthicum KJ, Beaman JR. Transmission of Rift Valley fever virus by adult mosquitoes after ingestion of virus as larvae. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43(6):677–80. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.677> PMID: 2267972
  41. Angel A, Angel B, Joshi V. Rare occurrence of natural transovarial transmission of dengue virus and elimination of infected foci as a possible intervention method. *Acta Trop.* 2016; 155:20–4. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.018> PMID: 26655042
  42. Angel B, Joshi V. Distribution and seasonality of vertically transmitted dengue viruses in *Aedes* mosquitoes in arid and semi-arid areas of Rajasthan, India. *J Vector Borne Dis.* 2008; 45(1):56–9. PMID: 18399318
  43. Arunachalam N TS, Thenmozhi V, Rajendran R, Paramasivan R, Manavalan R, Ayanar K, Tyagi BK. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J Med Res.* 2008; 127(4):395–7. PMID: 18577796
  44. Cecilio SG, Junior WF, Totola AH, de Brito Magalhaes CL, Ferreira JM, de Magalhaes JC. Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae from southeastern Brazil. *J Vector Ecol.* 2015; 40(1):71–4. <https://doi.org/10.1111/jvec.12134> PMID: 26047186
  45. Cruz LC, Serra OP, Leal-Santos FA, Ribeiro AL, Silhessarenko RD, Santos MA. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiaba, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48(1):18–25. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0264-2014> PMID: 25860459
  46. da Costa CF, Dos Passos RA, Lima JBP, Roque RA, de Souza Sampaio V, Campolina TB, et al. Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. *Parasit Vectors.* 2017; 10(1):249. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2194-5> PMID: 28526066
  47. de Figueiredo ML, de CGA, Amarilla AA, de SLA, de SOA, de Araujo RF, et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Virol J.* 2010; 7:152. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-152> PMID: 20624314
  48. Dutta P, Khan SA, Chetry S, Dev V, Sarmah CK, Mahanta J. First evidence of dengue virus infection in wild caught mosquitoes during an outbreak in Assam, Northeast India. *J Vector Borne Dis.* 2015; 52(4):293–8. PMID: 26714508

