



**HAL**  
open science

# Étude fonctionnelle des interactions génétiques du virus Zika avec les réponses antivirales de l'hôte

Vincent Grass

► **To cite this version:**

Vincent Grass. Étude fonctionnelle des interactions génétiques du virus Zika avec les réponses antivirales de l'hôte. Virologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSEN010 . tel-01910815

**HAL Id: tel-01910815**

**<https://theses.hal.science/tel-01910815v1>**

Submitted on 2 Nov 2018

**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 : **2018LYSEN010**

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée par

**l'Ecole Normale Supérieure de Lyon**

**Ecole Doctorale N° 340**

**Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Immunologie, Virologie

**Discipline** : Biologie

Soutenue publiquement le 22/05/2018, par :

**Vincent GRASS**

---

# Etude fonctionnelle des interactions génétiques du virus Zika avec les réponses antivirales de l'hôte

---

Devant le jury composé de :

JOUVENET Nolwenn, Chargée de recherche HDR, Institut Pasteur, Paris, Rapporteuse  
LUPBERGER Joachim, Chargé de recherche HDR, Institut de recherche sur les maladies virales et hépatiques, Strasbourg, Rapporteur  
HENRY Thomas, Directeur de recherche, Centre international de recherche en infectiologie, Lyon, Examineur  
LEBECQUE Serge, Professeur des universités, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Examineur  
MEURS Eliane, Directrice de recherche, Institut Pasteur, Paris, Examinatrice  
DREUX Marlène, Chargée de recherche HDR, Centre international de recherche en infectiologie, Lyon, Directrice de thèse

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr. Nolwenn Jouvenet et le Dr. Joachim Lupberger pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse et membres du jury de thèse, mais également pour leurs disponibilités et leurs encouragements. Je remercie également les autres membres de mon jury de thèse, le Dr. Eliane Meurs, le Dr. Mathilde Gendrin, le Dr. Serge Lebecque et le Dr. Thomas Henry qui ont pris le temps et l'énergie de juger mon travail de thèse. Enfin, je remercie le Dr. Valérie Choumet et le Dr. Sylvain Baize pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivie de thèse au cours de ces 3 ans de thèse. Leur aide scientifique et humaine a été indispensable à la réalisation de cette thèse.

Je remercie ma directrice de thèse, le Dr. Marlène Dreux, pour m'avoir fait confiance en me proposant une thèse dans son équipe naissante. La confiance s'est parfois effilée selon les périodes, mais cela n'a jamais empêché des discussions passionnantes et la mise en place de sujets originaux et motivants. Tu m'as appris beaucoup sur des notions théoriques, mais tu m'as surtout permis de mieux organiser ma recherche scientifique et à canaliser mes idées. J'étais un gamin qui courait partout, je suis maintenant un adulte qui prend le temps de profiter du paysage ! J'en profite également pour remercier Yvon, le guerrier de l'ombre, qui a, je le pense, désamorcé de nombreux problèmes durant ma thèse.

Bien sûr, cet apprentissage c'est fait avec et grâce aux membres, passés et présents, de l'équipe VIV. Tout d'abord, merci à Brian *i*) pour m'avoir toléré comme coloc' de bureau pendant tout ce temps sans jamais se plaindre, *ii*) pour ces moments de folies dans le labo (la musique à fond), et *iii*) pour ton aide considérable dans la compréhension des problèmes des différents projets et dans la bonne pratique de la biologie moléculaire. J'avais parié que tu resterais en France, j'ai perdu... A Sonia, je commencerai par m'excuser. Désolé pour toutes ces blagues (pas toujours fines), ces bastons amicales, et pour t'avoir si souvent ridiculiser lors de nos *blind test* en culture cell ! Merci surtout pour ton aide lors de mon arrivée dans l'équipe, ton soutien moral dans les moments durs et surtout ta joie de vivre. On vient de loin (sens propre, comme figuré) et on ira loin ma p'tite Mamacrophage ! A notre pilier, Elodie, je la remercie pour son aide lors de mon accueil dans l'équipe et tous ses bons délires. On était capable de s'engueuler et de rigoler dans la même journée, toujours autour d'une bonne clope. Je suis un peu obligé de le mettre dans les remerciements, sinon, je serai pas dans les siens lors de la publication de son article, alors un grand merci à Séverin pour sa folie. Folie de vie

(rien ne sera divulgué) et folie de manip ! Tu m'as montré les bons coté quand je voyais que les mauvais et tu été là quand tout le monde rentrait (au labo comme en soirée). Tu es capable de grandes choses, perds pas la motiv' et arrête de procrastiné bordel ! Aux petits nouveaux postdoc (Sara aka « guapita » et Dong), je vous souhaite la plus belle des sciences et un expérience française exceptionnelle ! A ma bench-budy, Emilie, je te remercie pour ton efficacité et ton fun. Et surtout : ALLEZ L'OM ! A ma jeune padawan, Coralie aka « Cocolabo », je te remercie de garder un tel enthousiasme à la Science et à faire de l'évolution expérimentale : je vois une belle thèse qui s'annonce pour toi... Have fun !!! Enfin, merci à mes cellules de moustique et à *Sphingomonas* pour cette torture qui, au final, m'a grandit.

Merci à François-Loïc Cosset pour son accueil au CIRI, mais également au sein de son équipe au début de ma thèse. Merci également à la confiance donnée pour essayer de faire proliférer l'association CIRI'PAMP. A l'équipe EVIR, je lance un grand MERCI pour son soutien et tous ces bons moments passés ensemble. Alors encore une fois, merci Florian, Didier, Bébert, Flo, Fouzi, Gigi, Cricri, Caro, Camille, Solène et j'en passe ! Petite dédicace spéciale de Panpan pour Didier et Bertrand qui m'ont donné les bases d'une bonne manipulation en laboratoire, pour ces super discussions et pour m'avoir éviter de me faire amputer le pied.

Merci à mes différents collaborateurs pour m'avoir permis de toucher des domaines que je ne connaissais pas. Merci au Dr. Philippe Bullet pour avoir redonné un futur au projet moustique. Merci au Dr. Bastien Boussau pour ses travaux de bioinformatique et ses longs échanges pleins de challenges. Merci aux membres du PLATIM pour leur disponibilité et leur aide tout au long de ma thèse. Je prends également le temps de remercier tous les professeurs qui ont cru en moi lors de mes études supérieurs et qui ont pris le pari de me donner ma chance, principalement à Strasbourg où mon amour pour la virologie à exploser grâce à vous.

A parti de là, il va falloir m'excuser, mais je ne vais pas pouvoir tous vous citer... Je pense aux personnes du CIRI, du LBMC, du RDP et même de l'IGFL avec qui j'ai partagé de longues discussions scientifiques (et quelques bières). La beauté de ces 4 ans à l'ENS a été pour moi de pouvoir parler de biologie, qu'elle soit microbiologique, développementale ou végétale, d'en apprendre tous les jours de tout le monde et avec le sourire. Bref, la connaissance à l'état brut, le fun en plus ! Merci à vous tous, aux poses café sur les marches ou au foyer, pour ces moments inoubliables !

Merci énormément aux thésards du soir, Axel, Ludo, Sonia et Séverin (encore vous), Thibaut et Léo qui m'ont apporté soutiens, rigolade, moments improbables (4L Trophy baby !) et gueules de bois. Merci aussi à tous les autres thésards (principalement docteur maintenant) qui ont permis de rendre cette aventure folle (vous vous reconnaitrez !).

Un grand merci à mes coloc' de toujours : Lagrange power! Merci à Julie, Laurine, Steven et Léo pour ces années à vivre ensemble. Vous m'avez appris à vivre autrement, vous étiez là dans les moments de doute, mais aussi dans la plupart des moments de délire intense. Vous avez été une vraie famille pour moi... Merci à mes amis du Sud (et d'ailleurs) qui m'ont toujours soutenus dans ce choix de carrière farfelu, et qui sont toujours resté proches malgré la distance et de longs moments d'absence.

Cette fin de thèse n'aurait pas été la même, et n'aurai peut être même pas vu le jour, sans la présence de Claire à mes cotés. Un énorme merci pour ton soutien inconditionnel, ses heures de relecture de thèse et toutes tes suggestions !!! Tu dois te mettre de la javel dans les yeux en voyant toutes les fautes dans ces remerciements que tu n'as pas eu le droit de corriger...

Enfin, ceux sans qui rien de tout ça ne serait arrivé. Je remercie du plus profond de mon cœur ma famille. Sans ma mère, mon père et mon grand frère aka «Bro », je n'aurai jamais poursuivie les études supérieures. Je ne serai jamais parti de Marseille pour faire mon master lors de cette période pleine de doutes. Votre absence m'a fait revenir vers Lyon, où j'ai pu commencer cette thèse. Toujours encouragé, vous avez été ma force pendant ces 3 ans de thèse. Encore un gros MERCI à vous, je vous aime !

Je finirai par dire un grand merci à vous, lecteurs. Le fait que vous preniez le temps de lire cette thèse, ne serai-ce que quelques une de ces lignes, me touche. Que vous soyez curieux, intéressé ou passionné, je vous remercie pour votre contribution passée, présente ou future à l'édification d'un Science belle et ouverte au monde. Car faire avancer la Science, c'est faire avancer la société...

*La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas «Eureka», mais plutôt «Tiens, c'est marrant...» - Isaac Asimov*

## **ABSTRACT**

Zika virus (ZIKV) infection causes neurological diseases and birth defects representing an important threat for human health. Recent studies demonstrated that type I interferon (IFN-I) response is pivotal for the control of ZIKV spread, *in utero* transmission and protects against ZIKV-induced neurological diseases. Here, we conduct a genomic screen based study of the evolution of the viral quasi-species in response to experimental modulation of the host antiviral signaling to delineate the genetic interactions with the IFN-I/III response in ZIKV genome and the viral escape mechanisms. We first set up an experimental cell culture system to exert a selective pressure on ZIKV replication by the Toll-like receptor (TLR)-3-induced antiviral signaling. We uncovered that serially passaged ZIKV populations adapt to the antiviral response, as determined by viral resistance to TLR3-induced restriction. The adapted viruses no longer induce IFN response, as assessed by the absence of interferon-stimulated gene upregulation. Foci size analysis revealed an increased viral spread of adapted viral populations. Consistently, the specific infectivity of viral population augments in the course of serial passaging, and is temporally associated to the viral resistance to TLR3-induced restriction. Next-generation sequencing and bioinformatics analysis of the viral evolution uncovered point mutations whose frequencies consistently increase in E surface protein, temporally correlated to the acquisition of the adapted phenotype, leads to a S-to-L substitution at position 455 – lining at the edge of the amphipathic helix close to the trans-membrane domain, thus likely regulating structural stability. A second candidate is in an amphipathic helix of NS4B, predicted to span on the lumen side of the ER membrane. The E mutation is not observed in the ZIKV sequence database, thus implying such viral evolution might be unheeded *in vivo* by a trade off with other requisite viral abilities. Altogether our results uncovered that ZIKV can acquire increased replication ability associated to resistance to antiviral response, an event likely primed by the loss of sensing by the host cells.

## RÉSUMÉ

Le virus Zika (ZIKV) représente une importante menace pour la santé humaine. De récentes études démontrent que la réponse à l'interféron de type I (IFN-I) est cruciale pour le contrôle de la propagation de ZIKV et de la transmission *in utero* ainsi que la pathogénèse, dont les atteintes neurologiques induites par ZIKV. Afin de déterminer les interactions génétiques entre la réponse IFN-I/-III dans le génome de ZIKV, nous avons établi une analyse génomique de l'évolution de la quasi-espèce virale en réponse à la modulation expérimentale de la signalisation antivirale de l'hôte. Nous avons d'abord mis en place un modèle cellulaire pour appliquer une pression de sélection sur la réplication de ZIKV *via* la signalisation antivirale induite par le récepteur Toll-like (TLR)-3. Nous avons découvert que les populations virales, après plusieurs passages successifs, s'adaptent à la réponse antivirale, telle que déterminé par la résistance virale à la restriction induite par TLR3. Les virus adaptés n'induisent plus de réponse IFN (*i.e.*, absence d'augmentation d'expression de gènes stimulés par l'interféron). L'analyse de la taille des foyers infectieux a révélé une augmentation de la propagation virale des populations virales adaptées. De manière reproductible, l'infectivité spécifique de la population virale augmente au cours des passages et est temporairement associée à la résistance virale à la restriction induite par TLR3. L'analyse bioinformatique de l'évolution virale déterminé par séquençage haut débit met en évidence une mutation candidate, car temporellement corrélée à l'acquisition du phénotype adapté, dans la protéine de surface E : une substitution S/L en position 455 – à l'extrémité de l'hélice amphipathique proche du domaine transmembranaire. Cette substitution pourrait contribuer à la régulation de la stabilité structurale de E. Une seconde mutation candidate se trouve à l'extrémité d'une hélice amphipathique de NS4B, prédite pour interagir avec la membrane du côté de la lumière du réticulum endoplasmique. La mutation de E n'est pas observée dans la base de données de séquences de ZIKV isolés de patient, impliquent que, contrairement à un environnement cellulaire stable et plus réductionniste, une telle adaptation virale serait contrainte/compromise *in vivo* par l'existence d'autres niveaux d'interaction avec l'hôte. Nos résultats montrent que l'adaptation de ZIKV conduit à une optimisation de réplication virale associée à une résistance à la réponse antivirale, ces événements étant probablement promus par la perte d'induction de la réponse antivirale très précoce.

## Table des matières

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>11</b>
<b>A. Le virus Zika (ZIKV)</b> .....	<b>11</b>
1. Epidémiologie .....	12
2. Pathogénèse .....	15
3. Cycle viral et structure du génome .....	16
a) <i>Entrée cellulaire</i> .....	17
b) <i>Réplication virale et structure du génome</i> .....	17
c) <i>Assemblage et sécrétion des virions néo-synthétisés</i> .....	18
d) <i>Modifications cellulaires viro-induites</i> .....	19
4. Modèle d'étude de ZIKV .....	20
a) <i>Modèles viraux</i> .....	20
b) <i>Modèles animaux et tissulaires</i> .....	21
5. Stratégie de prévention de la transmission, vaccination et traitements .....	21
<b>B. Les réponses immunitaires innées dirigées contre les virus à ARN</b> .....	<b>23</b>
1. Mécanismes de détection des virus à ARN .....	24
a) <i>Les récepteurs dits Toll-like (TLR) : récepteurs membranaires</i> .....	24
b) <i>Les PRRs cytosoliques : reconnaissance de l'ARN</i> .....	27
c) <i>Les PRRs cytosoliques : reconnaissance de l'ADN</i> .....	28
d) <i>Les PRRs cytosoliques impliqués dans l'inflammasome</i> .....	29
2. Les effecteurs antiviraux de la réponse interféron de type I et de type III .....	30
3. Implication de la réponse immunitaire dans la pathogénèse et la propagation virale ..	31
a) <i>Conséquences de la réponse immunitaire humorale sur la pathogénèse des flavivirus : exemple de l'ADE</i> .....	31
b) <i>Conséquences de la production de cytokines/chimiokines sur la pathogénèse des flavivirus</i> .....	32
c) <i>Conséquences de la production d'IFN-I sur la pathogénèse de ZIKV</i> .....	33
d) <i>Conséquences de l'activation de TLR3 sur la pathogénèse des flavivirus</i> .....	33
<b>C. Adaptation virale et avantages sélectifs</b> .....	<b>34</b>
1. Co-évolution hôte/virus et transmission inter-espèce .....	34
a) <i>Co-évolution hôte/virus</i> .....	34
b) <i>Influence de la diversité génétique sur la transmission inter-espèce</i> .....	35
c) <i>Influence des co-infections et de la structuration des populations</i> .....	35

2. Impact de la diversité génétique des virus à ARN sur la propagation virale .....	36
a) Influence de la fidélité de la polymérase sur l'efficacité de la propagation virale .	36
b) Influence de la recombinaison inter-génome sur l'efficacité de la propagation virale .....	37
c) Modulation de la diversité génétique virale par des facteurs de l'hôte et impact sur l'efficacité de la propagation virale .....	39
3. Mécanisme d'échappement viral aux réponses de l'hôte .....	39
a) Echappement de la réponse immunitaire humorale .....	40
b) Adaptation à la réponse immunitaire innée par inhibition au niveau de la reconnaissance des produits viraux .....	40
c) Adaptation à la réponse immunitaire innée par l'inhibition d'adaptateurs de voies antivirales .....	41
<b>II. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE .....</b>	<b>43</b>
<b>III. RÉSULTATS .....</b>	<b>45</b>
Article: Interactions of Zika virus with the antiviral responses by experimental evolution (manuscrit en préparation)	
<b>IV. DISCUSSION .....</b>	<b>87</b>
<b>A. Adaptation virale en système cellulaire conduisant à la résistance à une réponse antivirale de la cellule hôte .....</b>	<b>87</b>
1. Rapidité de l'adaptation virale .....	87
2. Adaptation indépendamment de la pression de sélection .....	87
<b>B. Perte de l'activation de la réponse ISG induite précocément par l'infection .....</b>	<b>88</b>
1. Induction des ISGs dépendants de PAMPs associés aux particules viraux .....	89
2. Implications de facteurs solubles présents dans le surnageant de ZIKV .....	89
<b>C. L'adaptation des populations virales entraîne une hausse du pouvoir infectieux de ZIKV en lignée cellulaire humaine .....</b>	<b>90</b>
<b>D. Le changement d'hôtes est possiblement impliqué dans l'adaptation de ZIKV .....</b>	<b>90</b>
<b>E. Identification de mutations candidates responsables de l'adaptation virale .....</b>	<b>91</b>
1. Mutation dans la glycoprotéine d'enveloppe E de ZIKV .....	92
2. Mutation dans la protéine NS4B de ZIKV .....	94
<b>F. Le passage de ZIKV en cellules humaines permet la diversification génétique de la population virale .....</b>	<b>96</b>
1. Stabilisation de la diversité virale au cours des premiers passages .....	96

2. Augmentation de la diversification génétique après fixation des mutations .....	97
3. Relation entre diversification génétique et changement d'hôtes .....	97
<b>V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>99</b>
<b>A. Caractérisation des voies immunitaires impliquées dans l'activation précoce des réponses ISGs.....</b>	<b>99</b>
1. Activation indirecte .....	99
2. Activation par des protéines virales .....	100
<b>B. Augmentation de l'infectivité de ZIKV dépendant du type cellulaire.....</b>	<b>100</b>
1. Mécanisme d'entrée du virus adapté .....	101
2. Optimisation de la particule virale .....	101
<b>VI. RÉFÉRENCES.....</b>	<b>104</b>

## LISTE DES FIGURES

### INTRODUCTION

**Figure 1 (p11):** Organisation génomique de ZIKV et répartition des protéines virales sur la polyprotéine

**Figure 2 (p12):** Distribution temporelle et géographique de ZIKV (1947 – 2016)

**Figure 3 (p13):** Distribution globale du vecteur moustique *Aedes* impliqué dans la transmission de nombreux flavivirus

**Figure 4 (p14):** Tropisme tissulaire et cellulaire de ZIKV

**Figure 5 (p16):** Le cycle de ZIKV

**Figure 6 (p26):** Les réponses immunitaires innées humaines

**Figure 7 (p37):** Action d'analogues nucléotidiques sur la mutagenèse des virus à ARN

**Figure 8 (p38):** Schématisation de la relation entre la fidélité de la polymérase virale, la recombinaison de génomes viraux, et la sélection de variants

**Figure 9 (p42):** Contrôle des réponses immunitaires innées par les virus de la famille des *Flaviviridae*

**Figure 10 (p42):** Contrôle des réponses immunitaires innées par ZIKV

## **DISCUSSION**

**Figure 11 (p93):** Représentation de la mutation S455L de la glycoprotéine d'enveloppe E de ZIKV.

**Figure 12 (p95):** Représentation de la mutation Y87H de la protéine NS4B de ZIKV

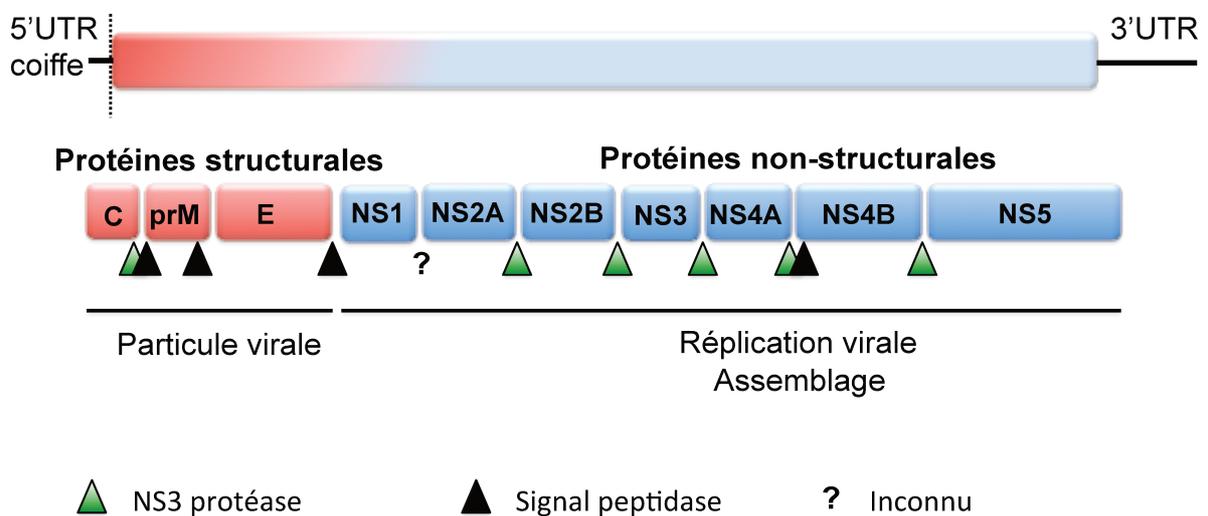
## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