49. Guedes DR, Cordeiro MT, Melo-Santos MA, Magalhaes T, Marques E, Regis L, et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *J Vector Borne Dis*. 2010; 47(2):67–75. PMID: [20539043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20539043/)
50. Günther J, Martinez-Munoz JP, Perez-Ishiwara DG, Salas-Benito J. Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. *Intervirology*. 2007; 50(5):347–52. <https://doi.org/10.1159/000107272> PMID: [17700030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17700030/)
51. Gutierrez-Bugallo G, Rodriguez-Roche R, Diaz G, Vazquez AA, Alvarez M, Rodriguez M, et al. First record of natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* from Cuba. *Acta Trop*. 2017; 174:146–8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.012> PMID: [28720490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28720490/)
52. Hull B, Tikasingh E, de Souza M, Martinez R. Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg*. 1984; 33(6):1248–50. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1984.33.1248> PMID: [6542323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6542323/)
53. Khin MM, Than KA. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am J Trop Med Hyg*. 1983; 32(3):590–4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.590> PMID: [6859404](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6859404/)
54. Martinez NE, Dzul-Manzanilla F, Gutierrez-Castro C, Ibarra-Lopez J, Bibiano-Marin W, Lopez-Damian L, et al. Natural vertical transmission of dengue-1 virus in *Aedes aegypti* populations in Acapulco, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc*. 2014; 30(2):143–6. <https://doi.org/10.2987/14-6402.1> PMID: [25102601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25102601/)
55. Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araujo FM, De Simone SG, Dutra RF, et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceara, Brazil. *PLoS One*. 2012; 7(7):e41386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041386> PMID: [22848479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22848479/)
56. Rohani A, Aidil Azahary AR, Malinda M, Zurainee MN, Rozilawati H, Wan Najdah WM, et al. Eco-virological survey of *Aedes* mosquito larvae in selected dengue outbreak areas in Malaysia. *J Vector Borne Dis*. 2014; 51(4):327–32. PMID: [25540966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25540966/)
57. Serufo JC, de Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, et al. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993; 88(3):503–4. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761993000300025> PMID: [8107613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8107613/)
58. Thavara U, Siriyasatien P, Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Anantapreecha S, Wongwanich R, et al. Double infection of heteroserotypes of dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and serological features of dengue viruses found in patients in southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37(3):468–76. PMID: [17120966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17120966/)
59. Thenmozhi V, Tewari SC, Manavalan R, Balasubramanian A, Gajanana A. Natural vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* in southern India. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000; 94(5):507. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(00\)90067-1](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90067-1) PMID: [11132376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11132376/)
60. Thongrungrat S, Maneekan P, Wasinpiyamongkol L, Prummongkol S. Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. *J Vector Ecol*. 2011; 36(1):147–52. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00151.x> PMID: [21635652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21635652/)
61. Thongrungrat S, Wasinpiyamongkol L, Maneekan P, Prummongkol S, Samung Y. Natural transovarial dengue virus infection rate in both sexes of dark and pale forms of *Aedes aegypti* from an urban area of Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2012; 43(5):1146–52. PMID: [23431820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23431820/)
62. Velandia-Romero ML, Olano VA, Coronel-Ruiz C, Cabezas L, Calderon-Pelaez MA, Castellanos JE, et al. Dengue virus detection in *Aedes aegypti* larvae and pupae collected in rural areas of Anapoima, Cundinamarca, Colombia. *Biomedica*. 2017; 37(0):193–200. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3584> PMID: [29161491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29161491/)
63. Zeidler JD, Acosta PO, Barreto PP, Cordeiro Jda S. Dengue virus in *Aedes aegypti* larvae and infestation dynamics in Roraima, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2008; 42(6):986–91. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102008005000055> PMID: [19031506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19031506/)
64. Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, et al. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc Biol Sci*. 2011; 278(1717):2446–54. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2469> PMID: [21227970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21227970/)
65. LaBeaud AD, Banda T, Brichard J, Muchiri EM, Mungai PL, Mutuku FM, et al. High rates of o'nyong nyong and Chikungunya virus transmission in coastal Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(2):e0003436. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003436> PMID: [25658762](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25658762/)
66. Konongoi L, Ofula V, Nyunja A, Owaka S, Koka H, Makio A, et al. Detection of dengue virus serotypes 1, 2 and 3 in selected regions of Kenya: 2011–2014. *Virology*. 2016; 13(1):182. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0641-0> PMID: [27814732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27814732/)

67. Mease LE, Coldren RL, Musila LA, Prosser T, Ogolla F, Ofula VO, et al. Seroprevalence and distribution of arboviral infections among rural Kenyan adults: a cross-sectional study. *Virology*. 2011; 8:371. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-371> PMID: 21794131
68. Sutherland LJ, Cash AA, Huang YJ, Sang RC, Malhotra I, Moormann AM, et al. Serologic evidence of arboviral infections among humans in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(1):158–61. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0203> PMID: 21734142
69. Waggoner J, Brichard J, Mutuku F, Ndenga B, Heath CJ, Mohamed-Hadley A, et al. Malaria and chikungunya detected using molecular diagnostics among febrile Kenyan children. *Open Form Infect Dis*. 2017; 4(3):oxf110.
70. Queyriaux B, Simon F, Grandadam M, Michel R, Tolou H, Boutin JP. Clinical burden of chikungunya virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8(1):2–3. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70294-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70294-3) PMID: 18156079
71. Sissoko D, Moendandze A, Malvy D, Giry C, Ezzedine K, Solet JL, et al. Seroprevalence and risk factors of chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005–2006: a population-based survey. *PLoS One*. 2008; 3(8):e3066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003066> PMID: 18725980
72. Pezzi L, Reusken CB, Weaver SC, Drexler JF, Busch M, LaBeaud AD, et al. GIoPID-R report on Chikungunya, O'nyong-nyong and Mayaro virus, part I: Biological diagnostics. *Antiviral Res*. 2019; 166:66–81. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.03.009> PMID: 30905821

## Acute Flavivirus and Alphavirus Infections among Children in Two Different Areas of Kenya, 2015

Jimmy Hortion,<sup>1,2\*</sup> Francis M. Mutuku,<sup>3</sup> Ana L. Eyherabide,<sup>4</sup> David M. Vu,<sup>2</sup> Derek B. Boothroyd,<sup>5</sup> Elyse N. Grossi-Soyster,<sup>4</sup> Charles H. King,<sup>6</sup> Bryson A. Ndenga,<sup>7</sup> and A. Desiree LaBeaud<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Département de Biologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; <sup>2</sup>Division of Infectious Diseases, Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California; <sup>3</sup>Department of Environment and Health Sciences, Technical University of Mombasa, Mombasa, Kenya; <sup>4</sup>Departamento de Pediatría, Sanatorio de Niños, Rosario, Argentina; <sup>5</sup>Quantitative Science Unit, Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California; <sup>6</sup>Center for Global Health and Diseases, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio; <sup>7</sup>Centre for Global Health Research, Kenya Medical Research Institute, Kisumu, Kenya

**Abstract.** Alphaviruses and flaviviruses are known to be endemic in Eastern Africa, but few data are available to evaluate the prevalence of these infections. This leads to missed opportunities for prevention against future outbreaks. This cohort study investigated the frequency of alphavirus and flavivirus incident infections in two regions of Kenya and identified potential risk factors. Seroconversions for alphavirus and flavivirus infections were identified by immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) in a cohort of 1,604 acutely ill children over the year 2015. The annual incidence was 0.5% (0.2–1.2%) for alphaviruses and 1.2% (0.7–2.2%) for flaviviruses. Overall, seroprevalence was significantly higher for alphaviruses in western Kenya than on the coast ( $P = 0.014$ ), whereas flavivirus seroprevalence was higher on the coast ( $P = 0.044$ ). Poverty indicators did not emerge as risk factors, but reliance on household water storage was associated with increased exposure to both alphaviruses and flaviviruses (odds ratio = 2.3).

Sub-Saharan African residents are at high risk for several arboviral infections, but regional surveillance data are scarce, and, therefore, the full burden of exposure and disease is unknown. Dengue (DENV, *Flavivirus*) and chikungunya (CHIKV, *Alphavirus*) infections are both characterized by an acute febrile syndrome, which can be difficult to distinguish clinically from malaria without effective diagnostics. In an attempt to fill in the gap in knowledge about arboviral transmission, we started a surveillance study in January 2014 among children in Kenya. Whereas the comprehensive study was carried out until June 2018, this preliminary assessment reports results from testing of blood samples obtained during 2015. It characterizes the status of transmission of these viruses, and provides information important to public health institutions. We detected cases of acute febrile illness (AFI) caused by alphaviruses and flaviviruses among children and found a difference in prevalence between coastal and western Kenya. We also identified factors associated with risk of infection: practicing outdoor activity and using unreliable water sources.

We enrolled a cohort of 1- to 17-year-old acutely ill subjects presenting at one of four health-care centers (Kisumu and Chulaimbo in western Kenya, and Ukunda and Msambweni in coastal Kenya). In both regions of Kenya, we selected centers located in an urban area (Kisumu and Ukunda) and a rural area (Chulaimbo and Msambweni). Subjects' blood was drawn at the initial visit and again during a follow-up visit (3–6 weeks later). Sera from these paired samples were tested by ELISA for CHIKV and DENV IgG. Seroconversion was defined as having negative serum IgG at the initial visit, but a positive serum IgG at the follow-up visit. Although we tested the samples using inactivated DENV and CHIKV as ELISA antigens, antibodies to other flaviviruses and alphaviruses have been reported to cross-react with DENV and CHIKV, respectively.<sup>1,2</sup> Because of uncertainty in viral specificity of the antibodies, henceforth, we refer to results from our DENV

and CHIKV assays as flavivirus and alphavirus results, respectively. The positive controls used for the ELISAs were made with pooled sera that had neutralizing antibodies for DENV or CHIKV exclusively, without other traces of flavivirus or alphavirus infection (plaque reduction neutralization test). Written informed consent was obtained from the parents of all study subjects and assent from all children older than the age of 7 years. Protocols were approved by the Stanford University Institutional Review Board (IRB-31488) and the Kenya Medical Research Institute Scientific and Ethical Review Unit (protocol 2611). In addition, we collected behavioral and environmental data at each patient visit and performed association tests to identify potential risk factors for alphavirus or flavivirus infections. Seroprevalence and seroincidence 95% confidence intervals (CIs) were calculated using the Wilson/Brown method. Categorical comparisons were tested by chi-square or Fisher's exact test; continuous comparisons were tested by *t*-test; and odds ratios (OR) and their CIs were calculated with an online calculator.<sup>3</sup>