**Figure 13 (p102-103):** Modèle de l'adaptation virale de ZIKV observée après de multiples passages en lignée cellulaire humaine

# I. INTRODUCTION

## A. Le virus Zika (ZIKV)

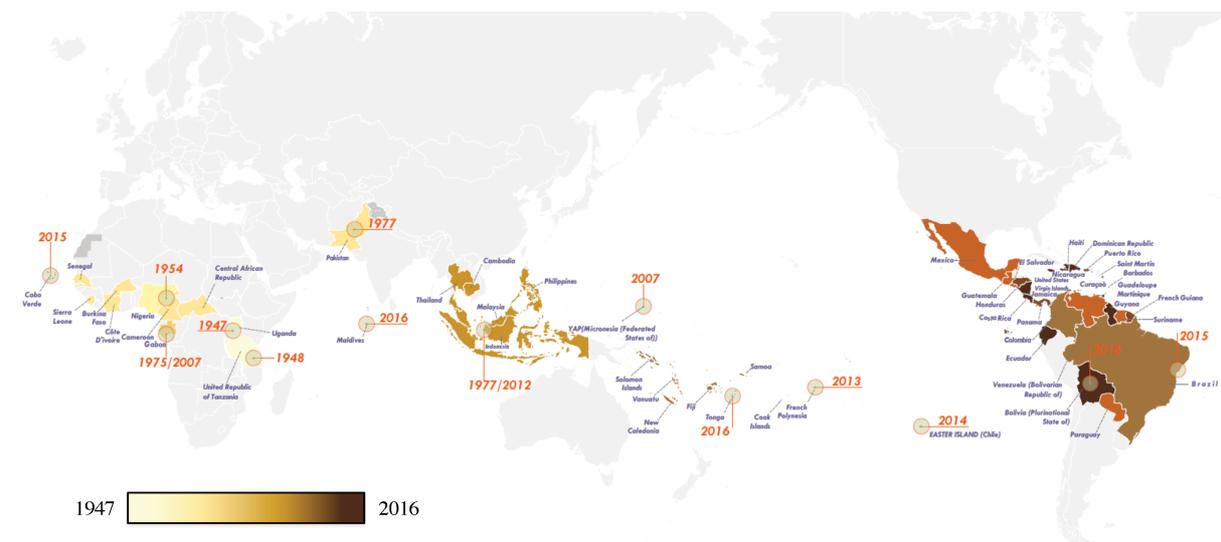
Les virus appartenant à la famille des *Flaviviridae* sont des virus enveloppés dont le génome viral est sous forme d'ARN simple brin de polarité positive. Leur génome code une polyprotéine unique clivée par des protéases cellulaires et virales. La partie N-terminale de la polyprotéine correspond aux protéines dites structurales qui constituent la particule virale. Les protéines dites non-structurales, présentes en C-terminal de la polyprotéine, sont impliquées dans la réplication, l'assemblage des virions, ainsi que la modulation des réponses de l'hôte (voir section C.2) (**Figure 1**). La famille des *Flaviviridae* comprend *i*) le genre des *Pestivirus* regroupant des virus de mammifères ayant une transmission verticale, tel que le virus de la peste porcine, *ii*) le genre des *Hepacivirus* auquel appartient le virus de l'hépatite C (VHC) pour lequel la transmission est parentérale et pouvant conduire à une infection chronique et *iii*) le genre des *Flavivirus*. Les flavivirus sont principalement associés à des infections dites aiguës (*i.e.*, de courte durée mais dont la pathologie peut être sévère) chez l'Homme, transmises par des arthropodes (*e.g.*, moustiques et tiques). On retrouve dans ce genre des virus tels que le virus de la dengue (DENV), le virus du Nil occidental (WNV) et le virus Zika (ZIKV). Mon travail de thèse a principalement porté sur l'étude de ZIKV.



**Figure 1 : Organisation génomique de ZIKV et répartition des protéines virales sur la polyprotéine.** Représentation du génome ARN de polarité positive de ZIKV (A) et de la polyprotéine associée (B). Le génome est encadré de séquences non-codantes (UTR) aux extrémités 5' et 3'. Les protéines structurales (C, prM et E) sont représentées en rouge. Les protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) sont représentées en bleu. Les triangles verts et noirs représentent respectivement les sites de coupure de la protéase virale NS3 et des protéases cellulaires. Un site de coupure (?) n'est, pour l'instant, associé à aucune protéase connue.

## A.1. Épidémiologie

La première description de ZIKV a été faite en 1947 en Ouganda, chez des macaques rhésus de la forêt Zika (Dick *et al.*, 1952). En 2007, un foyer épidémique est décrit en Micronésie, sur les îles de Yap. Une étude sérologique a estimé à plus de 70% le nombre d'individus infectés dans la population locale (Duffy *et al.*, 2009) (**Figure 2**). De 2013 à 2014, une seconde épidémie touche la Polynésie française ainsi que la Nouvelle Calédonie. En 2015, le virus est également détecté au Brésil (**Figure 2**). L'urgence sanitaire est alors déclarée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Le virus se propage rapidement en Amérique du Sud, en Amérique centrale puis aux États-Unis (Zhang *et al.*, 2017). Bien qu'une intensification de la lutte anti-vectorielle ait été mise en place dans les pays concernés, les foyers épidémiques sont, à ce jour, toujours présents dans plus de 60 pays ([www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report](http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report)) (**Figure 2**).

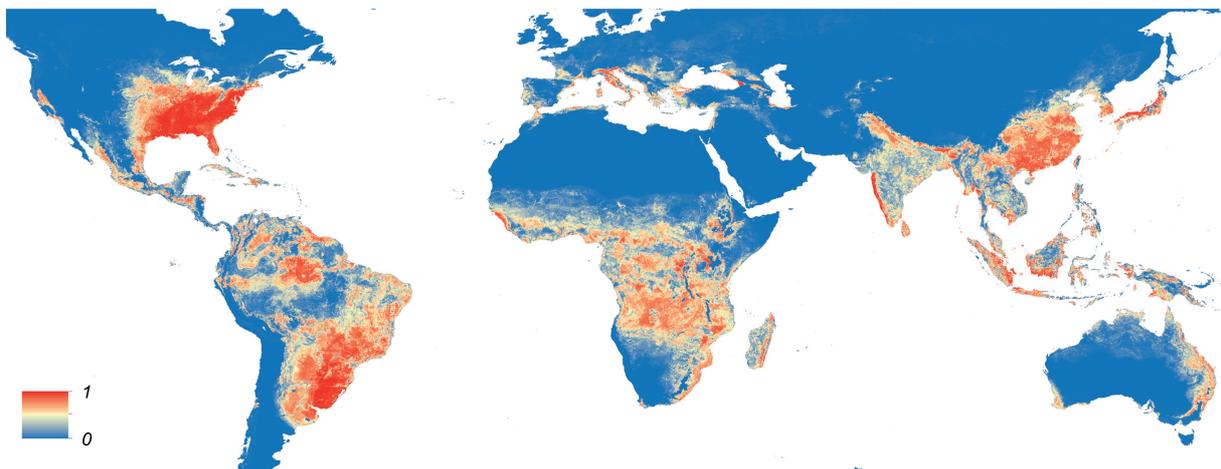


**Figure 2 : Distribution temporelle et géographique de ZIKV (1947 – 2016).**

Représentation des foyers épidémiques de ZIKV depuis l'isolation du virus (1947) jusqu'aux épisodes épidémiques de 2016. Les dates se rapportent à des événements relevés par le site de l'Organisation Mondiale de la Santé ([www.who.int](http://www.who.int)).

A mesure que le nombre et l'étendue des foyers épidémiques augmentent, le lien entre l'infection par ZIKV et l'apparition de symptômes neurologiques émerge (Schuler-Faccini, 2016). Ces symptômes seraient principalement associés aux récentes épidémies. Les souches virales de ZIKV sont regroupées en souches dites africaines et asiatiques, selon leur phylogénie et la dispersion géographique. Les contributions du polymorphisme génétique des populations humaines localement infectées (et/ou mode de vie, environnement) et de la diversité génétique et/ou virulence de ZIKV dans le développement de la pathologie ne sont

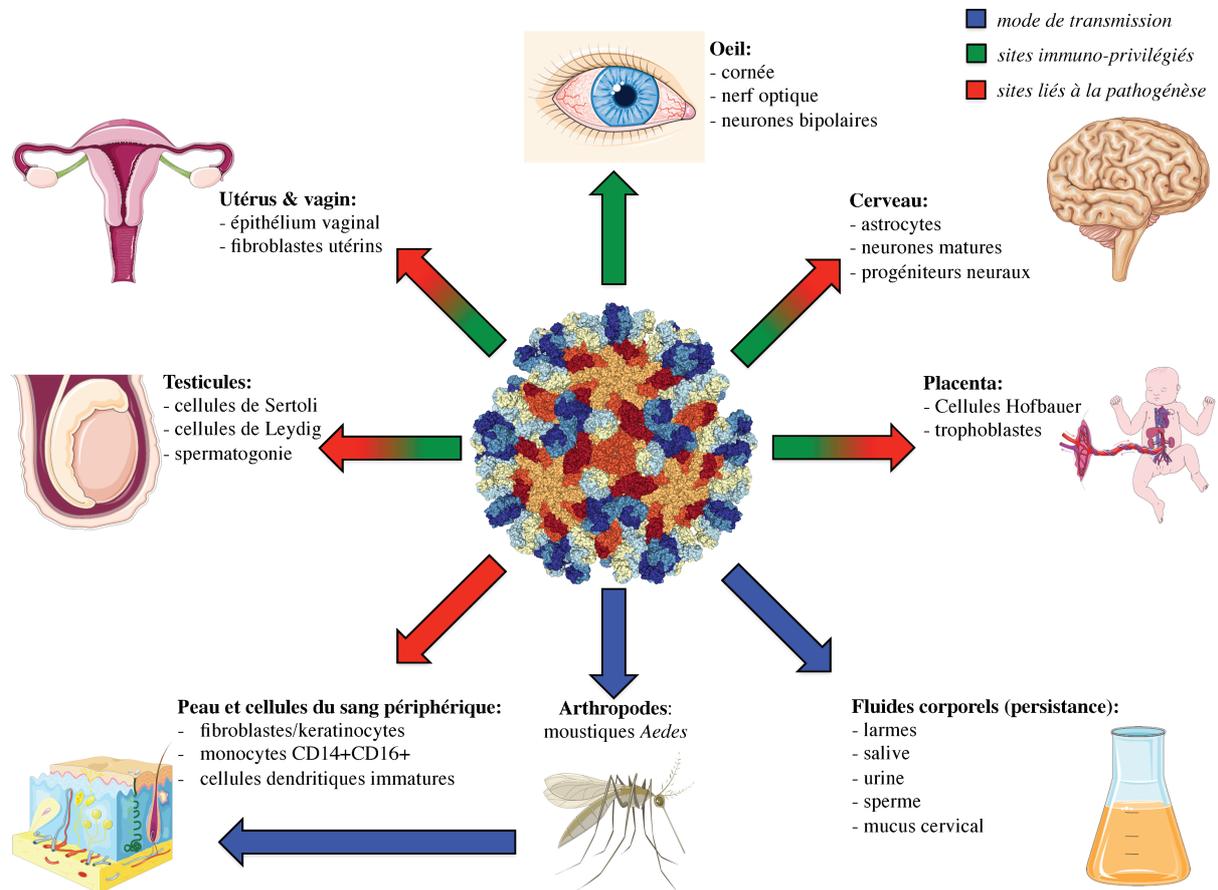
pas encore totalement élucidées. Néanmoins, il est proposé qu'une seule substitution dans le gène codant la protéine prM pourrait être associée à la pathologie (Yuan *et al.*, 2017). Récemment, il est également suggéré que ZIKV ait pu accumuler des mutations dans le gène codant la protéine NS1, lui conférant un avantage sélectif *via* l'inhibition des défenses de l'hôte (Xia *et al.*, 2018).



**Figure 3 : Distribution globale du vecteur moustique *Aedes* impliqué dans la transmission de nombreux flavivirus.** La carte représente la probabilité d'occurrence en 2015 (de 0 en bleu à 1 en rouge) avec une résolution spatiale de 5 km × 5 km (adapté de Kraemer *et al.*, 2015).

ZIKV est transmis par piqûres de moustiques, principalement le genre *Aedes* (**Figure 3**) bien que des moustiques des genres *Anopheles* et *Mansonia* aient été testés positifs en Afrique (Vorou, 2016). De plus, il a été récemment proposé et démontré que ZIKV serait également transmis sexuellement à travers l'étude de modèles murins et simiens (Murray *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2016). La modélisation mathématique de la transmission de ZIKV révèle que cette voie de transmission représenterait alors 3% des transmissions (Gao *et al.*, 2016). En accord avec ce mode de transmission, le virus infectieux est détectable dans le sperme de patients jusqu'à six mois après la date estimée de l'infection (Atkinson *et al.*, 2017; Mansuy *et al.*, 2016). De même, une présence prolongée du virus dans l'urine, la salive et les sécrétions vaginales a été démontrée chez l'Homme et lors d'études de l'infection de macaques rhésus (Aid *et al.*, 2017; Murray *et al.*, 2017) (**Figure 4**). La particule virale de ZIKV est plus stable par rapport à DENV (en terme d'analyse de particules physiques et d'infectivité) et ce à différentes températures (Kostyuchenko *et al.*, 2016). La structure obtenue par microscopie cryo-électronique indique que ZIKV possède une surface plus compacte que d'autres flavivirus (Kostyuchenko *et al.*, 2016). Il est proposé que la stabilité

structurale de ZIKV pourrait contribuer à sa résistance sous différentes contraintes physico-chimiques et dans différents milieux incluant par exemple l'urine, la salive et le sperme (Kostyuchenko *et al.*, 2016).



**Figure 4 : Tropisme tissulaire et cellulaire de ZIKV.** Des études humaines et sur des modèles animaux (souris et primates non humains) ont permis de détecter ZIKV dans les tissus et cellules décrits dans ce schéma. Les cibles cellulaires de ZIKV sont non exhaustives. Les flèches bleues représentent les modes de transmission de ZIKV. Les flèches vertes et rouges représentent respectivement les sites d'infection immuno-privilégiés et/ou liés à la pathogénèse du virus.

A l'instar d'autres flavivirus, il est possible que d'autres espèces d'animaux infectés par ZIKV constituent des réservoirs de la transmission et/ou ré-émergence de l'infection et/ou épidémie. En effet, ZIKV a initialement été isolé chez des macaques rhésus, puis chez des singes verts d'Afrique (Dick *et al.*, 1952; Vorou, 2016). Dans la nature, des anticorps dirigés contre ZIKV sont détectés chez de nombreuses espèces animales telles que les moutons, les chèvres domestiques, les chevaux, les vaches, les canards, les rongeurs, les chauves-souris, les orang-outans et les carabaos (Vorou, 2016). Cependant, la limitation de la détection de ZIKV

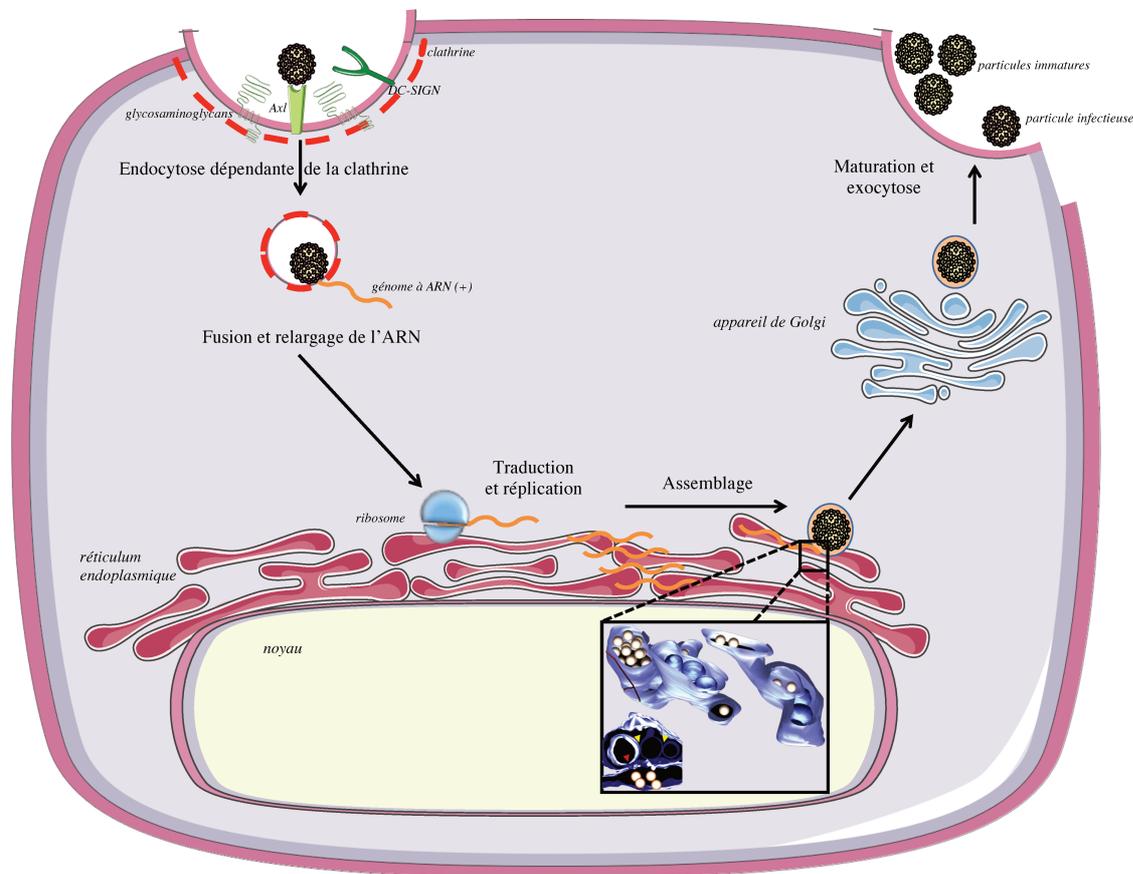
du fait de la réaction croisée des anticorps avec d'autres flavivirus empêche d'affirmer avec certitude que ces espèces peuvent être le réservoir de ZIKV.

## A.2. Pathogénèse

L'infection par ZIKV est asymptomatique pour la majorité des personnes infectées. En conséquence, il est souvent difficile de connaître le pourcentage exact de la population infectée par ZIKV. Néanmoins, au cours de l'épisode épidémique de 2007 aux îles de Yap, la population insulaire étant réduite, il a été estimé que près de 80% des cas d'infection étaient alors asymptomatiques ou sous forme de maladie fébrile apparentée à un état grippal (Duffy *et al.*, 2009). En contraste, il est reporté que, durant l'épidémie au Brésil, plus de 40% des fœtus de femmes enceintes infectées présentaient des anomalies, telles que des calcifications cérébrales, le développement de microcéphalie, un retard de croissance intra-utérin, ou encore le déclenchement de fausses-couches (Brasil *et al.*, 2016a). Chez l'adulte, le syndrome de Guillain-Barré, caractérisé par une dégradation des gaines de myélines des neurones périphériques entraînant des paralysies, a été également observé chez les patients infectés par ZIKV (Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Miner and Diamond, 2017).

Selon de récents travaux, les atteintes neurologiques et développementales résultent notamment des réponses immunitaires de l'hôte infecté. Par exemple, une récente publication indique que la réponse antivirale *via* l'interféron (IFN) est à l'origine de troubles du développement chez le fœtus dans le modèle murin (Yockey *et al.*, 2018). Il semble aussi que le virus induise ou imite une réaction auto-immune par l'action de voies de l'immunité innée, notamment par la production de cytokines (Bayless *et al.*, 2016) et le recrutement de lymphocytes T CD8+ dans les organes cérébraux (Dang *et al.*, 2016; Jurado *et al.*, 2017), ce qui contribuerait à la pathogénèse. Par ailleurs, la fonctionnalité de plusieurs régulateurs de la neurogénèse est directement perturbée par ZIKV, telles que par exemple la protéine Musashi 1 et la kinase à sérine/thréonine « TANK-binding kinase 1 » (TBK-1) (Chavali *et al.*, 2017; Onorati *et al.*, 2016). Les mécanismes moléculaires par lesquels l'infection par ZIKV induit de sévères atteintes du développement du système neuronal et/ou de sa fonctionnalité sont encore largement inconnus. Cependant, il semble que la réponse inflammatoire exacerbée/viro-induite, contribuerait à la pathogénèse, soulevant la nécessité de mieux comprendre les relations moléculaires qu'il existe entre ZIKV et les réponses antivirales de l'hôte.