Between December 2014 and December 2015, 1,604 child participants were enrolled in the study, 968 (60%) of whom completed a follow-up visit. Seroprevalence was calculated for the whole cohort, including both acute and follow-up visit results (seropositive at any time point of the study), whereas seroincidence was calculated among those with paired serum samples. More participants were enrolled at the coastal sites ( $n = 1,118$ ) than at the western sites ( $n = 486$ ). Western subjects were younger than their coastal counterparts (mean age 4.4 versus 5.9 years, respectively,  $P < 0.001$ ), with no significant clinical impact on the study however. Fifty-one percent of the cohort were female, with no difference in the proportion of male and female subjects enrolled at each site ( $P = 0.77$ ). We identified 12 flavivirus seroconversions (Chulaimbo: 7, Msambweni: 4, and Ukunda: 1) and five alphavirus seroconversions (Kisumu: 1, Msambweni: 1, Ukunda: 3). Flavivirus seroincidence was 1.2% (95% CI: 0.7–2.2%) and alphavirus seroincidence was 0.5% (95% CI: 0.2–1.2%). We observed no significant difference between alphavirus and flavivirus incidence in our cohort (5/968 versus 12/968, respectively,  $P = 0.14$ ). Ten of the 17 total seroconversions (59%) occurred between January 2015 and February 2015, suggesting an

\*Address correspondence to Jimmy Hortion, Département de Biologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon 69342, France. E-mail: jimmy.hortion@ens-lyon.fr

enhanced viral transmission during this period. No concurrent flavivirus/alphavirus coinfection was observed.

Fisher's exact test was used to perform the following pair-wise comparisons, with an original  $P$ -value threshold of  $\alpha = 0.05$ , adjusted to  $\alpha = 0.01$  after the Bonferroni correction. Overall, flavivirus seroprevalence (3.7%, 60/1,604) was significantly higher than alphavirus seroprevalence (2.1%, 34/1,604,  $P = 0.009$ ). Alphavirus seropositivity was more frequent among subjects from western Kenya (3.5%, 17/486) than among subjects from coastal Kenya (1.5%, 17/1,118,  $P = 0.014$ , Figure 1B), whereas flavivirus seropositivity was significantly higher among the coastal subjects (4.4%, 49/1,118) than among the western subjects (2.3%, 11/486,  $P = 0.044$ , Figure 1B). We observed no difference in flavivirus exposure, comparing urban with rural sites (3.6%, 29/817 versus 3.9%, 31/787, respectively,  $P = 0.70$ ), or in alphavirus exposure (2.6%, 21/817 versus 1.7%, 13/787, respectively,  $P = 0.23$ ). As expected, we found that seroprevalence of both viruses increased with age (Figure 1C and D). Moreover, the older group of children we included in this study was composed of secondary school students, and this age proxy was highly associated with a higher seroprevalence for alphaviruses, compared with younger groups (OR = 19.2, 95% CI: 5.7–65.1).

All household environment and clinical parameters were tested independently for association with alphavirus and

flavivirus seropositivity (Table 1). Patients with positive serology at any time point of the study (initial or follow-up visit) were included in the seropositive group. Poverty indicators (not owning a radio, a TV, a motorized vehicle, or a telephone, or not employing a domestic worker) were not significantly associated with alphavirus or flavivirus seroprevalence. Of note, use of water sources requiring intermediate water storage near the household (i.e., inside well; river or pond; rain water; and water truck) instead of public water sources (public tap or well) was significantly associated with higher probability of being exposed to both alphaviruses and flaviviruses (OR = 2.3, 95% CI: 1.0–5.4 and OR = 2.3, 95% CI: 1.2–4.3, respectively). Children who reported outdoor activity were more likely to be infected by both alphaviruses and flavivirus (OR = 3.6, 95% CI: 1.1–11.8 and OR = 2.0, 95% CI: 1.0–3.8, respectively). Also, contrary to common perceptions, children who always slept under a bed net were not significantly protected against alphaviruses (OR = 0.6, 95% CI: 0.3–1.5) or flaviviruses (OR = 1.0, 95% CI: 0.5–1.9) compared with those who never used bed nets or used them only occasionally.