### A.3. Cycle viral et structure du génome



**Figure 5 : Le cycle de ZIKV.** L'entrée du virus dans la cellule hôte humaine (via les facteurs d'entrée Axl et/ou DC-SIGN) est effectuée par endocytose nécessitant la formation d'une cage de clathrine. Suite à l'acidification de l'endosome, la particule fusionne l'enveloppe virale à la membrane de l'endosome. Il y a décapsidation du génome dans le cytoplasme, directement pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire. Une fois les protéines virales produites, la réplication du génome viral a lieu dans des vésicules issues du réticulum endoplasmique. L'assemblage des particules virales a lieu dans des saccules à proximité des vésicules (encadré représentant une tomographie électronique des vésicules induites par ZIKV dans les cellules Huh7 (Cortese *et al.*, 2017)). Les virions nouvellement assemblés suivent la voie de sécrétion trans-golgienne, nécessaire à la maturation des particules. Le processus de maturation étant sous-optimal, une faible proportion de virus sécrétés sont infectieux.

#### A.3.a) Entrée cellulaire

Probablement en raison du large spectre de cellules susceptibles à l'infection par ZIKV, l'identification des facteurs d'entrée reste une question ouverte (**Figure 4**). Cependant, des travaux mettent en évidence des facteurs contribuant à l'entrée, possiblement de façon non-exclusive et dépendante du type cellulaire, comme c'est aussi le cas pour d'autres flavivirus.

Parmi les facteurs d'entrée déjà identifiés figure Axl, un membre de la famille des récepteurs TAM (Tyro3-Axl-Mer), également connu pour réduire l'induction de la réponse immunitaire innée suite à la liaison de ligands (Meertens *et al.*, 2017) (**Figure 5**). Ces facteurs, présents à la surface cellulaire, interagissent avec des phosphatidylsérines, soit directement (*i.e.*, molécules TIM) ou indirectement *via* des composés solubles tel que Gas6 dans le cas du récepteur Axl. La phosphatidylsérine serait présente à la surface de virions ZIKV (Tabata *et al.*, 2016), comme aussi démontré pour d'autres flavivirus tel que DENV (Meertens *et al.*, 2012). Le récepteur DC-SIGN, impliqué dans l'entrée cellulaire de nombreux flavivirus, a également été proposé pour son rôle dans l'infection de cellules myéloïdes par ZIKV (Hamel *et al.*, 2015) (**Figure 5**).

Après attachement de la particule virale à la cellule hôte, les particules infectieuses de ZIKV sont internalisées par endocytose, dépendante de la clathrine (Meertens *et al.*, 2017) (**Figure 5**). Au cours de la maturation des endosomes contenant les particules, leurs acidifications va induire un changement de conformation des protéines virales d'enveloppe E et M, résultant en l'exposition du peptide de fusion présent dans la protéine E. Ce peptide peut alors s'insérer dans la membrane de l'endosome et, par rapprochement des membranes, conduit à la fusion des membranes virales et endosomales (Rey *et al.*, 2017). Cette fusion membranaire libère le génome associé à la capsid du virus dans le cytoplasme de la cellule (Hamel *et al.*, 2015; Roby *et al.*, 2015) (**Figure 5**).

### *A.3.b) Réplication virale et structure du génome*

Le génome des flavivirus, de par leur polarité positive, peut être directement traduit par la machinerie cellulaire en une polyprotéine composée de protéines structurales, telles que la capsid, prM, et la glycoprotéine E, et de protéines non-structurales, NS1, NS2A, NS2B, l'hélicase à ARN NS3, NS4A, NS4B et NS5, une ARN polymérase ARN-dépendante (**Figure 1**). Le clivage de cette polyprotéine par les protéases cellulaires et par le complexe NS2B-NS3 permet au virus de former une plateforme de réplication et d'assemblage de particules immatures au niveau du réticulum endoplasmique (**Figure 5**). Cette plateforme de production virale est formée par un réarrangement des membranes de cette organelle, ainsi qu'une réorganisation du réseau de microtubules (Cortese *et al.*, 2017; Reid *et al.*, 2018) (**Figure 5**).

L'initiation de la réplication met en jeu des interactions entre les régions hautement structurées 5' et 3' des régions non-codantes (*i.e.*, « UTR ») *via* des éléments en « tige-

boucle », induisant la circularisation du génome viral (Liu *et al.*, 2016; Offerdahl *et al.*, 2017). Cette structure circulaire favorise le recrutement de la polymérase virale et la synthèse du brin complémentaire au brin matrice (de polarité négative), générant une molécule intermédiaire d'ARN à double brins. Le brin de polarité négative sert alors de matrice pour la synthèse du génome viral. En plus du domaine ARN polymérase ARN-dépendante, NS5 possède également un domaine méthyl-transférase qui permet la méthylation de la coiffe de l'ARN naissant, encapsulé par la suite dans les particules nouvellement assemblées (Coutard *et al.*, 2017; Khromykh *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2016) (**Figure 5**).

### *A.3.c) Assemblage et sécrétion des virions néo-synthétisés*

L'assemblage des particules virales de flavivirus a lieu dans des saccules, à proximité de vésicules contenant les complexes de réplication, et dépend également du réarrangement membranaire du réticulum endoplasmique (Cortese *et al.*, 2017) (**Figure 5**). Bien que le mécanisme exact reste inconnu, par analogie avec d'autres flavivirus, les interactions entre protéines non-structurales et structurales seraient impliquées dans l'adressage du génome et l'assemblage de virions. En effet, dans le contexte de DENV, la protéine NS2A a un rôle essentiel dans la biogénèse des membranes induites par le virus et la protéine de capsid est impliquée dans l'incorporation du génome viral dans la particule par interaction directe de la protéine avec l'ARN (Byk and Gamarnik, 2016; Xie *et al.*, 2015). La maturation des virus s'effectue lors de leur transit dans le réseau golgien où une furine cellulaire clive le peptide pr de la protéine M afin de la rendre mature (**Figure 5**). Cette étape de maturation est requise pour rendre la particule infectieuse puisque ce clivage est nécessaire au changement de conformation de la protéine E et à l'accessibilité du peptide de fusion (Rey *et al.*, 2017, 2018). Néanmoins, le site de clivage de prM est sous-optimal et on estime ainsi que seulement 30 à 40% de la totalité des particules produites sont immatures (*i.e.*, pas de clivage de prM). La conservation d'un site de clivage sous-optimal pourrait conférer un avantage évolutif au virus, notamment en empêchant une fusion membranaire prématurée des particules virales dans le compartiment golgien qui présente un pH acide (Plevka *et al.*, 2011; van der Schaar *et al.*, 2007). Par ailleurs, les particules immatures de DENV et ZIKV contribuent à l'augmentation de l'infection dépendante des anticorps (*antibody dependent enhancement*, ADE) (voir section B.3) par la reconnaissance notamment de la protéine prM *via* les anticorps produits lors de la réponse immunitaire humorale (Sariol *et al.*, 2017). Dans le contexte de l'infection par DENV, de récentes études démontrent que l'ADE contribue à l'aggravation de la pathogénèse dans des modèles murins ainsi que lors d'études chez des patients (Dowd *et al.*, 2011;

Katzelnick *et al.*, 2017; Sariol *et al.*, 2017). De plus, l'équipe de recherche dans laquelle j'ai passé ma thèse a démontré que les particules immatures non-infectieuses de DENV, WNV (Décembre *et al.*, 2014) et ZIKV (donnée non publiées) (voir section B.2) sont responsables de l'activation d'une forte réponse IFN de type I par une sous-population de cellules dendritiques, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (ou « pDC »). En effet, mon équipe propose que la rétention des particules immatures - déficientes pour la fusion membranaire - dans les endolysosomes favorise la reconnaissance de l'ARN immuno-stimulateur par le récepteur TLR7, connu pour être localisé dans ce même compartiment subcellulaire (Décembre *et al.*, 2014).

#### *A.3.d) Modifications cellulaires viro-induites*

Dans les cellules immortalisées, ZIKV est cytopathogène et réarrange drastiquement les membranes du réticulum endoplasmique, similairement aux autres flavivirus (Welsch *et al.*, 2009). Dans les progéniteurs neurals fœtaux humains primaires, l'infection par ZIKV a une phase cytopathique partielle caractérisée par l'arrondissement des cellules, la pycnose, l'activation de la caspase 3 et l'induction de l'apoptose (Hanners *et al.*, 2016). Des observations similaires sont reportées pour les cellules épithéliales tubulaires proximales rénales primaires infectées par ZIKV (Chen *et al.*, 2017). L'observation de biopsies de peau humaine révèle que l'infection par ZIKV est associée à un changement de morphologie ainsi qu'à la formation de nombreuses vacuoles intracytoplasmiques dans différents types cellulaires (*i.e.*, fibroblastes et kératinocytes) infectés par le virus (Hamel *et al.*, 2015; Monel *et al.*, 2017).

En outre, la présence de ces vacuoles à double membranes est caractéristique des vésicules de la machinerie de l'autophagie, les autophagosomes. L'autophagie est un processus sériel responsable de la dégradation et du recyclage des composants cytoplasmiques. L'autophagie augmente la réplication et la dissémination de plusieurs arbovirus (Heaton *et al.*, 2010; Krejbich-Trotot *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). ZIKV est capable d'augmenter sa réplication *via* l'induction de l'autophagie dans des fibroblastes humains (Hamel *et al.*, 2015). De plus, le virus bloque la neurogénèse et active le flux autophagique dans des cellules souches neurales fœtales humaines par l'action inhibitrice des protéines virales NS4A et NS4B sur la voie Akt-mTOR (Liang *et al.*, 2016). Une récente étude montre que l'activation de l'autophagie au niveau du trophoblaste est essentielle à la transmission verticale de ZIKV dans un modèle murin (Cao *et al.*, 2017). La modulation de l'autophagie par ZIKV s'opère donc dans différents types cellulaires et contribuerait à des étapes essentielles au virus telles que la

réplication optimale du génome viral, la dissémination ou encore la pathogénèse du virus. Un rôle proviral de l'autophagie est aussi décrit pour DENV, par l'apport d'énergie aux cellules infectées ainsi que pour les étapes de sécrétion des particules virales (Heaton and Randall, 2010; Mateo *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016).

#### A.4. Modèle d'étude de ZIKV

##### A.4.a) Modèles viraux

La souche de ZIKV initialement isolée, MR 766 (1947 en Ouganda - de lignée africaine), est l'un des premiers modèles d'étude pour ce virus. Elle a été dérivée par de nombreux passages successifs dans des cerveaux de souris (Dick *et al.*, 1952). Ce passage viral, dans un organe spécialisé ayant un privilège immun, permet l'obtention d'un virus ayant une meilleure propagation dans l'environnement neuronal, mais le rend susceptible d'avoir accumulé des mutations d'adaptation, voir une possible atténuation du virus lors de son passage dans un type cellulaire différent. Suivant l'ampleur des récentes épidémies, de nombreuses souches virales ont été isolées et, pour la plupart, entièrement séquencées, permettant d'enrichir la base de données « Virus Variation » qui compte à ce jour près de 500 souches séquencées (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/Database/nph-select.cgi>).

Les différences entre les lignées africaines et asiatiques de ZIKV soulignent *i)* l'importance d'inclure des souches de ZIKV pertinentes pour étudier, par exemple, la pathogénèse de la microcéphalie congénitale et *ii)* la prudence contre l'extrapolation des données expérimentales obtenues en utilisant les souches africaines de ZIKV à l'épidémie actuelle. Pour les expériences d'évolution, nous avons choisi de travailler avec une souche isolée lors de l'épidémie en Amérique du Sud, la souche ZIKV PE243, de lignée asiatique. Cet isolat clinique provient d'une patiente présentant des symptômes classiques (*i.e.*, sans atteinte neurologique) dans la région de Recife au Brésil en 2015, et transmis par nos collaborateurs le Dr. Rafael Freitas de Oliveira Franca (FioCruz, Recife, Brazil) et le Pr. Alain Kohl (MRC - University of Glasgow Centre for Virus Research, UK). Cet isolat a été complètement séquencé, nous permettant ainsi de connaître la séquence consensus de départ (Donald *et al.*, 2016). Différents laboratoires ont construit et validé des clones moléculaire infectieux de ZIKV (Mutso *et al.*, 2017; Shan *et al.*, 2016; Tsetsarkin *et al.*, 2016). Nous disposons aussi du clone moléculaire correspondant à la souche PE243.

#### A.4.b) Modèles animaux et tissulaires

L'infection étant très transitoire chez des souris adultes immunocompétentes, la mise en place de modèles animaux particuliers a été nécessaire pour l'étude d'infections *in vivo* par ZIKV. Néanmoins, des études ont été réalisées par des infections de souris néonatales âgées d'une semaine (Lazear *et al.*, 2016; Manangeeswaran *et al.*, 2016). Dans ce modèle, l'infection par ZIKV provoque une infiltration de lymphocytes T dans le système nerveux central, l'apparition de symptômes neurologiques et un taux de mortalité semblable aux infections par d'autres flavivirus neuroinvasifs (Manangeeswaran *et al.*, 2016). Par ailleurs, des souris immunodéficientes pour la réponse à l'IFN de type I, suite, par exemple, à une délétion du gène codant pour le récepteur à l'IFN de type I (*i.e.*, *ifnar<sup>-/-</sup>*), sont également utilisées pour étudier la pathogénèse de ZIKV (Lazear *et al.*, 2016). L'infection de ces souris a permis de mettre en avant des particularités retrouvées lors d'infections chez l'Homme, tels que la transmission trans-placentaire et sexuelle du virus, ou encore des paralysies. La plupart de ces découvertes ont été validées lors d'infections sur des primates non-humains tel que le macaque rhesus (Aid *et al.*, 2017; Osuna *et al.*, 2016). D'autres modèles cellulaires/tissulaires sont également utilisés pour étudier les modulations des fonctions cellulaires par l'infection par ZIKV, incluant les organoïdes neuronaux, les coupes de tissu cortical humain (Dang *et al.*, 2016; Retallack *et al.*, 2016) et le compartiment placentaire (Simoni *et al.*, 2017; Tabata *et al.*, 2016).

#### A.5. Stratégie de prévention de la transmission, vaccination et traitements

Les approches physiques de lutte contre les moustiques comprennent les pièges à larves, les vêtements traités à l'insecticide, les serpentins anti-moustiques, etc... Dans les années 1950, le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) a été utilisé pour pulvériser des conteneurs d'eau infestés et des surfaces solides afin de mieux contrôler l'expansion d'*A. aegypti*. Les biopesticides sont utilisés comme larvicides pour contourner les problèmes de résistance et de toxicité des composés chimiques ; on peut citer les agents de contrôle microbiens, par exemple *Bacillus thuringiensis* ou *Bacillus sphaericus*, et les régulateurs de croissance d'insectes tels que le méthoprène, le pyriproxyfène et le diflubenzuron, qui sont des inhibiteurs de la synthèse de la chitine, bien qu'en laboratoire, la résistance à ces inhibiteurs se développe en quelques générations (Kauffman and Kramer, 2017). De nouvelles approches incluent la libération d'insectes stériles, où les mâles génétiquement modifiés sont porteurs de gènes létaux dominants (Thomas *et al.*, 2000), ainsi que la libération de moustiques infectés par l'endosymbiote *Wolbachia*, sachant qu'une infection d'*A. aegypti* à *Wolbachia* inhibe la

réplication de DENV (Blagrove *et al.*, 2011; Frentiu *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2009), de ZIKV (Tan *et al.*, 2017) et de Chikungunya (Moreira *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2017).

Des stratégies de criblage à grande échelle ont mis en avant plusieurs composés ayant une activité *in vitro* contre ZIKV, mais aucun médicament antiviral n'a pour le moment montré une activité contre le virus *in vivo* (Cairns *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2017; Retallack *et al.*, 2016; Simanjuntak *et al.*, 2018).

Le développement de vaccins est actuellement soutenu par de nombreux organismes de financements internationaux. En 2016, des vaccins à base de plasmides ADN et de virus inactivés au formol contre ZIKV ont été décrits. Les vaccins à base de plasmides ADN codant pour les gènes prM et E des isolats contemporains de ZIKV produisent des protéines E sécrétées ou des particules virales, provoquant des réponses d'anticorps neutralisants et protecteurs contre l'infection chez les souris non gestantes et les primates non humains (Abbink *et al.*, 2016; Dowd *et al.*, 2016; Larocca *et al.*, 2016). Plusieurs articles publiés en 2017 décrivent de nouvelles plateformes vaccinales contre ZIKV, notamment un nouveau vaccin à ARN modifié, encapsulé dans un lipide, codant pour les protéines prM et E d'une souche polynésienne de ZIKV. Le challenge avec une souche américaine de ZIKV à 2 et 20 semaines après une seule inoculation de ce vaccin protège complètement contre la virémie chez les primates non humains (Pardi *et al.*, 2017). Une seconde étude, utilisant un autre vaccin à ARN encapsulé dans un lipide codant pour les protéines prM et E provenant d'une souche ZIKV asiatique et nécessitant un rappel de vaccination, a également induit des réponses d'anticorps neutralisants durables chez la souris. Un challenge avec une souche ZIKV africaine hétérologue chez des souris immunodéficientes immunisées ou immunocompétentes immunisées a montré une protection contre l'infection virale et la létalité. Des mutations détruisant l'épitope du peptide de fusion dans la protéine E de ZIKV permettent de produire des quantités diminuées d'anticorps augmentant l'infection par ADE de DENV (Richner *et al.*, 2017a). Sur le même principe, un vaccin modifié à base de nanoparticules lipidiques d'ARN codant pour les protéines prM et E d'une souche ZIKV asiatique chez des souris gestantes a été testé : les vaccins administrés avant la grossesse peuvent prévenir les syndromes congénitaux de ZIKV (Richner *et al.*, 2017b). Trois vaccins vivants atténués ont également été développés : l'un basé sur des mutations dans les sites de glycosylation du gène NS1 de ZIKV (Richner *et al.*, 2017b) et deux autres avec de courtes délétions atténuantes dans la partie 3'-UTR de l'ARN génomique (Shan *et al.*, 2017a, 2017b). Chez la souris, ces vaccins vivants atténués induisent des taux élevés d'anticorps neutralisants, préviennent l'infection, les dommages aux testicules chez les mâles et suppriment la

transmission *in utero* et l'infection fœtale pendant la gestation. Chez les primates non-humains, une seule immunisation avec les vaccins portant la délétion en 3'-UTR provoque une réponse immunitaire robuste, qui empêche la virémie lors du challenge avec une souche épidémique de ZIKV. Début 2018, de nouvelles approches novatrices sont apparues avec le développement d'un vaccin chimérique recombinant qui exprime les protéines prM-E de ZIKV utilisant le vaccin vivant atténué de l'encéphalite japonaise en tant que squelette génétique (Li *et al.*, 2018). L'immunisation de souris et de macaques rhésus avec une seule dose du vaccin candidat provoque des réponses immunitaires robustes et durables, et confère une protection complète contre le virus ZIKV, voire une protection contre les lésions placentaires et fœtales. Plus de 40 vaccins candidats sont en cours de développement, dont certains sont en cours d'homologation. On ne sait pas encore, néanmoins, si les infections par ZIKV conduisent à une immunité à vie chez l'Homme.

## **B. Les réponses immunitaires innées dirigées contre les virus à ARN**

L'immunité innée regroupe des mécanismes immédiats de détection des infections et de protection. Cette première ligne de réponses à l'infection, dite non-spécifique, met principalement en jeu la reconnaissance par des récepteurs/senseurs du matériel génétique ou de composants de surface ou encore de composés sécrétés par les agents pathogènes.

La réponse immunitaire innée peut aussi être induite par des agents non-pathogènes tel que le microbiome. Des mécanismes de tolérance sont alors mis en jeu dans les organes concernés afin de restreindre la réponse immunitaire. La réponse immunitaire innée est aussi centrale dans le contrôle du développement des tumeurs (Corrales *et al.*, 2017; Palchetti *et al.*, 2015). La dérégulation de la réponse immunitaire innée (directement par mutation génétique et/ou par défaillance au niveau de son contrôle) conduisant au développement de réponses exacerbées de l'hôte, notamment inflammatoires, est à l'origine de l'apparition de nombreuses maladies. Ces pathologies incluent notamment un grand nombre de maladies auto-immunes telles que la maladie de Crohn, le lupus érythémateux systémique, des formes de diabète et certains cancers (Thaiss *et al.*, 2016), et sont référées comme interféropathies lors du dysfonctionnement de la réponse par l'IFN-I (Rodero and Crow, 2016).

L'immunité innée a une action directe de contrôle de la propagation des pathogènes *via* la production de cytokines antivirales (incluant l'IFN-I et l'IFN-III) et d'effecteurs, les gènes stimulés par l'IFN appelés ISGs (pour *interferon-stimulated genes*). De plus, la réponse innée promeut une réponse immunitaire adaptative notamment par la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines induisent le recrutement des cellules de la réponse immunitaire

au site de l'infection et créent un microenvironnement en faveur des fonctions effectrices des cellules immunitaires.

Cette section d'introduction sera focalisée sur les réponses innées protégeant des infections par les virus à ARN chez l'Homme.