Alphaviruses and flaviviruses were the probable cause of AFI in about 2% of children tested in this yearlong study. Although these incidence rates are low and cannot be extrapolated to central Kenyan highlands, 2% of AFI in the lowlands of Kenya potentially translates to thousands of missed cases

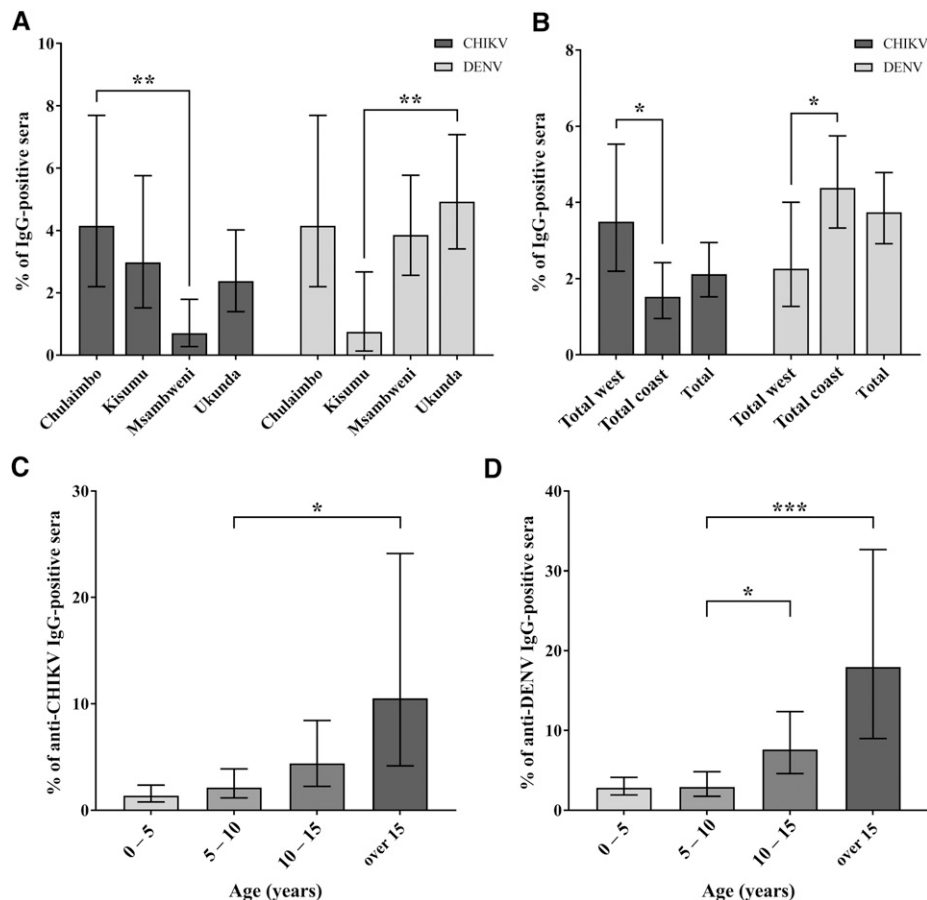


FIGURE 1. Alphavirus and flavivirus seroprevalence. Seroprevalence was assessed by anti-IgG ELISA. \* =  $P \leq 0.05$ , \*\* =  $P \leq 0.01$ , \*\*\* =  $P \leq 0.001$ , all  $P$ -values were calculated using pair-wise Fisher's exact test. (A) Alphavirus, as represented by "chikungunya (CHIKV)," and flavivirus, as represented by "Dengue (DENV)," seroprevalence by study site. (B) Alphavirus and flavivirus seroprevalence by western or coastal location. (C and D) Alphavirus and flavivirus seroprevalence by respective age range.

TABLE 1  
Household environment and exposure to alphavirus and flavivirus infections