### B.1. Mécanismes de détection des virus à ARN

L'un des premiers événements d'activation de la réponse immunitaire innée est la détection de motifs moléculaires associés aux pathogènes (appelé *pathogen-associated molecular patterns* « PAMP »). Il s'agit d'éléments partagés par des virus génétiquement éloignés, tels que les motifs d'acides nucléiques, les glycoprotéines de surface des virions et parfois des protéines virales non-structurales sécrétées. Ceci permet une réponse à large spectre sur différentes familles de virus. Des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (appelés *pattern recognition receptor* « PRR ») détectent directement l'infection virale *via* la reconnaissance/interaction avec ces PAMPs. Leur activation peut aussi être indirecte, notamment par la détection de stress cellulaire induit par l'infection (Brubaker *et al.*, 2015). Les PRRs impliqués dans la reconnaissance des infections virales ont une localisation membranaire ou cytosolique, impliquant une reconnaissance différentielle selon le stade du cycle viral et donc la localisation sub-cellulaire des PAMPs. Cette localisation sub-cellulaire des PRRs est d'importance car, outre la présence de motifs spécifiques (*i.e.*, PAMPs), les éléments viraux, et en particulier les acides nucléiques, peuvent aussi être détectés de par leur localisation aberrante, telle que par exemple la présence d'ADN au niveau cytoplasmique ou d'ARN au niveau du compartiment endosomal.

#### B.1.a) Les récepteurs dits Toll-like (TLR) : récepteurs membranaires

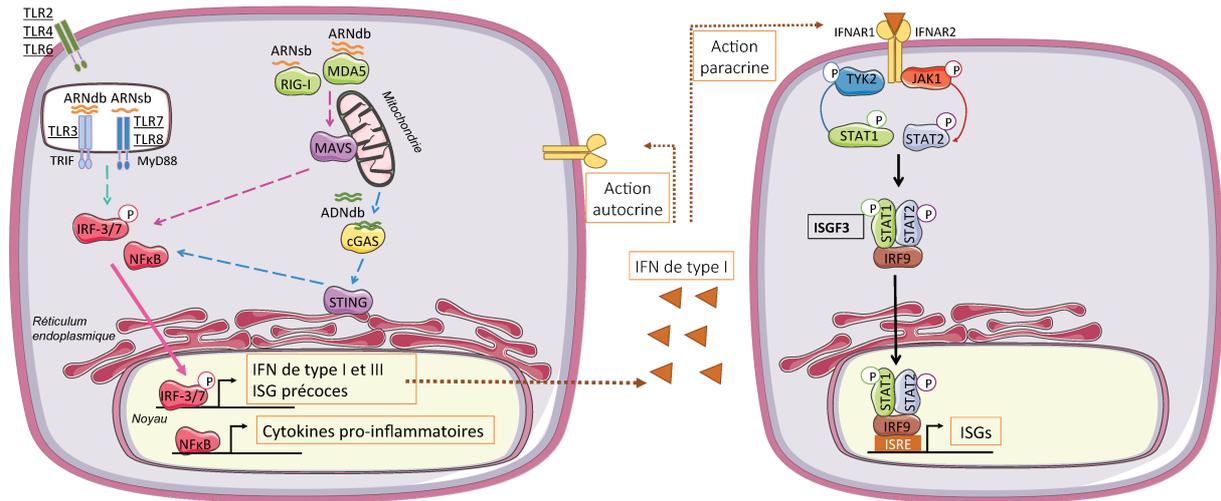
Les récepteurs dits Toll-like (*e.g.*, « TLR ») sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une région N-terminale extracellulaire riche en leucine, en forme de « fer à cheval », qui contient le domaine de fixation des PAMPs. La partie C-terminale intracellulaire est impliquée dans la transduction du signal (Jin *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Ohto *et al.*, 2015; Tanji *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). Il existe 10 différents TLRs chez l'Homme. Les TLR2, 3, 4, 7 et 8 sont principalement impliqués dans la réponse antivirale *via* la reconnaissance de protéines structurales de virus (pour TLR2, 4) ou de molécules d'ARN simple (pour TLR7 et 8) ou double brin(s) (pour TLR3) (**Figure 6**). Dans le cas d'infections par des virus de la famille des *Flaviviridae*, de nombreux exemples indiquent que TLR2 (Dolganiuc *et al.*, 2004), TLR3 (Daffis *et al.*, 2008) et TLR7 (Dreux *et*

*al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2010) reconnaissent les éléments viraux et sont impliqués dans le contrôle de l'infection. Par exemple, dans le contexte d'infection par DENV, la reconnaissance de la protéine virale sécrétée NS1 par TLR2 et TLR6, induit une réponse antivirale (Chen *et al.*, 2015). Néanmoins, de récents travaux démontrent que NS1 est principalement reconnu par TLR4 (Modhiran *et al.*, 2015, 2017). Cette reconnaissance induit un dysfonctionnement de la barrière épithéliale *via* notamment la production de cytokines pro-inflammatoires (Beatty *et al.*, 2015; Modhiran *et al.*, 2015).

Les TLRs reconnaissant les protéines structurales des virus sont ancrés principalement à la membrane plasmique (*e.g.*, TLR2, TLR4 et TLR6), alors que ceux reconnaissant les acides nucléiques (*e.g.*, TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) sont principalement présents dans des compartiments intracellulaires incluant le réticulum endoplasmique, les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes, en accord avec une détection lors de l'entrée cellulaire et la réplication virale.

Le clivage protéolytique, partiel ou total, de l'ectodomaine de ces récepteurs par les protéases de type cathepsines dans les compartiments endosomaux a été démontré comme essentiel à leur fonction de signalisation et empêche les TLRs de répondre aux acides nucléiques de la cellule (Ewald *et al.*, 2008; Hipp *et al.*, 2013; Ishii *et al.*, 2014; Toscano *et al.*, 2013). La localisation subcellulaire de TLR3 dépend du type cellulaire. TLR3 est localisé à la surface des cellules et dans les endosomes des fibroblastes, des macrophages et de certaines lignées cellulaires épithéliales (Matsumoto *et al.*, 2002). En revanche, les cellules dendritiques myéloïdes n'expriment TLR3 qu'au niveau intracellulaire (Matsumoto *et al.*, 2003). La protéine résidente du réticulum endoplasmique, UNC93B1, est physiquement associée à TLR3 et facilite le trafic intracellulaire de TLR3 (Brinkmann *et al.*, 2007). En outre, la région située entre le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire de TLR3 détermine la localisation endosomale (Funami *et al.*, 2004; Nishiya *et al.*, 2005). Pour un éventail de types cellulaires, la signalisation TLR3 a lieu dans le compartiment endosomal où la maturation du récepteur est aussi effectuée (Toscano *et al.*, 2013).

L'expression des TLRs dépend également du type cellulaire étudié. Par exemple, TLR8 est principalement exprimé dans les cellules dendritiques myéloïdes et les monocytes (Hornung *et al.*, 2002). Il est à noter que les TLRs sont des ISGs, à savoir que leur expression est induite par la réponse IFN-I.



**Figure 6 : Les réponses immunitaires innées humaines.** Représentation globale des PRRs membranaires (TLRs) et cytosoliques (RLRs, cGAS/STING) impliqués dans la réponse antivirale. L'activation de ces récepteurs mène à l'induction de facteurs de transcription (IRFs, NF- $\kappa$ B). La translocation nucléaire de ces facteurs permet la production d'IFNI/-III, d'ISGs précoces et de cytokines pro-inflammatoires. L'IFN peut avoir une action autocrine et paracrine, et active la voie JAK-STAT. L'induction des protéines STAT conduit à la production d'ISGs.

L'interaction du ligand avec les TLRs induit leurs dimérisation, permettant une activation de cascades de signalisation *via* le recrutement de protéines adaptatrices (Liu *et al.*, 2008; Oshiumi *et al.*, 2003), puis la formation de complexes multiprotéiques et l'activation de cascades de phosphorylation (**Figure 6**). Les facteurs régulateurs de l'interféron (appelé *interferon regulatory factor* « IRF ») sont alors phosphorylés, transitent dans le noyau, où ils exercent leur fonction d'activateur de transcription. Alors que les IRF1 et IRF5 sont activés par tous les TLRs (excepté par TLR3), les IRF3, IRF7 et IRF8 sont préférentiellement activés par l'induction des voies TLR3/4, TLR7/8/9 et TLR9, respectivement (**Figure 6**). De plus, les TLRs induisent aussi le transfert nucléaire du facteur nucléaire kappa B (« NF- $\kappa$ B »), et les facteurs associés à la protéine kinase activée par la mitose (appelé *mitogen-activated protein kinases* « MAPK ») (Tamura *et al.*, 2008) (**Figure 6**).

Ces régulateurs de la transcription induisent notamment l'expression d'IFN-I et d'IFN-III, de cytokines dites pro-inflammatoires, et d'ISGs dits « précoces » qui contribuent à l'inhibition de la propagation virale dans les cellules infectées (Brubaker *et al.*, 2015).

### B.1.b) Les PRRs cytosoliques : reconnaissance de l'ARN

Le génome viral est relargué dans le cytoplasme des cellules lors de la fusion entre la membrane de la particule virale et la membrane plasmique ou celle des endosomes. Tous les

flavivirus décrits à ce jour « s'échappent » du compartiment endosomal par fusion membranaire induite à pH acide. Les acides nucléiques viraux des virions arrivant dans la cellule hôte, ainsi que lors de la réplication des génomes viraux, peuvent être reconnus par plusieurs PRRs cytosoliques. Ces récepteurs sont regroupés principalement en familles de récepteurs de type RIG-I (« RLR »), incluant RIG-I (appelé *retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (appelé *melanoma differentiation-associated protein 5*) et LGP2 (appelé *laboratory of genetics and physiology 2*). Les RLRs seraient impliqués dans la reconnaissance de génomes viraux répliatifs ou non (*i.e.*, génomes défectifs) dans le cytoplasme des cellules humaines (Mura *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2013) (**Figure 6**). RIG-I et MDA5 reconnaissent plus spécifiquement les molécules d'ARN à double brins (Kato *et al.*, 2008; Yoneyama *et al.*, 2005). RIG-I détecte les ARN non-coiffés de petite taille, exposant un groupement 5'-triphosphate (Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006). De plus, RIG-I interagit préférentiellement avec des séquences de la région polyU/UC, contenant des polyuridines en répétition espacées par des cytidines, en 3'-UTR du VHC et de DENV (Saito *et al.*, 2008; Schnell *et al.*, 2012). Les séquences, ou structures, reconnues par MDA5 ne sont pas connues ; cependant, des études *in vitro* démontrent que MDA5 reconnaît préférentiellement les longues molécules d'ARN (Kato *et al.*, 2008). MDA-5 induirait, conjointement avec RIG-I, une réponse immunitaire innée contre les virus appartenant à la famille des *Flaviviridae* (Fredericksen *et al.*, 2008; Meylan *et al.*, 2005).

Suite à la reconnaissance des acides nucléiques, une cascade de signalisation est initiée par interaction entre les domaines CARD (appelés *caspase activation and recruitment domains*) de ces RLRs et ceux de l'adaptateur mitochondrial MAVS (appelé *mitochondrial antiviral-signaling protein*), mènent à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, IRF3 et IRF7 (**Figure 6**). Comme pour l'activation des voies TLRs, l'activation des PRR cytosoliques induit l'expression d'ISG, d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires (décrits précédemment dans section *B.1.a*) (Yoneyama *et al.*, 2004). Le RLR LGP2, contrairement à RIG-I et MDA5, ne possède pas de domaine CARD, essentiel à l'activation de la cascade de signalisation (Loo and Gale, 2011; Yoneyama *et al.*, 2005). Cependant, LGP2 est capable de reconnaître l'ARN double brins, et modulerait les réponses induites par RIG-I et MDA-5 (Saito *et al.*, 2007; Satoh *et al.*, 2010; Venkataraman *et al.*, 2007) notamment par compétition avec RIG-I pour l'interaction avec les molécules d'ARN. LGP2 aurait, par ailleurs, un effet positif sur la capacité de MDA5 à reconnaître son ligand *via* la formation d'un complexe (Pippig *et al.*, 2009).

La protéine kinase R ou « PKR » reconnaît également les molécules d'ARN double brins. Il s'agit d'un ISG, présent dans une conformation latente et auto-inhibée en l'absence de stress (Patel and Sen, 1998). Les molécules d'ARN double brins sont reconnues et liées par PKR *via* deux motifs de liaison à l'ARN double brins en N-terminal, ce qui entraîne successivement l'activation, l'homodimérisation et l'autophosphorylation de PKR (Nanduri *et al.*, 1998). La PKR entoure la molécule d'ARN double brins ce qui permet des interactions protéine-ARN optimales ; ceci explique que les molécules d'ARN double brins de longueur inférieure à 30 paires de bases n'activent pas PKR (Manche *et al.*, 1992). Une fois PKR activée, son activité kinase conduit à la phosphorylation d'un facteur de l'initiation de la traduction, eIF-2 $\alpha$  (appelé *alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2*) et induit une inhibition de la traduction cellulaire de manière globale (Dar *et al.*, 2005; Dey *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2005). L'action kinase de la PKR jouerait aussi un rôle, direct ou indirect, sur l'activité de facteurs de transcription impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires (tels que IRF-1, 3 ou NF- $\kappa$ B), ou encore la différenciation cellulaire et l'apoptose (Cuddihy *et al.*, 1999; Goh *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 1997) tout en régulant également l'expression des ISGs dans les cellules infectées (Garaigorta and Chisari, 2009). Par exemple, l'activation de PKR au début de l'infection par VHC induit l'expression, *via* IRF3, de ISG15 qui régule alors négativement la voie RIG-I / MAVS par ubiquitination de RIG-I (Arnaud *et al.*, 2011). L'action de cette protéine sur les différents membres des flavivirus semble varier (Hou *et al.*, 2017). Par exemple, PKR a un rôle essentiel pour le contrôle de la propagation du WNV, notamment dans les neurones (Samuel *et al.*, 2006).

### *B.1.c) Les PRRs cytosoliques : reconnaissance de l'ADN*

En contexte physiologique, l'ADN a une localisation nucléaire et mitochondriale dans les cellules eucaryotes. La présence aberrante de molécules d'ADN dans le cytoplasme des cellules peut être un signal de danger. La localisation cytosolique de l'ADN peut suivre un remaniement cellulaires induit par les infections virales et être la conséquence d'autres dommages cellulaires, telles que des cassures de l'ADN nucléaire (Härtlova *et al.*, 2015). La GMP-AMP cyclique synthase (« cGAS ») est un PRR cytosolique capable de reconnaître la localisation aberrante de l'ADN dans le cytosol, conduisant au recrutement et à l'activation de l'adaptateur STING (appelé *stimulator of interferon genes*) suivi de la phosphorylation/translocation nucléaire de IRF3 (Liu *et al.*, 2015; Tanaka and Chen, 2012) (**Figure 6**). Le rôle de cette voie dans la défense contre les infections par des virus à ARN a été récemment démontré dans le cas d'une infection par DENV. La propagation du virus

engendre une déstructuration du réseau de mitochondries (Barbier *et al.*, 2017; Chatel-Chaix *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2015). En accord, cGAS détecte l'ADN mitochondrial dans les cellules infectées par DENV et semble ainsi impliqué dans le contrôle de la propagation virale (Aguirre *et al.*, 2017).

#### *B.1.d) Les PRRs cytosoliques impliqués dans l'inflammasome*

Les récepteurs de type NOD (pour *nucleotide oligomerization domain receptors*), ou NLRs, sont impliqués dans la reconnaissance de divers signaux inflammatoires (*i.e.*, protéines virales, ARN double brins,...) *via* l'assemblage de complexes multi-protéiques, appelés inflammasomes (Wang *et al.*, 2018). Ces complexes comportent des senseurs cytoplasmiques, incluant les protéines NACHT (pour *domain present in NAIP, class II transactivator, HET-E and TP1*), LRR (appelé *leucine-rich repeat domain*) et NLR (« NLRP3 »). Ces senseurs s'associent à des protéines adaptatrices (« ASC » pour *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) et des protéines effectrices (pro-caspase 1) pour permettre le clivage de caspase 1 en deux sous-unités actives (p22 et p20), responsables de la maturation et de la sécrétion des interleukines (« IL ») IL-1 $\beta$  et IL18 (Arend *et al.*, 2008; Cerretti *et al.*, 1992; Thornberry *et al.*, 1992). Ces cytokines pro-inflammatoires, dont l'expression est induite par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, sont essentielles dans l'induction de la réponse adaptative par le recrutement de lymphocytes au site d'infection (Akira *et al.*, 2006; Ippagunta *et al.*, 2011). Un récent travail démontre que ZIKV, par une action directe de la protéine NS5, induit une réponse inflammatoire par l'activation de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , qui aurait un rôle important dans la pathogénèse (Wang *et al.*, 2018). L'action antivirale ou provirale de cette voie sur ZIKV reste à définir. Dans le contexte de l'infection par WNV, la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les neurones infectés contrôle, *in vivo*, la propagation du virus dans le système nerveux central (Ramos *et al.*, 2012).

Les réponses de l'immunité innée permettent donc une surveillance à la fois des compartiments intra- et extracellulaires grâce à de nombreux PRRs spécialisés dans la reconnaissance d'éléments moléculaires, que ce soit à partir de motifs structurants ou selon une localisation subcellulaire aberrante. Les signalisations induites par ces voies concourent à la translocation nucléaire de facteurs de transcription, qui activent l'expression d'effecteurs soit directement ou *via* la production d'IFN-I et -III, et la modulation de la réponse adaptative par des cytokines inflammatoires.

## B.2. Les effecteurs antiviraux de la réponse interféron de type I et de type III

L'activation des facteurs de transcription IRF3 et/ou IRF7 induit la production d'IFN de type I (IFN- $\alpha/\beta$ ) et de type III (IL28/IL29, ou IFN- $\lambda$ ). Une fois sécrétés, l'IFN-I et -III ont une action autocrine et paracrine par liaison, respectivement, au complexe hétérodimérique des récepteurs IFNAR1 et IFNAR2 présents sur toutes les cellules nucléées, et des récepteurs IFNLR1 et IL10R2 (Hoffmann *et al.*, 2015).

Les cellules spécialisées dans la production d'IFN de type I et de type III sont les pDCs du fait d'une expression constitutive du facteur IRF7 (Swiecki and Colonna, 2015). Ces cellules circulantes de l'immunité innée ont donc un rôle de sentinelle. Un contact physique avec les cellules infectées est nécessaire pour l'activation des pDCs et la production d'IFN-I et -III par détection des déterminants viraux, incluant les acides nucléiques, par TLR7 et TLR9 (Webster *et al.*, 2016). Pourtant, les pDCs ne sont pas susceptibles à l'infection. Dans le cas d'infections par des virus à ARN, et plus particulièrement dans le cas d'infections par des virus de la famille des *Flaviviridae*, les pDCs sont capables d'induire une forte réponse immunitaire *via* la reconnaissance par TLR7 d'ARN du VHC transmis par des exosomes, ou encore par la reconnaissance de particules non-infectieuses de DENV, les virions immatures (Décembre *et al.*, 2014; Dreux *et al.*, 2012).

L'action antivirale de l'IFN-I (ou -III) réside dans l'activation de la voie JAK-STAT (pour *janus kinase-signal transducers and activators of transcription*). La dimérisation des récepteurs active les kinases JAK1 et TYK2 et permet la phosphorylation des facteurs de transcription STAT1 et STAT2. Une association de ces facteurs avec IRF9 va permettre au complexe d'activer l'expression des ISGs, par liaison de la région promotrice ISRE (Brubaker *et al.*, 2015; Hoffmann *et al.*, 2015).

Les ISGs regroupent des centaines de facteurs cellulaires, incluant des ribonucléases (*e.g.*, RNase L) ayant des actions directes sur la réplication virale, des molécules co-stimulatrices, des cytokines et des chimiokines essentielles à l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative. Une partie de ces ISGs, dits « précoces », peut être directement induite par l'infection virale, suite à l'activation de IRF3, tel que ISG15 (Nakaya *et al.*, 2001). Outre le fait de promouvoir la réponse adaptative, certains ISGs sont des PRRs, tel que RIG-I, permettant ainsi une meilleure amplification de la réponse IFN dans un foyer infectieux, ainsi que des effecteurs ayant une fonction antivirale directe. Parmi ces effecteurs, certains ont une

action décrite contre les flavivirus. Les protéines transmembranaires IFITMs (appelées *interferon-induced transmembrane protein*), et plus particulièrement IFITM3, sont antivirales dans le cas d'infection par DENV (Zhu *et al.*, 2015) ou encore ZIKV (Monel *et al.*, 2017; Savidis *et al.*, 2016), bien que le mécanisme d'action reste à élucider. Les endoribonucléases sont aussi des ISGs directement antivirales contre WNV (Scherbik *et al.*, 2006) telles que la RNase L ou encore la protéine Vipérine, ou à l'encontre de différents flavivirus mais dont le mode d'action différerait selon les flavivirus et est encore débattu (Panayiotou *et al.*, 2018; Szretter *et al.*, 2011; Vonderstein *et al.*, 2017).

Outre l'action directe des ISGs sur la réplication virale, la réponse IFN module les réponses impliquées dans le devenir de la cellule. L'IFN-I et -III sont notamment responsables d'un effet antiprolifératif sur les cellules en bloquant la phase G1 de la mitose (Chawla-Sarkar *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2014). L'IFN-I est également impliqué dans l'activation de la voie pro-apoptotique, liée à la caspase 8, par une détérioration du réseau mitochondrial de la cellule (Chawla-Sarkar *et al.*, 2001, 2003; Estornes *et al.*, 2012). Bien que principalement induit et sécrété à la suite de la reconnaissance d'un signal de danger, l'IFN-I peut également être produit faiblement de manière constitutive dans un organisme afin de moduler de nombreux effets biologiques tel que le maintien de la niche des cellules souches hématopoïétiques (CSH), ou lors du remodelage osseux (Gough *et al.*, 2012).

### B.3. Implication de la réponse immunitaire dans la pathogénèse et la propagation virale

#### *B.3.a) Conséquences de la réponse immunitaire humorale sur la pathogénèse des flavivirus : exemple de l'ADE*

Dans le cas d'infections secondaires par différents flavivirus tels que WNV, DENV et ZIKV chez l'humain, la réaction croisée d'anticorps préexistants provenant de la première infection peut favoriser le phénomène d'ADE. Les particules virales, infectieuses ou non, interagissent avec les anticorps peu neutralisants *via* la glycoprotéine E ou la protéine structurale prM, et le complexe est alors internalisé par interaction avec le récepteur de la région constante des anticorps des cellules myéloïdes (Dowd *et al.*, 2011; Sariol *et al.*, 2017). Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que ce mécanisme promeut une meilleure infection des cellules myéloïdes et l'apparition de symptômes graves (Katzelnick *et al.*, 2017). La similarité de séquence et de structure entre les sérotypes de DENV, mais également de ZIKV, permet une réaction croisée de ces anticorps, bien que cela n'ait pu encore être prouvé *in vivo* dans le cas d'infection par

ZIKV (Sariol *et al.*, 2017). Ce phénomène d'ADE devrait être considéré lors de la conception de vaccins contre DENV/ZIKV basés sur l'activation de la réponse humorale ; ces vaccins pourraient en effet entraîner une maladie exacerbée du fait d'une infection ultérieure par DENV/ZIKV, comme récemment illustré dans le cadre de la campagne de vaccination par Sanofi-Pasteur.

### *B.3.b) Conséquences de la production de cytokines/chimiokines sur la pathogénèse des flavivirus*

Des complications graves chez les patients infectés par DENV, tels que l'apparition de symptômes hémorragiques et de syndromes de choc, sont la conséquence directe d'un événement appelé « tempête de cytokines » (Tisoncik *et al.*, 2012). Un haut niveau de cytokines pro-inflammatoires circulantes peut être détecté suite à l'activation de la réponse immunitaire innée, amenant à une hyperperméabilité des capillaires sanguins et une fuite de liquide du sang vers le liquide interstitiel. On retrouve dans le plasma des patients une forte production d'IFN- $\alpha$ , de différentes interleukines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10) et de chimiokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL-8, CXCL-10, CXCL-11) par les monocytes, macrophages, hépatocytes et par les cellules endothéliales. Une contribution à cet emballement du système immunitaire *via* les lymphocytes T a également été proposée (Rothman, 2011). Outre l'aspect délétère de la production de molécules pro-inflammatoires, la production des chimiokines a un rôle déterminant dans l'évolution d'infections, notamment par des virus neurotropes. La sécrétion constitutive et importante des chimiokines CCL2 et CCL5 induite par WNV est impliquée dans le recrutement de cellules NK au système nerveux central et permet une clairance de l'infection (Glass *et al.*, 2005; Rothman, 2011). Par exemple, la production de CCL2 et CCL4 provoque le recrutement de macrophages et de cellules dendritiques au site d'infection. La migration de ces cellules, susceptibles à l'infection par de nombreux flavivirus, aux ganglions lymphatiques drainants a été proposée comme mécanisme de dissémination du virus dans l'organisme (Hamel *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 1995; Tassaneeritthep *et al.*, 2003).

### *B.3.c) Conséquences de la production d'IFN-I sur la pathogénèse de ZIKV*

Dans le contexte d'infections par ZIKV, une action néfaste de la réponse immunitaire innée a été décrite au niveau du placenta. En effet, l'étude de l'infection par ZIKV dans le modèle murin déficient pour les récepteurs à l'IFN-I (*ifnar1*<sup>-/-</sup>) démontre une importante restriction de la croissance fœtale avec apparition de lésions placentaires et une résorption fœtale *via* les

récepteurs à l'IFN-I (Yockey *et al.*, 2018). Bien que la propagation virale soit plus importante chez les fœtus *ifnar1<sup>-/-</sup>*, le développement est normal et les fœtus survivent plus longtemps que les portées *ifnar1<sup>+/-</sup>* (Yockey *et al.*, 2018). Un traitement *ex vivo* par IFN-I d'explants de villosités chorales humaines en gestation induit une altération de la morphologie du placenta et une réorganisation du cytosquelette des villosités (Yockey *et al.*, 2018). L'IFN-I serait donc impliqué dans les complications de grossesses tels que le développement de fausses-couches ou un retard de croissance du fœtus.

### *B.3.d) Conséquences de l'activation de TLR3 sur la pathogénèse des flavivirus*

L'activation de TLR3 a de fortes conséquences sur la neuroinvasion de virus à ARN, tel que WNV (Paul *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2004). La voie de signalisation TLR3 est notamment impliquée dans la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique, probablement par l'action pro-inflammatoire de la cytokine TNF- $\alpha$  (Wang *et al.*, 2004) et de la cytokine ostéopontine (Paul *et al.*, 2017).

Dans le cadre d'une infection des fibroblastes par ZIKV, la voie de signalisation TLR3 joue un rôle dans le contrôle de la réplication du virus (Hamel *et al.*, 2015). Par ailleurs, une activation de la voie TLR3 par infection par ZIKV induirait une augmentation de l'apoptose et une réduction de la taille des organoïdes cérébraux, modèles de la neurogénèse (Dang *et al.*, 2016). En accord, l'analyse du profil d'expression des gènes liés à l'activation de TLR3 met en avant une modification de l'expression de près de 40 gènes impliqués dans le développement neuronal (Dang *et al.*, 2016). Les auteurs proposent que l'activation des voies de l'immunité innée pourrait être à l'origine du développement de microcéphalies.

En conclusion, bien que la fonction primaire de l'immunité innée soit le contrôle de la propagation de pathogènes, de façon paradoxale, cette réponse peut entraîner la propagation virale par recrutement au site d'infection de cellules susceptibles de disséminer l'infection. L'exacerbation de cette réponse innée peut amener à l'apparition de pathologies graves lors d'infections par les flavivirus, comme cela a été également décrit dans le cas d'autres infections virales telle que la grippe (Pulendran and Maddur, 2015).

## **C. Adaptation virale et avantages sélectifs**

L'environnement est en constant changement, ce qui implique une adaptation permanente, à l'échelle de l'organisme, de la cellule et des micro-organismes tels que les virus. Dans un but de survie, des mécanismes d'adaptation existent en réponse à des modifications

environnementales qu'elles soient cellulaires, moléculaires, ou physico-chimiques/abiotiques. Ces différentes contraintes imposent une pression de sélection. A l'échelle des organismes, l'adaptation peut s'opérer par *i*) un changement de la réponse cellulaire (*e.g.*, échanges au niveau de la membrane plasmique afin de rétablir l'homéostasie dans des conditions hypotoniques) ou *ii*) par des mutations génétiques. Selon le principe de sélection positive, les mutations adaptatives conférant un avantage de survie et/ou de reproduction sont transmises aux futures générations. Les virus exploitent les fonctions cellulaires pour leur cycle viral. Cette dépendance implique une adaptation pour l'utilisation des ressources cellulaires disponibles (*e.g.*, machinerie cellulaire de traduction, trafic/transport vésiculaire, métabolisme, etc.), ainsi qu'aux perturbations de cet environnement cellulaire.

Les virus à ARN possèdent un génome ayant une grande variabilité/flexibilité génétique de par leur taux de mutations 1000 fois plus élevé (*i.e.*, taux de  $1 \times 10^{-5}$  mutations par nucléotides environ) en comparaison d'organismes complexes, comme l'Homme (*i.e.*, taux de  $2.5 \times 10^{-8}$  mutations par nucléotides environ) (Nachman and Crowell, 2000). En effet, la plupart des virus à ARN ne possèdent pas de mécanismes de réparation ou de correction de leur génome suite à la réplication de leur génome. Un tel fonctionnement serait délétère à l'Homme, notamment par l'apparition de mutations impliquées dans le développement de cancers ou de multiples pathologies génétiques (Friedberg et al., 2002).

## C.1. Co-évolution hôte/virus et transmission inter-espèce

### C.1.a) Co-évolution hôte/virus

L'hôte et le virus exercent des pressions de sélection réciproques, d'où le principe de co-évolution, à savoir que l'hôte et le parasite évoluent continuellement en suivant les adaptations de l'autre. La dynamique de ces interactions suit le modèle dit de « la reine rouge » qui implique un avantage reproductif à la présence d'une interaction entre l'hôte et le parasite (Morran *et al.*, 2011). Il existe également un compromis évolutif pour le virus entre niveau de transmission et virulence. En effet, si l'infection par le virus affaiblit ou induit une morbidité trop élevée et/ou rapide chez son hôte, cela compromet les chances de transmission/propagation du pathogène (Bohannan and Lenski, 2000). Par ailleurs, lorsque les virus, tels que les arbovirus, infectent plusieurs espèces d'hôtes génétiquement éloignées, le phénomène de co-évolution impose une flexibilité génétique du virus pour le passage inter-espèce.

### *C.1.b) Influence de la diversité génétique sur la transmission inter-espèce*

La compétence de diversification génétique rapide des virus contribue probablement à leur capacité à se propager en augmentant le nombre d'hôtes susceptibles/permisifs à l'infection, appelé le « passage de la barrière d'hôte ». Par exemple, pour certains virus, notamment Ebola, le changement d'hôte peut être possible seulement par l'adaptation à l'utilisation des récepteurs du nouvel hôte (Ng *et al.*, 2015). Le développement d'une population virale génétiquement diverse permet également une perpétuelle adaptabilité à l'environnement cellulaire dans le but d'en exploiter les fonctions et de contrer les réponses cellulaires de leurs hôtes.

### *C.1.c) Influence des co-infections et de la structuration des populations*

La théorie de l'évolution sociale offre un cadre conceptuel pour l'étude de l'évolution des interactions virus-virus, omniprésentes et très diverses, allant du conflit à la coopération. Par exemple, certains virus ont besoin d'un autre virus « auxiliaire » pour compléter leur cycle d'infection (tels que les « *adeno-associated virus* » (AAV) en association avec le virus de l'herpes ou les adénovirus). D'autres exemples montrent que les virus peuvent être activés ou inhibés par la présence d'infections virales secondaires.

La dispersion du virus ou de l'hôte peut également influencer l'évolution de la virulence. Dans le cas d'une population structurée dans l'espace avec une dispersion limitée des virus et des hôtes, une souche virale qui se développe rapidement peut « épuiser l'approvisionnement local d'hôtes » (Kerr *et al.*, 2015). Les modèles théoriques prédisent que de telles populations structurées spatialement influencent l'évolution virale vers une virulence plus faible et donc une « exploitation plus prudente » de l'hôte, comme cela a été vérifié expérimentalement pour la première fois pour un virus d'insecte (Boots and Meador, 2007). La coopération, en terme d'évolution, signifie qu'un trait d'un individu procure un avantage à un autre individu (bénéfice mutuel ou altruisme, ou qui pourrait s'apparenter à la notion de « gagnant-gagnant ») et que ce trait a évolué au moins partiellement en raison de ce bénéfice (West *et al.*, 2007). Les produits viraux et/ou l'induction par les virus de l'expression d'ARNm et de protéines cellulaires peuvent fournir un avantage collectif aux autres variants présents dans la cellule, telle que par exemple la synthèse de facteurs viraux ou cellulaires bloquant l'immunité de l'hôte. Le fait que ces facteurs agissent comme des « biens publics » permet, mais ne garantit pas, la coopération (Chao and Elena, 2017).

## C.2. Impact de la diversité génétique des virus à ARN sur la propagation virale

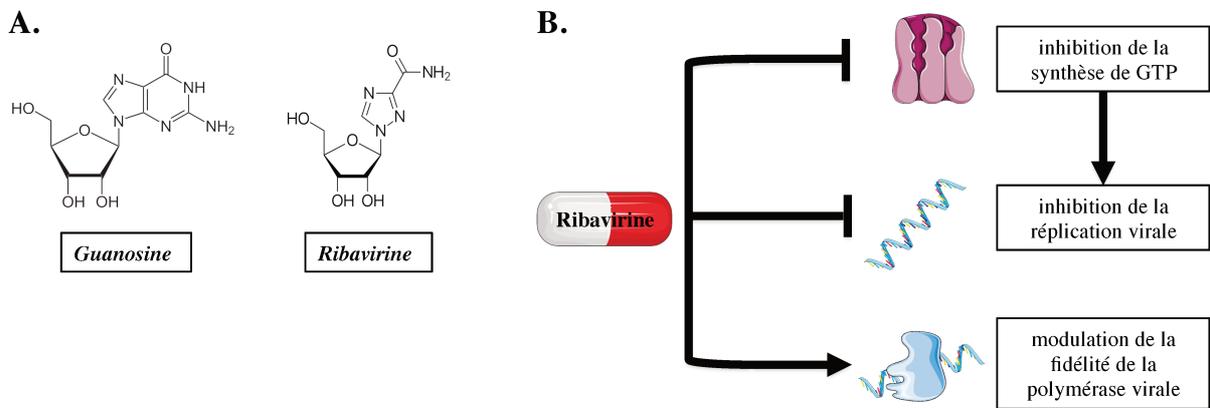
La réplication des virus à ARN, tels que les flavivirus, est assurée par l'ARN polymérase virale (voir section A.3.). Comme mentionné en introduction de cette section C, le taux d'erreurs de la polymérase des virus à ARN est de l'ordre d'une erreur par  $10^4$  à  $10^5$  nucléotides copiés (Sanjuán and Domingo-Calap, 2016). Ainsi, pour les flavivirus, dont la taille de génome est d'approximativement 10 000 nucléotides, un cycle de réplication du génome donne lieu à une population de virus ayant incorporé théoriquement une mutation par génome viral.

Plusieurs travaux ont contribué à élucider l'impact de la diversité génétique virale sur la propagation des virus, incluant la modulation de la fidélité de la polymérase et les événements de recombinaison de génomes viraux. La diversité génétique virale peut aussi être modulée par des protéines cellulaires.

### C.2.a) Influence de la fidélité de la polymérase sur l'efficacité de la propagation virale

Des traitements par agents mutagènes, tels que des analogues de bases utilisés comme thérapeutiques antiviraux, ont conduit à l'apparition de phénotypes « mutator » (perte de fidélité de la polymérase virale) ou « antimutator » (augmentation de fidélité) dans le contexte de l'infection par les virus poliovirus (Pfeiffer and Kirkegaard, 2003) et Chikungunya (Coffey *et al.*, 2011). Pour l'arbovirus Chikungunya, la mutation « antimutator » (mutation ponctuelle C483Y au niveau de la polymérase virale) a été observée après 5 passages en lignées cellulaires traitées à l'analogue de bases Ribavirine (**Figure 7.A-B**). Ce mutant, devenu résistant à l'action de la Ribavirine et présentant une augmentation de la fidélité de la polymérase, a une propagation virale *in vivo* réduite chez ses deux hôtes, mammifère et moustique (Coffey *et al.*, 2011). Un phénotype « mutator », chez le même arbovirus, est obtenu par une autre substitution à la même position (C483A/G/W). La réplication virale de ce virus muté « mutator » est similaire à la souche sauvage parentale chez l'hôte mammifère. En revanche, elle est diminuée chez le vecteur moustique, et en conséquence cette mutation réverse au statut sauvage (Rozen-Gagnon *et al.*, 2014). Les modulations de fidélité ne confèrent pas un avantage répliatif à ce virus. De plus, l'influence de la fidélité, et donc de la diversité génétique virale, sur la capacité de réplication virale est différente selon l'hôte du virus Chikungunya. Les auteurs écartent les conditions de température et de pH comme étant les causes de cette différence et proposent l'implication de facteurs d'hôtes encore inconnus. Dans le cas d'infection par des alphavirus, à l'inverse des flavivirus où une large diversité

virale est conservée, une adaptation plus lente lors de passages inter-hôte a été décrite par les auteurs, pouvant expliquer ces observations.

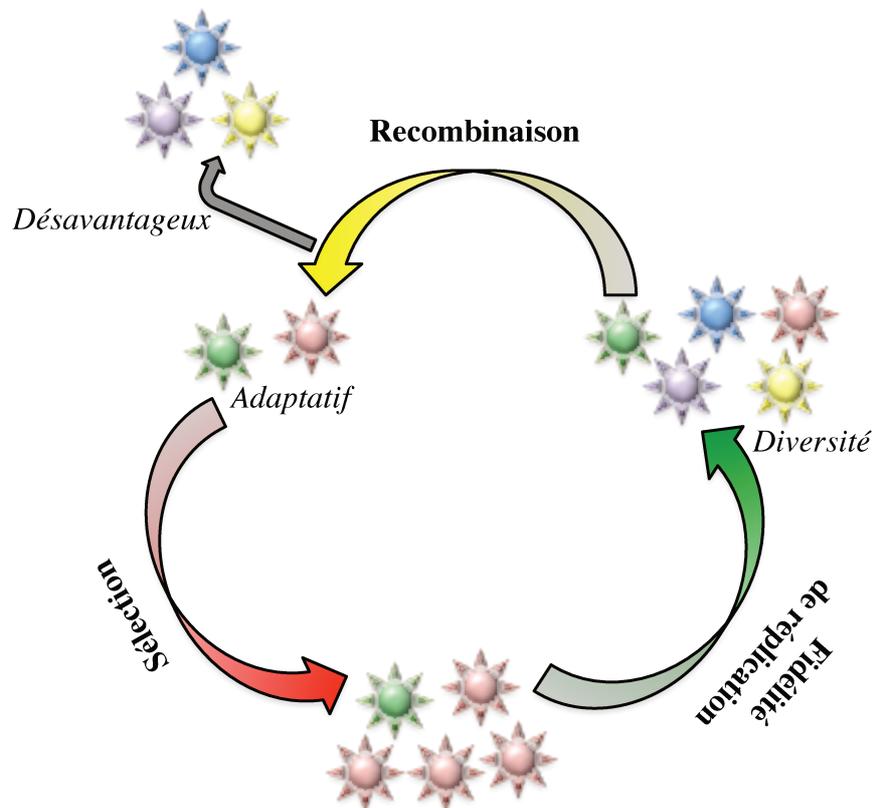


**Figure 7 : Action d’analogues nucléotidiques sur la mutagénèse des virus à ARN. A.** Représentation de la structure chimique conservée entre la guanosine et son analogue, la Ribavirine. **B.** Résumé des implications de la Ribavirine sur la réplication des virus à ARN.

### *C.2.b) Influence de la recombinaison inter-génome sur l’efficacité de la propagation virale*

Les évènements de recombinaison entre génomes, fréquents chez les virus à ARN, contribuent à l’évolution de la diversité génomique virale. Lors de la réplication des poliovirus, le mécanisme suivant a été décrit : *i*) un arrêt précoce de la synthèse d’ARN par la polymérase virale et dissociation de l’ARN matrice, *ii*) suivi par une réassociation du complexe sur un autre génome et continuité de la réplication à partir d’une matrice différente. Le résultat final est l’obtention d’un génome viral chimérique (Kirkegaard and Baltimore, 1986). Lors de passages successifs du poliovirus *in vitro*, une mutation de la polymérase du virus conduit à une perte de recombinaison entre les virus, sans affecter la fidélité de la polymérase. L’apparition du phénotype « perte de recombinaison » entraîne une accumulation de mutations (aussi bien bénéfiques que délétères) plus importante, en comparaison du virus sauvage. Une diminution de la propagation virale *in vivo* indique également que la recombinaison virale participe grandement à la sélection de variants génétiques parmi la diversité génétique de la population virale (Xiao *et al.*, 2016). Une autre étude sur l’influence de la recombinaison sur la diversité génétique et la réplication virale, réalisée sur le virus Sindbis, démontre que l’augmentation de la capacité de recombinaison est associée à un phénotype « mutator » (Poirier *et al.*, 2016). Cependant l’augmentation de diversité génétique du « mutant super-mutagène » est alors délétère à l’efficacité de propagation virale. Cette observation est donc en opposition avec l’étude mentionnée précédemment sur le poliovirus (Xiao *et al.*, 2016). Les auteurs proposent alors que l’augmentation de production de

particules défectives bloque la réplication du génome complet du virus Sindbis (Poirier *et al.*, 2016) (**Figure 8**).



**Figure 8 : Schématisation de la relation entre la fidélité de la polymérase virale, la recombinaison de génomes viraux, et la sélection de variants.** L'interaction entre le taux de mutations et la recombinaison permet aux virus de profiter de quelques mutations bénéfiques sans être submergés par de nombreuses mutations délétères (adapté de Xiao *et al.*, 2016).