Parameter	Risk factors tested	CHIKV association	DENV association
<b>Behavior and exposure</b>			
Child occupation (proxy for age)	0–2 years vs. nursery school vs. primary school student vs. <b>secondary school student</b>	<b><i>P</i> &lt; 0.001</b>	<b><i>P</i> &lt; 0.001</b>
Outdoor activity	<b>Secondary school student</b> vs. other occupations <b>Child reports outdoor activities</b> vs. child does not report outdoor activity	<b>19.2 (5.7–65.1)</b> <b>3.6 (1.1–11.8)</b>	1.7 (0.2–12.9) <b>2.0 (1.0–3.8)</b>
<b>Household and supplies</b>			
Number of other children living in the house	0 vs. 1–2 vs. 3–5 vs. <b>6 or more</b>	<i>P</i> = 0.46	<b><i>P</i> = 0.039</b>
Roof type	Natural material vs. <b>corrugated iron</b>	<b>2.8 (1.2–6.1)</b>	0.7 (0.4–1.1)
Floor type	Dirt vs. wood vs. <b>cement</b> vs. tile <b>Cement</b> vs. other floor types	<b><i>P</i> = 0.022</b> <b>3.0 (1.5–6.2)</b>	<i>P</i> = 0.25 –
Water source	River or pond vs. rain water vs. public well vs. inside well vs. public tap vs. water truck <b>(River or pond or rain water or inside well or water truck)</b> vs. (public well or public tap)*	<b><i>P</i> &lt; 0.001</b> <b>2.3 (1.0–5.4)</b>	<b><i>P</i> = 0.016</b> <b>2.3 (1.2–4.3)</b>
Light source	<b>Electricity line</b> vs. paraffin vs. solar <b>Electricity line</b> vs. other light sources	<b><i>P</i> = 0.042</b> <b>2.6 (1.3–5.2)</b>	<i>P</i> = 0.37 –

CHIKV = chikungunya virus; DENV = dengue virus; OR = odds ratio. Alphavirus and flavivirus associations are based, respectively, on CHIKV and DENV serological data. Differences between all groups were assessed by *n*-way Fisher's exact test (italicized *P*-values). When a significant difference was noted between all the groups (*P*-value in bold), OR (in straight letters) was calculated to assess association between the highest risk entry (in bold letters) and alphavirus or flavivirus infection.

\* OR was used to compare water sources associated with water storage (in bold) in the household vs. other water sources. *P*-values and OR in bold are meeting significance (*P* ≤ 0.05, OR 95% confidence interval ≥ 1).

of alphavirus and flavivirus infection per year.<sup>4</sup> These are likely underestimates of the true seroincidence, as our study only included acutely ill patients presenting to clinics, excluding mild or asymptomatic cases.<sup>5,6</sup> Moreover, investigating seroconversions allowed us to identify only primary infections, as previously infected patients were already IgG positive; thus, this technique does not screen the secondary infections, even with another flavivirus or alphavirus. Interestingly, we documented a significantly higher alphavirus seroprevalence inland than on the Indian Ocean coast, whereas flavivirus seroprevalence exhibited the opposite pattern. These differences have been described in previous studies and suggest that transmission is not only determined by vector abundance but also differs regionally in Kenya.<sup>7–10</sup> A better clinical characterization of these infections is desirable to improve the quality of care given to patients.<sup>11</sup> More importantly, we know that underlying endemic transmission constitutes a risk for future arboviral epidemics in other areas of Kenya, as it has occurred recently for CHIKV along the coastal islands and for DENV in northern cities and in Mombasa.<sup>12–14</sup> Seven (41%) of the 17 seroconversions that we identified occurred during dry periods (monthly rainfall ≤ 50 mm, corresponding to 25% of the months with data collected), which suggests that relative drought increases the risk of exposure to arboviruses in Kenya, as previously shown for CHIKV.<sup>15</sup> The use of unreliable water sources and unprotected water storage during these periods seem to have a strong impact on arboviral exposure.<sup>16,17</sup>

Received April 6, 2018. Accepted for publication September 6, 2018.

Published online November 19, 2018.

**Acknowledgments:** We would like to thank all the participants in our study, the field workers, and the clinicians and staff from the health-care centers in Kenya. We also thank Terence Dermody for giving us the plasmid pSinRep5-181/25ic (Addgene plasmid #60078).

**Conflicts of Interest:** C. K. and D. L. report grants from National Institutes of Health during the conduct of the study.

**Authors' addresses:** Jimmy Hortion, Département de Biologie, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France, E-mail: jimmy.hortion@ens-lyon.fr. Francis M. Mutuku, Department of Environment and Health

Sciences, Technical University of Mombasa, Mombasa, Kenya, E-mail: frmutuku73@gmail.com. Ana L. Eyherabide, Departamento de Pediatría, Sanatorio de Niños, Rosario, Argentina, E-mail: anaeyherabide@gmail.com. David M. Vu, Elysse N. Grossi-Soyster, and A. Desiree LaBeaud, Division of Infectious Diseases, Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, E-mails: davidvu@stanford.edu, elysse@stanford.edu, and dlabead@stanford.edu. Derek B. Boothroyd, Quantitative Science Unit, Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, E-mail: derekb@stanford.edu. Charles H. King, Center for Global Health and Diseases, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, E-mail: chk@case.edu. Bryson A. Ndenga, Centre for Global Health Research, Kenya Medical Research Institute, Kisumu, Kenya, E-mail: bndenga@yahoo.com.