L'analyse de l'impact de la perte ou du gain de capacité de recombinaison pour des virus génétiquement éloignés révèle donc des disparités de phénotypes. Ces divergences phénotypiques pourraient être la conséquence de différences *i*) de cycle de réplication de ces virus, *ii*) d'hôtes, *iii*) de types cellulaires infectés, etc..., ainsi que du gain en diversité génétique conféré par le mutant étudié dans chacun de ces cas.

Des études *in vitro* et *in silico*, à partir de séquences issues de patients, de mammifères et/ou de vecteurs mettent en évidence l'occurrence d'évènements de recombinaison pour différents virus de la famille des *Flaviviridae* tels que DENV, ZIKV et VHC (Faye *et al.*, 2014; Twiddy and Holmes, 2003). La capacité de recombinaison et sa contribution à l'adaptation de la population virale chez les flavivirus restent encore largement inconnues.

### *C.2.c) Modulation de la diversité génétique virale par des facteurs de l'hôte et impact sur l'efficacité de la propagation virale*

Plusieurs effecteurs des réponses antivirales de l'hôte, notamment les ISGs (présentés en section B), sont des désaminases et peuvent cibler le génome viral en conduisant ainsi à l'apparition accrue de mutations. Par exemple, les protéines de la famille ADAR (« *double-strand RNA-dependent adenosine deaminases* ») modifient les adénosines en guanosines. Les protéines de la famille APOBEC (« *apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide-like enzymes* ») convertissent les cytosines en uraciles (Sanjuán and Domingo-Calap, 2016). Bien que ces réponses aient été démontrées comme responsables de l'apparition de souches non-infectieuses, conséquence de l'hyper-mutation, il est également proposé que des mutations à faibles fréquences permettent l'émergence de virus viables et résistants aux traitements antiviraux. Par exemple, les mutations E138K et M184I dans la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) de type 1 sont fréquemment détectées en culture cellulaire (après seulement 2 passages) et dans les cellules mononuclées du sang périphérique de patients infectés. Elles résultent de l'action d'APOBEC3G et confèrent une résistance aux traitements antirétroviraux ayant pour cible la transcriptase inverse du virus (Fourati *et al.*, 2012).

Les connaissances sur le mode d'action des désaminases est d'intérêt majeur puisqu'elles représentent une cible potentielle pour le développement de traitements antiviraux, aussi bien pour des infections par des virus à ADN qu' à ARN. Cependant, de par leurs rôles putatifs dans le développement de cancers (Roberts *et al.*, 2013), une meilleure compréhension de ces facteurs d'hôte est nécessaire.

### *C.3. Mécanisme d'échappement viral aux réponses de l'hôte*

Comme détaillé en section B de l'introduction, les cellules hôtes de virus possèdent de nombreux senseurs et voies de signalisation afin de détecter et répondre aux infections virales. Les virus ont également des stratégies d'évasion et d'inhibition de ces réponses de défense.

#### *C.3.a) Echappement de la réponse immunitaire humorale*

Un des mécanismes de défense de l'hôte est la production d'anticorps neutralisants qui, par reconnaissance spécifique des particules virales et encombrement stérique, empêchent alors l'interaction virus-cellule cible et donc l'entrée virale. Néanmoins, de nombreux virus, au cours de l'évolution virale, deviennent résistants aux anticorps neutralisants. Chez les virus enveloppés, les glycoprotéines de surface du virus, bien qu'essentielles à l'entrée du virus

dans la cellule, présentent un degré de variabilité de séquence dans certaines régions/segments. Par exemple, le VHC possède une région hypervariable et fortement antigénique correspondant aux 27 premiers acides aminés en N-terminal de la glycoprotéine E2, appelée « *hypervariable region 1* » (HVR1). Cette région est impliquée dans la liaison aux facteurs d'entrée mais possède néanmoins un degré de diversité génétique qui concourt à l'échappement aux anticorps neutralisants et agit donc comme un leurre antigénique (Bartosch *et al.*, 2005; Dreux *et al.*, 2006). Une autre stratégie d'échappement à la réponse immunitaire humorale est l'incorporation dans la membrane virale de protéines cellulaires, permettant la liaison des virions à des facteurs/récepteurs en surface cellulaire, facilitant ainsi leur entrée cellulaire et ne pouvant pas être la cible de la réponse humorale. La présence de phosphatidylsérine dans la membrane virale est essentielle à l'attachement et à l'entrée de nombreux virus enveloppés par association avec les récepteurs TIM/TAM (Jemielity *et al.*, 2013). De plus l'incorporation des virions dans des vésicules dérivées de l'hôte pourrait aussi concourir à l'échappement immunitaire. Par exemple, DENV induit la sécrétion de vésicules associées à la machinerie de l'autophagie (Wu *et al.*, 2016), ce qui pourrait contribuer à sa protection face aux anticorps neutralisants bien que cela n'ait pas encore été formellement démontré.

### *C.3.b) Adaptation à la réponse immunitaire innée par inhibition au niveau de la reconnaissance des produits viraux*

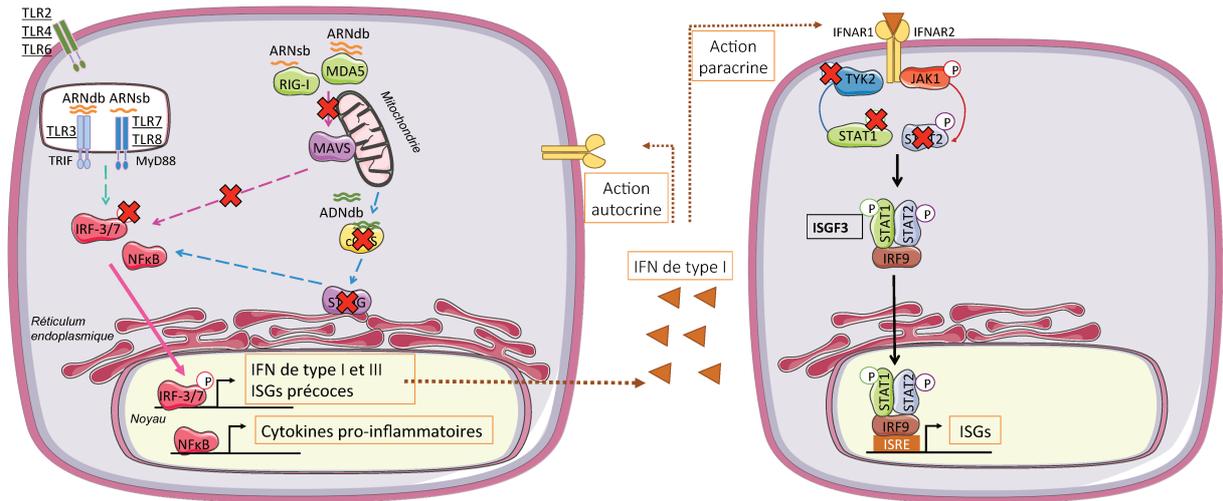
Comme mentionné en section B de l'introduction, le génome viral est détecté en intracellulaire par les réponses immunitaires innées. De nombreux mécanismes d'inhibition virale de ces réponses sont connus, ciblant notamment les senseurs cytoplasmiques qui reconnaissent les génomes viraux, et en particulier les intermédiaires de réplication. Par exemple, les sfRNAs, pour « *subgenomic flavivirus RNA* », générés par dégradation partielle du génome des flavivirus (*e.g.*, DENV et WNV), peuvent inhiber l'activité de la réponse d'interférence à ARN par compétition *via* des interactions directes avec les protéines cellulaires Dicer et AGO2, impliquées dans la réponse antivirale chez le vecteur moustique (Moon *et al.*, 2015; Schnettler *et al.*, 2012). Les sfRNAs, non-codants, correspondent à la région 3'-UTR du virus et ont une taille de 184 à 423 paires de bases (Filomatori *et al.*, 2017). Ils sont générés suite à la digestion par XNR1, une exoribonucléase ayant une activité 5'-3' dont l'action est stoppée au niveau des parties structurées du génome, présentes dans les extrémités non-codantes 5'-UTR et 3'UTR (*e.g.*, tige-boucles) (voir section A de l'introduction).

De plus, selon de récentes données, les sfRNAs des virus DENV, WNV et ZIKV ont probablement d'autres mécanismes inhibiteurs de la réponse antivirale chez l'Homme (Donald *et al.*, 2016; Schnettler *et al.*, 2012) ; les sfRNAs de DENV bloquent notamment la désubiquitination d'une E3 ligase, TRIM25, empêchant ainsi l'amplification de la réponse RIG-I et de la réponse IFN associées (Manokaran *et al.*, 2015).

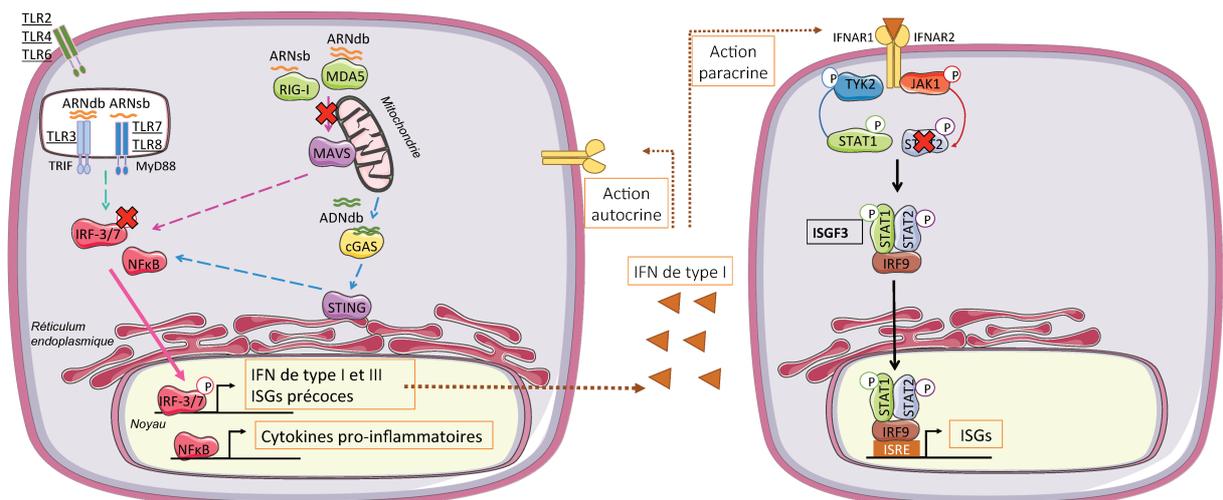
### *C.3.c) Adaptation à la réponse immunitaire innée par l'inhibition d'adaptateurs de voies antivirales*

Outre l'inhibition de la reconnaissance d'éléments viraux par les senseurs, les virus possèdent des mécanismes pour bloquer la transmission de la signalisation antivirale par interactions avec les adaptateurs des voies. En effet, de nombreux mécanismes de dégradation directe ou indirecte de ces molécules de signalisation par plusieurs virus de la famille des *Flaviviridae* ont été démontrés *in vitro*. Dans le contexte du VHC, le complexe NS3-4A inhibe la réponse RLR par une interaction avec MAVS, suivi de la dégradation de cette protéine adaptatrice par clivages protéolytiques (Meylan *et al.*, 2005). Un mécanisme similaire est proposé dans le contexte de l'infection par DENV : la protéine virale NS2B3 interagit avec le senseur STING et l'inactive aussi par clivage protéolytique (Aguirre *et al.*, 2012) (**Figure 9**). Ces différentes actions des protéases virales limitent l'induction de la production d'IFN de type I (et probablement type III, bien qu'encore peu décrit) et permettent donc une meilleure propagation virale.

En outre, une stratégie virale d'inhibition de la réponse innée repose sur l'inhibition de facteurs de signalisation requis pour un ensemble de voies de la réponse IFN de type I/III, et présente donc une portée plus large sur la réponse de l'hôte. Ce type d'inhibition virale est partagé par de nombreux virus de la famille des *Flaviviridae*. Un des mécanismes, démontré principalement *in vitro*, consiste en le blocage de la kinase TBK1, impliquée dans la phosphorylation de IRF3 (**Figure 9-10**). Par exemple, l'étude des protéines NS2A et NS4B de



**Figure 9 : Contrôle des réponses immunitaires innées par les virus de la famille des *Flaviviridae*.** Représentation globale des voies de l'immunité innée contrôlées, partiellement ou totalement, par le VHC, DENV, WNV et JEV. La croix rouge représente des événements d'inhibition de voie, de perte de phosphorylation ou de dégradation de protéine en fonction de la localisation sur la protéine cible.



**Figure 10 : Contrôle des réponses immunitaires innées par ZIKV.** Représentation globale des voies de l'immunité innée contrôlées, partiellement ou totalement, par ZIKV. La croix rouge représente des événements d'inhibition de voie, de perte de phosphorylation ou de dégradation d'adaptateurs en fonction de la localisation sur la protéine cible.

DENV (uniquement pour les sérotypes 1/2/4), et également NS4B de WNV, a mis en évidence une perte d'induction de la production d'IFN- $\beta$  liée à l'inhibition de phosphorylation de TBK1 par ces protéines virales (Dalrymple *et al.*, 2015a). Les protéines NS1 et NS4B de ZIKV sont également impliquées dans la perte d'activité de TBK1 et, en conséquence, possiblement responsables de la diminution de production d'IFN de type I (Onorati *et al.*, 2016). Dans le cas d'infections par le VHC, une interaction entre la kinase TBK1 et la protéine virale NS2 serait responsable de l'inhibition (Kaukinen *et al.*, 2013). De par la

conservation de mécanismes inhibiteurs entre les virus de cette famille, le contrôle de l'activation des voies cellulaires par la modification de la fonction de TBK1 semble donc être crucial pour l'efficacité de propagation de ces virus. Outre l'activation de IRF3, TBK1 est également impliquée dans la régulation de divers processus biologiques tels que l'autophagie, le devenir cellulaire ou encore l'homéostasie cellulaire (Sellier *et al.*, 2016; Wild *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011). Ainsi, l'inhibition de TBK1 par des produits viraux pourrait contribuer indirectement à la propagation virale et/ou à la pathogénèse.

Un second niveau d'interaction par les virus cible la réponse à l'IFN de type I/III par inhibition de la cascade de signalisation ou une dégradation des facteurs de transcription de la famille STAT. La protéine virale NS5 est responsable de cette inhibition de la voie JAK-STAT *via* différents mécanismes et avec des cibles cellulaires qui diffèrent selon les virus. Concernant JEV (Lin *et al.*, 2006), TBEV (Werme *et al.*, 2008), WNV (Laurent-Rolle *et al.*, 2010) et VHC (Kumthip *et al.*, 2012), une inhibition de la phosphorylation de STAT1 corrèle avec une diminution de la réponse IFN. En revanche, les infections par DENV (Ashour *et al.*, 2009) et YFV (Laurent-Rolle *et al.*, 2014) modulent respectivement l'activité de STAT2 par une dégradation ou une inhibition de cet adaptateur par l'action de la protéine virale NS5 (**Figure 9**). Par ailleurs, des études *in vitro* ont mis en évidence la dégradation de la protéine humaine STAT2 par la protéine NS5 de ZIKV, alors que l'orthologue murin est résistant à la dégradation (Grant *et al.*, 2016) (**Figure 10**). Le mécanisme d'inhibition est différent de celui de DENV et est encore inconnu à ce jour. Bien que les mécanismes divergent, cette voie est une cible commune pour les virus d'une même.

## II. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

ZIKV est responsable d'anomalies du développement neuronal chez le fœtus, de fausses-couches, et d'atteintes neurologiques, tel que le syndrome de Guillain Barré chez l'adulte. La réponse à l'IFN-I/III et l'activation de senseurs de l'immunité innée (*i.e.*, TLR3) contribuent au contrôle de l'infection virale *in vitro* et *in vivo*, incluant la transmission dans le compartiment fœtal. L'exacerbation de ces réponses immunitaires lors de l'infection contribuerait aussi à la pathogénèse neuronale.

Les virus à ARN présentent une importante capacité à s'adapter à des pressions de sélection environnementales. Au cours de processus évolutifs les virus acquièrent des capacités de modulation de certaines voies de défenses de l'hôte par l'adaptation évolutive des interactions

et inhibitions *via* les protéines virales. Cependant, les relations génétiques et moléculaires entre ZIKV et les réponses immunitaires innées, et notamment l'IFN-I/III, restent encore à définir.

Mon objectif de thèse a visé, dans un premier temps, à suivre l'apparition de variants viraux adaptés à l'activation de la voie TLR3, devenant donc résistant à cette inhibition, puis de définir les mécanismes et les déterminants viraux impliqués dans ce phénomène adaptatif.

Dans ce but, j'ai effectué des passages itératifs de ZIKV dans un environnement cellulaire contrôlé présentant une activité TLR3 élevée, avec pour référence/comparaison des cellules déficientes pour la voie TLR3. J'ai démontré que ZIKV acquiert une résistance à l'activation de cette voie. De façon intéressante, la résistance est aussi observée dans la condition de référence (en absence de pression sélective exercée par la voie TLR3). J'ai donc mis en place une étude plus approfondie des paramètres de *i*) l'infection et de la réplication, et *ii*) l'activation et la résistance à la réponse IFN-I/III pour ces populations virales adaptées (en comparaison avec le virus parental), et *iii*) l'analyse génétique des populations virales par séquençage à haut débit. Ces différents niveaux d'analyses ont été réalisés au cours des passages itératifs des expériences d'évolution.

### III. RÉSULTATS

#### **Interactions of Zika virus with the antiviral responses by experimental evolution**

Vincent Grass<sup>1</sup>, Elodie Décembre<sup>1</sup>, Kassian Kobert<sup>2</sup>, Emilie Hardy<sup>1</sup>, Lee Sherry<sup>1</sup>, Alain Kohl<sup>3</sup>, Bastien Boussau<sup>2</sup> and Marlène Dreux<sup>1\*</sup>

1 CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, F-69007, LYON, France

2 UMR CNRS 5558 Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive (LBBE) - Université Claude Bernard Lyon 1, France

3 MRC - University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, Scotland, United Kingdom,

\* Author to whom correspondence should be addressed, email: [marlene.dreux@ens-lyon.fr](mailto:marlene.dreux@ens-lyon.fr), Tel.: + +33 426 23 38 34.

## Abstract

Zika virus (ZIKV) infection causes neurological diseases and birth defects representing an important threat for human health. Recent studies demonstrated that type I and III interferon (IFN-I/III) response is pivotal for the control of ZIKV spread and *in utero* transmission and regulates ZIKV-induced neurological diseases. Here, we conduct a genomic study of the evolution of the viral quasi-species in response to experimental modulation of the host antiviral signaling to delineate the genetic interactions with the IFN-I/III response in ZIKV genome and the viral escape mechanisms. We set up an experimental cell culture system to exert a selective pressure on ZIKV replication by the Toll-like receptor (TLR)-3-induced antiviral signaling. We uncovered that serially passaged ZIKV populations adapt to the antiviral response, as determined by their resistance to TLR3-induced restriction. The adapted viruses no longer induce IFN response, as assessed by the absence of interferon-stimulated gene upregulation. Foci size analysis revealed an increased viral spread of adapted viral populations. Consistently, the specific infectivity of viral population augments in the course of serial passaging, and is temporally associated to the viral resistance to TLR3-induced restriction. Next-generation sequencing and bioinformatics analysis of the viral evolution uncovered a candidate point mutation in E surface protein, as that frequency consistently increase and temporally correlated to the acquisition of the adapted phenotype. This S-to-L substitution at position 455 of E – lining at the edge of the amphipathic helix close to the trans-membrane domain, might likely regulating structural stability. A second candidate is in an amphipathic helix of NS4B, predicted to span on the lumen side of the ER membrane. The E mutation is not observed in the ZIKV sequence database, thus implying such viral evolution might be unheeded *in vivo* by a trade off with other requisite viral abilities. Altogether our results uncovered that ZIKV can acquire increased replication ability associated to resistance to antiviral response, an event likely primed by the loss of sensing by the host cells.

## **Introduction :**

Zika Virus (ZIKV), is a re-emerging mosquito transmitted flavivirus, related to other globally relevant arthropod-transmitted human pathogens, including Dengue (DENV), yellow fever (YFV), West Nile (WNV), Japanese encephalitis (JEV), and tick-borne encephalitis (TBEV) viruses. ZIKV has recently been associated with fetal demise, microcephaly and other congenital malformations in fetuses (Brasil *et al.*, 2016) and the Guillain–Barré syndrome in adults (Cao-Lormeau *et al.*, 2016). Previous epidemics and current spread in the Americas and the tropical regions reinforces the urgency to better understand ZIKV biology. Recent insight into ZIKV biology highlights that the host innate responses, notably the type I and III interferon (IFN) responses are central for ZIKV control as well as for its *in utero* transmission (Cugola *et al.*, 2016; Hamel *et al.*, 2015; Lazear *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016). These host responses are also pivotal for ZIKV-induced pathogenesis, including brain defect and fetal demise (Yockey *et al.*, 2018).

All cells possess signaling pathways designed to trigger production of type I (*i.e.*, IFN $\alpha$  and  $\beta$ ) and type III (*i.e.*, IL28A/B and IL29) IFNs (referred herein to as IFN-I/III) and IFN-stimulated genes (ISGs) upon viral invasion. The effects of IFN-I/III and ISGs are potent and wide-ranging. Notably, they directly block viral life cycle at multiple levels and they jumpstart the adaptive immunity. Such responses are induced by the recognition of specific viral motifs, especially viral nucleic acids by host receptors (*e.g.*, Toll-like receptors, TLRs) that mobilize the innate immune responses. Global transcriptomic analyses of the whole developing mouse brain revealed an enrichment for upregulated genes involved in immunity and apoptosis-related pathways upon ZIKV infection (Li *et al.*, 2016). TLR3 is known to recognize double-stranded RNA, an intermediate of viral replication. Like other flavivirus, TLR3 controls ZIKV

replication (Hamel *et al.*, 2015). Moreover, evidence highlights that ZIKV induces TLR3-signaling, which likely contributes to the regulation of the brain defect via an increased apoptosis (Dang *et al.*, 2016). Yet, virtually all viruses have evolved variants with the ability to modulate their interactions with the host proteins and hereby to counteract the IFN signaling and/or response. The detailed mechanisms by which ZIKV escapes the host antiviral responses remain to be determined.

ZIKV has a 10.8 kb genome of positive polarity, encoding a polyprotein composed of 3 structural proteins (C, prM and E) and 7 nonstructural (NS) proteins: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5. By analogy to other flavivirus, the NS proteins are involved in the steps of RNA synthesis and assembly of viral particles. Importantly, in flaviviruses, several NS proteins have been shown to interfere with the host immune responses, by interactions that seem to primarily occur through adaptive mutations modulating the requisite interactions with the proteins of the host. The mutation rate of the ZIKV has not been determined accurately yet. Nonetheless, as the catalytic site of NS5 polymerase is well-conserved (Bollati *et al.*, 2010), it is expected to be similar to other arboviruses, *i.e.*, around  $10^{-4/-5}$  mutation per site per replication. This high mutation rate ensure that a large number of mutations will occur at every site of the ZIKV genome, and hereby a rapid genetic diversity and adaptation of viral populations.

Here, by exploiting the viral property of rapid evolution, we aimed at delineating the genetic interactions with the host responses in ZIKV genome and the viral escape from these responses by an in-depth analysis of the evolution of the viral quasi-species (*i.e.*, population of genomes isolated from infected cell cultures supernatants). Upon serial passages of viral populations derived from an epidemic ZIKV strains, we uncovered a phenotypic change associated to

higher viral spread and temporally correlated to the increase in frequency of ZIKV variants with point mutations, thus representing candidate adaptive mutations. The phenotypes of the viral adaptation include a loss of ISG induction observed at early times post-infection by the initial/parental viral inoculum, followed by a gain of specific infectivity concomitant with resistance to the TLR3-induced antiviral responses.

## Results

### **Acquisition of resistance to TLR3-induced antiviral response during experimental evolution of ZIKV.**

To uncover the genetic interactions of ZIKV with the antiviral IFN-I/III responses, we designed a cellular model to perform experimental evolution upon selective modulation of the TLR3-induced signaling. Huh7.5.1 cells were elected as cell system, as they are well-known to be deficient for RIG-I- (Sumpter *et al.*, 2005) and for TLR3-induced signaling (Wang *et al.*, 2009). We first validate that Huh7.5.1 cells respond by a robust ISG up-regulation to a TLR3 agonist (*i.e.*, polyI:C) only upon ectopic expression of WT TLR3 (**Figure 1A and S1**). This is demonstrated by the quantification of IGS15 and MxA mRNA levels (**Figure 1A**), representative, respectively, of early response (*i.e.*, induced directly by transcriptional factors such as IRF3 downstream of sensor-induced signaling and indirectly by IFN-I/III receptor-induced signaling) and late response (*i.e.*, IFN-I/III receptor-induced expression) (Nakaya *et al.*, 2001). The specificity of TLR3-induced ISG response was further assessed in our cell model by the absence of ISG upregulation upon expression of a TLR3 mutant with deletion of the Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain of the cytosolic tail (*i.e.*,  $\Delta$ TIR), known to recruit the downstream adaptor, TIR domain-containing adaptor inducing IFN $\beta$  (TRIF, also known as TICAM-1) (Alexopoulou *et al.*, 2001), and used herein as reference (*i.e.*, control cells) (**Figure 1A**).

Next, experimental evolution was performed by serial passages of ZIKV in these cellular models (**Figure 1B**). As illustrated by the measurement of infectious virus production at 3 days post-infection, the TLR3-mediated signaling induced by polyI:C (3 hour incubation prior to infection) decreases the replication of parental virus (*i.e.*, infectious virus production levels indicated to as day 3; mean of 41.1 fold-reduction; standard deviation 14.3) and viral populations passaged once again in naïve modified cells (*i.e.*, referred to as day 6) (**Figure 1C**). Importantly, the inhibition by activated-TLR3 is lost in the course of serial viral passages in the 3 independent evolution experiments, as the infectivity levels in the supernatants of the TLR3-activated cells become comparable to those of the control cells by approximately 15 days of infection (*i.e.*, 5 iterative passages) (**Figure 1C**). Intriguingly, we observed that levels of viral production also augment in the control cells during the serial viral passaging until a plateau. Similar results were obtained using different read-outs of viral spread (**Figure 1C-D**).

Next, the acquisition of viral resistance to TLR3-induced antiviral response was further confirmed by comparing the replication levels in activated-TLR3 cells and control cells, using different inoculum sizes (*i.e.*, multiplicity of infectivity, MOI). As expected, TLR3-induced signaling prevents the replication of parental virus (**Figure 2A**) (approximately 10 fold-inhibition, in keeping with results of **Figure 1C**). When studying viral populations collected from activated-TLR3 cells, viral populations harvested at day 6 (*i.e.*, 2 iterative passages) were inhibited by TLR3 antiviral response to level similar to parental virus, whereas viral populations harvested at day 51 (*i.e.*, 17 iterative passages) are resistant to this antiviral response, independently of the viral dose used for infection (**Figure 2A**). An intermediate phenotype was observed for viral population contained in supernatants harvested at day 12 (*i.e.*, 4 iterative passages) (**Figure 2A**). Intriguingly, viral populations serially passaged in control

cells were also resistant to TLR3-induced antiviral response, as shown for supernatants harvested at day 51, and observed by day 12, albeit to a lower extent (**Figure 2B**).

Altogether our results demonstrated that the serially passaged viral populations resist to TLR3-induced antiviral response and viral adaptation occurs independently of the increased selective pressure applied through the induction of this host signaling.

### **Lost of ISG induction in response to infection by adapted viral populations.**

Next we aimed at understanding the event promoting the resistance to the antiviral response of passaged viral populations, including its occurrence in the absence of the selective pressure by TLR3-induced response. We hypothesized that viral inhibition and/or escape from the activation of ISG response might consequently promote their resistance to the antiviral response. To address this question, we assessed ISG induction upon infections by parental virus as compared to viral populations serially passaged in activated-TLR3 and control cells. The parental virus induced a potent ISG response in WT TLR3 expressing Huh7.5.1 cells, in a viral dose-dependent manner (**Figure 3A-C**). Importantly, ISG response to parental virus is also observed, albeit to lower levels, in absence of ectopic expression of WT TLR3 in Huh7.5.1 cells, thus implying that ZIKV likely induces ISG response independently of TLR3-mediated signaling (**Figure 3D-F**), yet a contribution of endogenous TLR3 in this context is not formally ruled out. In sharp contrast to parental virus, viral populations serially passaged in either activated-TLR3 cells or control cells (*i.e.*, harvested at day 36 and 51) fail to induce an ISG response at mRNA and protein levels at early time points post-infection (**Figure 3A-F and S1**).

The ISG response triggered by parental virus is detected as early as 6 hours post-infection with maximal response detected at 24 hours (**Figure 3A-F**). This suggested that this response might

be independent of viral replication, potentially by recognition of incoming viral particles themselves and/or exposure to activating signal present in the viral inoculum. Alternatively, the ISG response might vanish very rapidly upon infection by the adapted viral population. To address these possibilities, we determined the ISG upregulation at earlier time points post-infection. We showed that ISG response induced by parental virus occurs as early as 3 hours post-infection and is maintained upon UV-inactivation of viral supernatants (**Figure 3G-I and S1**), suggesting that this response is independent of viral replication. Additionally, UV-inactivated supernatant harvested after serial viral passages do not trigger ISG response (**Figure S2**), thus implying that for adapted viral populations the incoming viral particles and/or attendant-activating signal are likely not immuno-stimulator of the ISG response.

We observed a modest upregulation of ISG expression at 48 hours post-infection upon infections by the adapted viral populations (**Figure 3A-F**). The analysis at 72 hours post-infection confirmed that the serially passaged viral populations induce a moderate ISG expression at late time point post-infection (**Figure S3**). This response is higher for high-passage viral populations (*i.e.*, day 12 and 51) as compared to early-passage (*i.e.*, day 3 and 6) (**Figure S3B-D**), in keeping with higher replication levels of the former viral populations (**Figure S3A**). The ISG upregulation at late time points post-infection might result, at least in part, from sensing of viral replication, possibly indirectly by virus-induced cell damage. Nonetheless, the decrease of the ISG response to parental virus observed by 48 hours post-infections (**Figure 3A-F**) suggests a repression of the ISG response, likely by negative feedback regulations (*e.g.*, upregulation of suppressor of cytokine signaling; SOCS) (Schneider *et al.*, 2014). The absence, or poor, ISG response at 72 hours post-infection by early-passage viral populations (*i.e.*, day 3 and 6) might also be a consequence of an ISG induction at earlier time points by the viral inoculum.

Next, we thus determined the ISG response at early time points post-infection by viral populations harvested along the experimental evolution. The early-passage virus (*i.e.*, harvested at day 3 and 6) still induces an upregulation of ISGs (**Figure 3J-L**). Importantly, this ISG response becomes undetectable, or at the level of basal mRNA expression, for viral populations harvested by day 9 (*i.e.*, by 3 iterative passaging) of the evolution experiments (**Figure 3J-L**), suggesting that the loss of rapid ISG induction precedes the acquisition of resistance to TLR3-induced antiviral response (**Figure 1 and 2**).

Altogether our results suggested that the ISG response is likely induced by incoming viral particles and/or attendant activating factor(s). Moreover, we demonstrated that the ISG response at early times post-infection rapidly vanishes in the course of the viral evolution experiment, and is temporally inversely correlated to an ISG upregulation observed at later time post-infection. The observation of a loss of early time ISG response prior to the acquisition of resistance to TLR3-induced antiviral response might imply that the defect of host sensing of incoming viral particles and/or attendant activating factor(s) might act as a priming event for the subsequent escape from control by TLR3-induced ISG response.

### **Increased viral spread and specific infectivity of adapted viral populations.**

Our results indirectly showed that the replication of the viral populations harvested after several iterative passages is higher as compared to parental virus (**Figure 3G**), albeit the magnitudes of the augmentation also likely depend on viral doses, and hereby the possible saturating limit of the replication levels (**Figure 3A and 3D**). In conjunction with the results of the ISG responses, we thus hypothesized that the relief from an ISG response (early response post-infection) might prime viral adaptation toward increased ability to replicate, and consequently their resistance to

antiviral response. To assess viral propagation, the size of infectious foci, as represented in **Figure 4A**, were thus quantified, with comparison between parental and adapted viral populations. The size of foci is greatly increased when comparing viral population harvested at day 51 relative to parental viral (*i.e.*, approximately 4 fold-increase) (**Figure 4B**). Of note, this augmented ability for viral propagation acquired during the evolution experiment is observed when using the same cell type as for the experimental evolution (*i.e.* Huh7.5.1 cells), but not when using a distinct cell line, *i.e.* Vero cells (**Figure 4B**), known to be deficient for IFN- $\beta$  production, leading to a poor ISG response (Mosca and Pitha, 1986). The intracellular ZIKV levels demonstrate a similar pattern (**Figure S4**).

As opposed to the potent ISG response detected in Huh7.5.1 cells, the parental virus does not induce ISG upregulation at early time post-infection in Vero cells (*i.e.*, at 24 hours) (**Figure S4**). This observation might be due to a deficiency in Vero cells for signaling induced by incoming virus and/or attendant-activating signal(s). Alternatively, the absence *versus* potent ISG response in either cell type might result from a cell entry pathway qualitatively and/or quantitatively different between the cell types. Of note, while adapted viral populations show distinct levels of viral propagation in either cell type, ISG responses are not induced, or within the basal levels of the analyzed ISG mRNA for both cell types (**Figure S4B-C**), thus implying that the increased ability of adapted viral populations to propagate might result from the acquisition of a improved host-virus interaction(s) for viral replication step(s), possibly cell entry.

To address this hypothesis we determine the levels of infectious foci relative to quantity of physical ZIKV particles (*i.e.*, as determined by measurement of the viral genome), referred to as specific infectivity. We showed that the specific infectivity is greatly higher for adapted viral

populations (*i.e.*, day 51) as compared to parental virus when determined in Huh7.5.1 cells, while no augmentation and even a decrease is observed when comparing infections of Vero cells by adapted viral population *versus* parental virus (**Figure 4C**).

Altogether these results suggested that the acquisition of increased ability for viral spread during the experimental evolution that might be related to change in the viral-host interaction(s) relative to the cell entry and/or subsequent early step of viral replication.

**The apparent resistance to antiviral response temporally coincides with the acquisition of improved viral spread ability.**

Next, we aimed at determining when the acquisition of increased viral infectivity occurs in the course of the experimental evolution and hereby, how it is temporally related to the loss of ISG induction (**Figure 3**) *versus* the ability to resist to the antiviral response (**Figure 1 and 2**). To address this question, the specific infectivity (as in **Figure 4C**) was used as a measurement of the acquisition of increased viral spread ability. The specific infectivity of the viral populations harvested at the early passages in activated-TLR3 diminished as compared to parental virus, most likely, as expected from the presence of TLR3 agonist (polyI:C) in the former viral supernatants (**Figure 4D**). Importantly, the specific infectivity increases between approximately day 12 (*i.e.* after 4 iterative passaging) and reaches a plateau by approximately 15-to-18 days of the experimental evolution (*i.e.* after 5-to-6 iterative passaging, respectively) for experimental evolutions performed in activated-TLR3 cells and control cells (**Figure 4D**). Similar patterns are obtained from the independent experiments of evolution.

Together our results suggested that passaged viral populations adapt *via* acquisition of higher ability to propagate, likely by modulation of the host-virus interaction(s) involved at the early

step of the viral cycle. This event, subsequent to the loss of ISG response at early time post-infection, temporally coincides with the acquisition of the resistance of TLR3-induced antiviral response (**Figure 1C and 2**), thus implying that the resistance might be connected to increased viral spread possible *via* modulation of cell processes with dual effect (*e.g.*, ability to exceed speed of this antiviral restriction) or *via* the acquisition of distinct genetic adaptation and/or interactions.

### **Diversity and evolution of the viral populations by deep-sequencing analysis.**

Next, we analyzed the genomic evolution of the viral populations. Conventional sequencing method provides consensus sequence, thus cannot detect low frequency variants, which can nevertheless be very important functionally. To bypass this limitation and obtain the viral diversity in the course of the experimental evolution, we succeeded in setting-up an experimental design compatible with a high-throughput sequencing protocol adapted from the previously reported "CirSeq" method (Acevedo *et al.*, 2014). The coverage analysis revealed that our methodology leads to a read number/depth as high as  $2 \times 10^5$  for certain positions, albeit coverage for some segments the viral genome was lower (**Figure 5A**). The coverage patterns across the viral genome of the all analyzed samples are very similar, thus validating the reproducibility and implying that composition and/or secondary structure of certain segments of the viral genome might interfere with the sequencing analysis. Of note, the lower coverage is observed for samples harvested at day 3 of the experimental evolution, in keeping with the lower yield of viral genome in the supernatant at this time point (**Figure 5A**). Minimal coverage comprises only 62 positions out of all the analyzed libraries where numbers of reads were below 1000 (data not shown).

Next we determined the viral diversity, *i.e.* the amount of polymorphism over-time during experimental evolution. As shown in **Figure 5B**, a bimodal distribution of viral diversity was observed. The left peak likely corresponds to mutations produced during the two-day amplification used after sampling and before library preparation, while the right peak corresponds to mutations that have accumulated during the evolution experiments. Consistent with this interpretation, the variants of the right peak increase in frequency throughout the evolution experiments (**Figure 5B**).

### **Identification of candidate adaptive mutations in E and NS4B viral protein.**

Bioinformatic analyses across the viral genome revealed that some variants demonstrate an increase in frequency over-time, as exemplified for one experiment of evolution in **Figure 6A**. Similar analyses were performed for the independent experiments, as shown for the viral populations harvested at day 9 of the 3 experiments of evolution, where the same variants at the same positions rose in frequency (**Figure 6B**). We selected mutations whose frequency increased over-time with reproducibility across independent experiments. This led to the identification of 8 positions, which fulfill the criteria, positions 316, 1670, 1785, 2340, 5935, 7172, 8449, 9165, as indicated by orange lines (**Figure 6A-B**).

The variants at position 316, 1670, 1785, 5935 and 8449 are synonymous mutations within the coding part of ZIKV polyprotein. The mutation at position 9165 (*i.e.*, substitution of G3010 into E, in NS5) appears at a very late stage of the experiment, and therefore is unlikely to be associated to the phenotypic changes we observed. For position 2340, its frequency increases from day 6 to 12 (**Figure 6C-D**), thus preceding the acquisition of resistance to TLR3-induced antiviral response (**Figure 1 and 2**) and the augmented viral spread (**Figure 4D**). This corresponds to a substitution of amino acid S455 to L, in the E surface protein.

Likewise, the change at position 7172 is observed in some experiments at day 9 and becomes majority by day 24, in the independent experiments (**Figure 6C-D**). This corresponds to a substitution of at the amino acid 87 in NS4B protein coding part and leading to a Y into H substitution. These substitutions are also observed in the viral populations harvested from the experimental evolutions conducted in the activated-TLR3 cells (**Figure 6D, 6F**). Nonetheless, the differential kinetics of the appearance between activated-TLR3 cells *versus* control cells is still unclear and would require analysis of additional independent experiments.

Together the bioinformatics analysis of the viral evolution underscored the occurrence of point mutations in E and NS4B proteins, which are temporally correlated to the phenotypic change observed in the course of the experimental evolution.

## **Discussion**

By studying viral evolution in a stable and controlled cell environment, we uncovered viral adaptations leading to the resistance to the antiviral host response, temporally associated with increased specific infectivity of the viral populations. Importantly, we found point mutations in E and NS4B viral proteins, those frequencies increase simultaneously and/or prior to the acquisition of the adapted phenotypes, suggesting that these mutations might, conjointly or individually, contribute to either or both, the resistance to the antiviral response and/or the increased specific infectivity of viral population. Our results further suggested that a loss of ISG induction observed at very early time points post-infection by the parental virus precedes the acquisition of the increased spread and antiviral response resistance.

### **Virus issued from a patient adapt to a stable and simplified cellular environment.**

The adapted phenotypes, identified as the resistance to TLR3-induced antiviral response jointly with increased specific viral infectivity also appears in viral populations serially passaged in the control cells, in the absence of additional selection pressure *i.e.*, activated-TLR3 pathway. The inoculum (referred to as parental virus) used in our experimental evolutions is a clinical isolate isolated from a patient at the time of the epidemics in Brazil (Donald *et al.*, 2016). By sequencing analysis, we validated that the consensus amino acid sequence of the inoculum of our experimental evolutions perfectly matches with the clinical isolate (GeneBank ID KX197192; data not shown). Our cellular study system represents an environment with reduced complexity as compared to an organism (*i.e.*, unique cell type, restricted diversity of the innate immunity pathways, lack of adaptive response, absence of physico-chemical constraints like the blood flow, etc...). It thus implies that adaptive phenotypes and mutations occurring upon passaging of the clinical isolate into a simplified cellular environment is likely primarily driven by modulation of virus/host cells interaction(s) leading to better fitness in this particular cellular environment, without the cost of altering interactions that are pivotal in the *in vivo* context (Arai *et al.*, 2016; Chambers *et al.*, 2014). In support of this assumption, we showed that *i*) the replication levels reach a plateau in the independent experiments of viral evolution, likely consequent to the establishment of steady-state host-virus interactions in this stable cell environment, and *ii*) the adapted viral populations do not demonstrate improved viral replication in a different cellular environment, as exemplified using cells from a different species (*i.e.*, Vero cells derived from green monkey *Chlorocebus sabaeus*). It is thus conceivable that the constraints exerted in the complex environment of the organism impedes the acquisition of optimized interaction(s) with the host machineries required for the viral replication, including interactions with cellular factors involved in *e.g.*, cell entry, viral complex formation and/or egress. The host

factors regulating viral spread can be genetically distinct between Humans and Monkey, as previously illustrated (Stabell *et al.*, 2018). Alternatively, it is conceivable that certain host antiviral response(s) and/or ISG(s) are present in Huh7.5.1 cells, but not in Vero cells (and vice versa), thus explaining the observed difference of phenotypes (Eberle *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2009; Prescott *et al.*, 2010; Sumpter *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014). In support to the latter hypothesis, a potent ISG upregulation is induced at early time point post-infection of Huh7.5.1 cells, consistent with previous report (Hoek *et al.*, 2017) but not Vero cells.

Further in agreement with the hypothesis of viral adaptation(s) to a simplified environment, one of the candidate adaptive mutations (*i.e.*, in E glycoprotein) is not found, so far, in the database of ZIKV sequences isolated from patients (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/Database/nph-select.cgi?taxid=64320>).