## REFERENCES

1. Vu DM et al., 2017. Dengue and West Nile virus transmission in children and adults in coastal Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 96: 141–143.
2. LaBeaud AD et al., 2015. High rates of O'nyong nyong and chikungunya virus transmission in coastal Kenya. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003436.
3. Select Statistical Services, 2017. *Odds Ratio—Confidence Interval—Select Statistical Consultants, 2017*. Available at: <https://select-statistics.co.uk/calculators/confidence-interval-calculator-odds-ratio>. Accessed June 17, 2017.
4. O'Meara WP et al., 2015. Etiology of pediatric fever in western Kenya: a case-control study of falciparum malaria, respiratory viruses, and streptococcal pharyngitis. *Am J Trop Med Hyg* 92: 1030–1037.
5. Rafique I, Saqib MAN, Munir MA, Qureshi H, Taseer I-H, Iqbal R, Ahmed W, Akhtar T, Rizwanullah, 2017. Asymptomatic dengue infection in adults of major cities of Pakistan. *Asian Pac J Trop Med* 10: 1002–1006.
6. Yoon I-K et al., 2015. High rate of subclinical chikungunya virus infection and association of neutralizing antibody with protection in a prospective cohort in the Philippines. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003764.
7. Sutherland LJ, Cash AA, Huang Y-JS, Sang RC, Malhotra I, Moormann AM, King CL, Weaver SC, King CH, LaBeaud AD, 2011. Serologic evidence of arboviral infections among humans in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 85: 158–161.
8. Mease LE, Coldren RL, Musila LA, Prosser T, Ogolla F, Ofula VO, Schoepp RJ, Rossi CA, Adungo N, 2011. Seroprevalence and



- distribution of arboviral infections among rural Kenyan adults: a cross-sectional study. *Virology* 8: 371.
9. Cromwell EA, Stoddard ST, Barker CM, Van Rie A, Messer WB, Meshnick SR, Morrison AC, Scott TW, 2017. The relationship between entomological indicators of *Aedes aegypti* abundance and dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0005429.
  10. Bowman LR, Runge-Ranzinger S, McCall PJ, 2014. Assessing the relationship between vector indices and dengue transmission: a systematic review of the evidence. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2848.
  11. Vu DM, Mutai N, Heath CJ, Vulule JM, Mutuku FM, Ndenga BA, LaBeaud AD, 2017. Unrecognized dengue virus infections in children, 2014–2015. *Emerg Infect Dis* 23: 1915–1917.
  12. Sang RC, Dunster LM, 2001. The growing threat of arbovirus transmission and outbreaks in Kenya: a review. *East Afr Med J* 78: 655–661.
  13. Kariuki Njenga M, Nderitu L, Ledermann JP, Ndirangu A, Logue CH, Kelly CHL, Sang R, Serگون K, Breiman R, Powers AM, 2008. Tracking epidemic chikungunya virus into the Indian ocean from east Africa. *J Gen Virol* 89: 2754–2760.
  14. Lutomia J et al., 2016. Dengue outbreak in Mombasa city, Kenya, 2013–2014: entomologic investigations. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0004981.
  15. Chretien J-P et al., 2007. Drought-associated chikungunya emergence along coastal east Africa. *Am J Trop Med Hyg* 76: 405–407.
  16. Ngugi HN et al., 2017. Characterization and productivity profiles of *Aedes aegypti* (L.) breeding habitats across rural and urban landscapes in western and coastal Kenya. *Parasit Vectors* 10: 331.
  17. Ndenga BA, Mutuku FM, Ngugi HN, Mbakaya JO, Aswani P, Musunzaji PS, Vulule J, Mukoko D, Kitron U, LaBeaud AD, 2017. Characteristics of *Aedes aegypti* adult mosquitoes in rural and urban areas of western and coastal Kenya. *PLoS One* 12: e0189971.