### **ISG response at early time: possible mechanism of induction and loss.**

Activation of cytosolic sensors is proposed as a sensing pathway involved in the host responses against flavivirus (Aguirre *et al.*, 2012, 2017, Fredericksen *et al.*, 2008, 2008; Satoh *et al.*, 2010). Some of them are preferentially induced by replication intermediates and/or subsequently to viral replication, especially MDA-5 and STING (Aguirre *et al.*, 2017; Fredericksen *et al.*, 2008; Satoh *et al.*, 2010). Nonetheless, the hereby-reported activation is replication-independent, suggesting that it likely involves the recognition of component(s) of incoming viral particles and/or attendant activating product(s) present in the supernatant of ZIKV infected cells. The exact nature of the activating signal(s) leading to a robust ISG response early after ZIKV infection of Huh7.5.1 cells remains to be identified. Nevertheless, owing to the restricted sensing of Huh7.5.1 cells (deficient for RIG-I-induced response and no detectable response to TLR3 induction (Sumpter *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014)) and on

sensing pathway of ZIKV (and closely related flavivirus), ZIKV might induce an IRF1-dependent pathway *via* a still unidentified sensor (Carlin *et al.*, 2017) and/or TLR4-mediated signaling *via* recognition of the secreted NS1 viral protein (Modhiran *et al.*, 2017).

Alternatively, the ISG response early post-infection can be triggered by inflammatory cytokines and/or type I/III IFNs produced at late stage of the previous viral passage. Nonetheless, while the ISG response detected early post-infection for parental virus vanished in the course of the experimental evolution, the induction observed at later stage increases. Thus the consilience of these opposite observations would imply that the passaged viral populations evolve an inhibitory mechanism to evade the early ISG response in a replication-independent manner.

### **Priming of resistance/increase specific infectivity by the loss of ISG induction**

Importantly, kinetic analyses of the experimental evolution revealed that the loss of ISG response induced early post-infection precedes the increased viral spread. The latter temporally correlates with the resistance to TLR3-induced antiviral response. It is possible that the loss of ISG response acts as a priming condition for both, or only one of, these subsequent events of the viral adaptation. The increased viral spread of adapted viral population indeed results from an augmented capacity/frequency of viral particle to start replication (*i.e.*, defined to as specific infectivity). Therefore, one explanation for these temporally disjointed phenotype changes would be that the relief from inhibitory ISG response allows viral entry *via* pathways that are qualitatively different. Along this line, different ISGs are known to modulate the viral entry mechanisms (*e.g.* Interferon-induced transmembrane protein; IFITM, tetherin (Monel *et al.*, 2017; Viswanathan *et al.*, 2011)) or early stage of viral replication (*e.g.*, Viperin, 25-hydroxycholesterol) (Li *et al.*, 2017; Vonderstein *et al.*, 2017).

Alternatively, the loss of the very early antiviral response might quantitatively impact the early steps of ZIKV infection/replication of the passaged viral population. The chance for acquisition of adaptive mutation(s) would be increased as a direct consequence of augmented replication rounds and/or the possible occurrence of co-infections within the same cells presumably leading to recombination of viral genomes, known to promote viral genome diversity (Poirier *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2016).

### **Simultaneous acquisitions of the increased specific infectivity and resistance to antiviral response**

Our results suggested that the viral acquisitions of the increased specific infectivity and resistance to antiviral pathways appeared simultaneously in the course of the experimental evolution. Although one cannot formally exclude that kinetic analysis with more frequent sampling would reveal some degree of disconnection between the two events, it is conceivable that these two phenotypes are causally related. In support of this hypothesis, ZIKV, like other flavivirus, has several inhibitory mechanisms against the host responses, especially at the level of type I and III IFNs induced responses (Donald *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017) (*e.g.*, by NS5 mediated degradation of stat) (Grant *et al.*, 2016). Therefore, a higher ZIKV spread might increase the chance for the adapted viral population to establish viral replication more rapidly and/or efficiently, as compared to the speed and/or effectiveness of the host antiviral response(s).

### **Putative molecular regulations by the candidate adaptive mutations.**

Our bioinformatics analysis revealed candidate adaptive mutations: the substitution S455L in E and Y87H in NS4B, all other mutations being synonymous, non-reproducible and/or transient. The analysis of the E candidate mutations in the putative structures suggested that

the E mutant lines at the C-terminus of the stem region, next to the transmembrane domain (Klein *et al.*, 2013). Based on the known regulatory functions of this segment of E and *in silico* estimation of the change induced by the substitution of interaction with the apposed segment, this adaptive mutation can enhanced the stability of the E protein, and as a potential consequence the processes of membrane fusion, incorporation of the E protein and/or interaction with specific lipid (Bressanelli *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2013; Stiasny *et al.*, 2013). The structure of NS4B is still very incompletely known, but according to putative model, it is possible that the Y87H interferes with the stability of an alpha-helix lining on the membrane (Zmurko *et al.*, 2015). The structural properties of these candidates adaptive mutations would fulfill the change required for the acquisition of the adapted phenotype (*i.e.*, increase specific infectivity), nonetheless future analyses are required to test this hypothesis.

## Figure legend

**Figure 1. Serial passage of viral populations in cells with activated TLR3 signaling. A.** RT-qPCR quantification of ISG mRNA expressions in Huh7.5.1 cells expressing or not WT TLR3 and  $\Delta$ TIR TLR3, referred as to control (cont) cells, that were treated by polyI:C (100  $\mu$ g/ml; 3 hours); 3 independent experiments, mean  $\pm$  standard deviation (SD). **B.** Schematic representation of the experimental procedure for the serially passages of ZIKV supernatants (SN) in WT TLR3-expressing Huh7.5.1 cells stimulated by polyI:C (100  $\mu$ g/ml; 3 hours prior to infection), referred to as activated TLR3 cells and  $\Delta$ TIR TLR3-expressing Huh7.5.1 cells (cont cells) at an MOI of 0.2. Every 3 days supernatants were harvested, infectivity were determined and used to infect the naïve cells, which were similarly modified. **C.** Quantification of infectious titers of viral populations harvested in the course of 3 independent serially passaging in activated-TLR3 cells and control cells, as described in panel **A**. Results are expressed as foci forming unit (ffu/ml); determined by parallel analysis for each independent experimental evolution with 2 independent measurements; mean  $\pm$  SD. **D.** Quantification of intracellular ZIKV genome (genome equivalent GE) levels in serial passaging of viral population by RT-qPCR, performed by parallel analyses for all time points; mean  $\pm$  SD. Statistical analysis is in preparation.

**Figure 2. Validation of the resistance to TLR3-induced antiviral response of the passaged viral populations. A.** Comparison of the replication levels of viral populations harvested from the serial passaging in activated TLR3 cells (as described in **Figure 1**) in activated-TLR3 cells *versus* control cells at MOI 5E-3 and 5E-2, as indicated. Results represent the quantification of the intracellular ZIKV genome levels at 3 days post-infection; 3 independent experiments; mean  $\pm$  SD. Statistical analysis is in preparation. **B.**

Quantification of the replication levels of viral populations harvested from the serial passaging in control cells presented as in panel **A**; 3 independent experiments; mean  $\pm$  SD. Statistical analysis is in preparation.

**Figure 3. Passaged viral populations do not induce an ISG response. A-C.** Time course analysis of the levels of intracellular ZIKV RNAs and ISG responses upon infections of activated-TLR3 cells by parental virus and viral populations harvested at day 36 of the serial passaging in activated-TLR3 cells and control cells, at the indicated MOI. Quantification of the intracellular ZIKV RNA (**A**), MxA mRNA (**B**) and ISG15 mRNA (**C**) levels at indicated times post-infection. Results are expressed as fold-change relative to the levels determined at 3 hours post-infection with MOI 0.01 for each type of viral population; 2 independent experiments; mean  $\pm$  SD. Statistical analysis is in preparation. **D-F.** Time course analysis of the levels of intracellular ZIKV RNAs and ISG responses upon infections Huh7.5.1 cells using the same viral populations and displayed as in panels **A-C**; 3 independent experiments; mean  $\pm$  SD. Statistical analysis is in preparation. **G-I.** Quantification of the intracellular ZIKV RNA (**G**), MxA mRNA (**H**) and ISG15 mRNA (**I**) levels at the indicated time post-infection of Huh7.5.1 cells by parental virus and viral populations harvested at day 51 of the serial passaging in activated-TLR3 cells and control cells, at MOI 0.1. Parental virus was UV-inactivated prior to infection, as indicated. Results are expressed as fold-increase relative to levels at 1 hour post-infections; 3 independent measurements; mean  $\pm$  SD. Statistical analysis is in preparation. **J-L.** Quantification of the intracellular ZIKV RNA (**J**), MxA mRNA (**K**) and ISG15 mRNA (**L**) levels at 24 hours post-infection (MOI 1) of Huh7.5.1 cells by parental virus and viral populations harvested at day the indicated times of the serial passaging in control cells and from independent experimental evolution (*i.e.*, replication #1

and #2). Results of ISG mRNA levels are expressed as fold increase relative to uninfected (mock) cells; 3 independent experiments; mean  $\pm$  SD. Statistical analysis is in preparation.

**Figure 4. Increased viral spread of passaged viral populations.** **A.** Representative imaging of infectious foci of parental and viral populations harvested at day 51 of serial passage in control cells at 48 hours post-infection of Vero and Huh7.5.1 cells, as indicated; immunostaining of the E surface proteins (in red); nucleus stained by Hoechst (in blue). **B.** Quantification of the size of foci, immunostained as in panel **A**; 3 independent measurements; mean  $\pm$  SD. Statistical analysis is in preparation. **C.** Quantification of foci number using MOI 0,001. Results are expressed as foci number per 10E6 genome equivalent of the viral input. **D.** Determination of specific infectivity of the indicated viral populations harvested in the serial passaging; bars and curves represent 2 and 1 independent measurements, respectively; mean  $\pm$  SD.

**Figure 5. Analysis by next-generation sequencing of the viral populations in experimental evolution.** **A.** Representation of the coverage per position along ZIKV genome of sequenced libraries of viral populations harvested at the indicated time points in 3 independent evolution experiments in control cells and one example of experimental evolution in TLR3-activated cells, as indicated. Results are expressed as number of reads per position. Schematic representation of ZIKV genome at the bottom. **B.** Quantification of the genetic diversity of viral population harvested at the indicated time point in experimental evolution (exemplified by replicate #1 in control cells). Results are presented as a density (KDE) plot. The distribution is bimodal, with a peak for low-frequency variants and another peak for high-frequency variants. The low frequency peak remains stable throughout the sampling time points, whereas the high-frequency peak shifts to the higher frequencies as

evolution unfolds. This is consistent with the low-frequency peak corresponding to variants appearing during the two-day expansion phase pre-library preparation, and the high-frequency peak corresponding to variants appeared during experimental evolution. **C.** Frequencies of the second most frequent variants at time point 51, control experiment #1. Variants have been sorted in 4 categories according to whether they are synonymous or not, and whether they are in the low frequency peak or the high frequency peak. In the low frequency peak, non-synonymous variants are significantly more frequent than synonymous changes (T-test p-value  $1.2 \times 10^{-12}$ ), whereas in the high frequency peak, there is no significant difference between synonymous and non-synonymous variants.

**Figure 6. Bioinformatic analysis of the viral quasi-species for the identification of candidate sites involved in viral escape. A-B.** Frequencies of the major variants along the ZIKV genome. The frequency of the most frequent variant in the viral populations is represented at each position of ZIKV genome. Results obtained for viral populations harvested at the indicated time points of the experimental evolution (*i.e.*, replicate #1, control cells) (**A**) and at day 9 in independent experiments of evolution (**B**). Some major variants at early passages have dropped markedly in frequency in later passages, as can be seen *e.g.*, in positions 2340 and 7172 (framed in orange). **C-F.** Frequency of the two major variants at positions 2340 (**C-D**) and 7172 (**E-F**) in the course of the serial passaging of viral populations and in independent experiments of evolution. The corresponding amino acids have been indicated.

## Material and Methods

**Biological materials.** Huh7.5.1 cells and derivates were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Life Technologies) supplemented with 10% FBS, 100 units (U)/ml

penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and non-essential amino acids (Life Technologies) at 37°C/5% CO<sub>2</sub> (Décembre *et al.*, 2014).

The retroviral-based vectors expressing TLR3 and mutant TLR3 deleted for the TIR domain (Wang *et al.*, 2009) were produced in 293T cells as previously described (Dreux *et al.*, 2012) and used to transduce Huh7.5.1 cells. Transduced cells were selected by Blasticidin (Invivogen) at 10 µg/ml.

**Reagents.** The antibodies used for immunostaining were mouse anti-DENV E glycoprotein (4G2) kindly provided by P. Despres (Pasteur Institut, Paris, France) and Alexa-conjugated secondary antibodies (Life Technologies). The other reagents were TLR3 agonist polyI:C (Invivogen), anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 555 Secondary Antibody (Life Technologies), Hoescht (Life Technologies), and cDNA synthesis and qPCR kits (Life Technologies).

**Preparation of viral stocks and serial passaging of viral populations.** The clinical isolate of epidemic strains of ZIKV from Brazil (PE243\_KX197192) (Donald *et al.*, 2016) were amplified using Vero cells. Supernatants were harvested and filtrated (0.45µm) before freezing and preservation at -80°C. The serial passaging of viral population were performed by inoculation in parallel of Huh7.5.1 cells expressing WT TLR3 and stimulated by polyI:C (100 µg/ml; 3 hours prior to infection), thus cells are referred to as activated TLR3 cells and Huh7.5.1 cells expressing ΔTIR TLR3 (mutated TLR3 with deletion of the TIR domain (REF) used as control (cont) cells. The target cells were seeded with 2E+6 cell in 2 T175 cell culture flasks (Corning) the day before the infection at an MOI of approx. 0.2. At 3 days post infection, the supernatants were harvested and their infectivity was determined by foci counting. Next, harvested supernatant were used to infect the naïve cells, which were

similarly modified. The serial passages of viral populations were repeated up to 18 times (*i.e.*, total of 54 days).

**Analysis of intracellular and extracellular RNA levels.** RNAs were isolated from cells or supernatants harvested in guanidinium thiocyanate citrate buffer (GTC) by phenol/chloroform extraction procedure as previously described (Dreux *et al.*, 2012). The efficiency of RNA extraction and reverse transcription-real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was controlled by the addition of carrier RNAs encoding Xef1 $\alpha$  (xenopus transcription factor 1 $\alpha$ ) *in vitro* transcripts in supernatants diluted in GTC buffer. ZIKV RNA, Xef1 $\alpha$  and intracellular glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA levels were determined by RT-qPCR using cDNA synthesis and qPCR kits (Life Technologies) and analyzed using StepOnePlus Real-Time PCR system (Life Technologies), using previously described primers (Décembre *et al.*, 2014; Dreux *et al.*, 2009). Primers were designed to regions of ZIKV genome as Forward: 5'-ATTGTTGGTGCAACACGACG-3', and Reverse: 5'-CCTAGTGGAATGGGAGGGGA-3'. Extracellular and intracellular ZIKV RNA levels were normalized for Xef1 $\alpha$  and GAPDH RNA levels, respectively.

**Analysis of extracellular infectivity.** Infectivity titers in supernatants were determined by end-point dilution using Huh7.5.1 cells. Foci forming unit (ffu) were detected 48 hours after infection by anti-E surface protein specific immunofluorescence using 4G2 clone, as previously described (Décembre *et al.*, 2014; Dreux *et al.*, 2009). Briefly, Huh7.5.1 cells were fixed with 4% PFA and permeabilized by incubation for 7 minutes in PBS containing 0.1% Triton. Cells were then blocked in PBS containing 3% BSA for 15 minutes and incubated for 1 hour with mouse anti-E (clone 4G2) hybridoma supernatant diluted at 1:100 in PBS containing 1% BSA. After 3 washes with PBS, cells were incubated 1 hour with secondary

Alexa 555-conjugated anti-mouse antibody (1 $\mu$ g/mL) and Hoechst dye (200ng/ml) in PBS containing 1% BSA. Percentage of E-positive cells was determined using Zeiss Axiovert 135 or Olympus CKX53 microscopes.

**Foci size analysis.** Foci size was determined by infection using Huh7.5.1 cells with a carboxycellulose (CMC) overlay in 12-well plate. Forty-eight hours later, cells were washed with PBS and fixed by 4% PFA solution. Foci were detected by anti-E surface protein specific immunofluorescence using 4G2 clone, as above previously. Imaging by Olympus CKX53 microscope of randomly picked foci were processed using Image J software. Size index was determined as the ratio of E staining intensity relative to Hoeschst staining with normalization of each intensity on the mean intensity of 3 randomly selected cell unit.

**Preparation of sequencing libraries and deep sequencing.** At the indicated time, supernatants were harvested from the infected cells (either control cells or activated TLR3 cells). To avoid contamination of the libraries by polyI:C, an additional amplification step was performed by passaging of the supernatant with the corresponding cells for 2 days, using MOI of 0.1. Supernatants (SN, 10ml) were concentrated using Vivaspin unit with cut-off of 100 MWA (Sartorius) by centrifugation at 3 000 x g for 20 minutes at RT. Viral RNA were extracted from the concentrated SN by phenol-chloroform extraction procedure as previously (Dreux *et al.*, 2012). Next, the RNAs were fragmented by sonication (peak incident 50 Watts, duty factor of 20%, cycle per burst of 200, for 200 seconds at 4°C) using Covaris M220. Fragmented RNAs were concentrated with isopropanol precipitation, followed by analysis with Bioanalyzer (Agilent Technology) using Pico Total RNA Chip, the size of the RNA fragments were approximately 150bp. The steps of circulation of RNA fragments and retrotranscription are adapted from previously described protocol (Acevedo *et al.*, 2014). Briefly, circular RNAs were obtained by ligation using T4 RNA ligase (New England

Biolabs), followed by phenol-chloroform extraction. The retrotranscription was performed using Superscript III (Life Technology). Then, libraries were prepared using the Ultra DNA Library Prep kit for Illumina (New England Biolabs). Additional steps of clean-up were performed using AMPure XP beads, ratio 1:0.8 (Agencourt) to remove the free adaptor (done before the step of PCR enrichment of adaptor-ligated DNA) and to remove the free index adaptor (after the PCR enrichment of adaptor-ligated DNA). The qualities of the libraries were assessed by Bioanalyzer (Agilent Technology) using High Sensitivity DNA Chip. The libraries were quantified using NEBNext Libraries Quantification kit for Illumina (New England Biolabs) and multiplexed at equimolarity.

Multiplexed libraries were analyzed using HiSeq 2500XL (Illumina), using a 200-PE run at the EMBL Genecore Facility (Heidelberg, Germany).

### **Bioinformatics analysis of the sequencing libraries.**

Reads were mapped using PEAR (Zhang *et al.*, 2014) and in-house software (viomapper, <https://github.com/Kobert/viroMapper>). PEAR was used to merge the repeats in the forward and reverse reads, to improve quality scores and minimize sequencing errors. Viomapper automatically returns a table with statistics per position such as quality quantiles, coverage, raw numbers of A, C, G, T bases, and quality-weighted counts and proportions of A, C, G, T bases. These tables were then read and analyzed using Python scripts developed in house. A Jupyter notebook reproducing the figures of the manuscript will be made available upon publication.

## Supplementary information

### Figure legends

**Figure S1. Analysis of ISG mRNA and protein expression.** (A-B) Analysis of MxA and ISG expressions by western blot at 3 hours post-treatment, or not, by polyI:C of TLR3 expressing Huh7.5.1 (A) and 24 hours post-infection of Huh7.5.1 cells by parental and viral population harvested at day 51 of the experimental evolution performed in control and TLR3-activated cells (B). The results are representative of 2 independent experiments; actin detection used as loading control. (C) Analysis of ISG56 mRNA expression at 24 hours post-infection by parental and viral populations harvested at day 51 of the experimental evolution performed in control and TLR3-activated cells (samples also analyzed in **Figure 3G-I**). Results are expressed as fold-increase relative to levels at 1 hour post-infections, 3 independent measurements; mean  $\pm$  SD.

**Figure S2. Parent virus but not passaged viral population triggered an ISG response at early time points post-infections and independent of viral replication.** Quantification of the intracellular ZIKV RNA (A), MxA mRNA (B) and ISG15 mRNA (C) levels at the indicated time points post-infection of Huh7.5.1 cells by parental virus and viral populations harvested at day 51 of the serial passaging in activated-TLR3 cells and control cells, at MOI 0.1. Viral supernatants were UV-inactivated prior to infections, as indicated. Results are expressed as copies numbers; 2 independent experiments; mean  $\pm$  SD.

**Figure S3. Analysis of the ISG response at 72 hours post-infection by passaged viral population.** Quantification of the intracellular ZIKV RNA (A), MxA mRNA (B) and ISG15 mRNA (C) levels at 72 hours post-infection by viral population harvested at the indicated

time of the serial passaging in control cells. Infection performed at MOI 5E-3. Results are expressed as copies numbers; 2 independent experiments; mean  $\pm$  SD.

**Figure S4. Analysis of the ISG response at 24 hours post-infection of Huh7.5.1 cells compared to Vero cells**

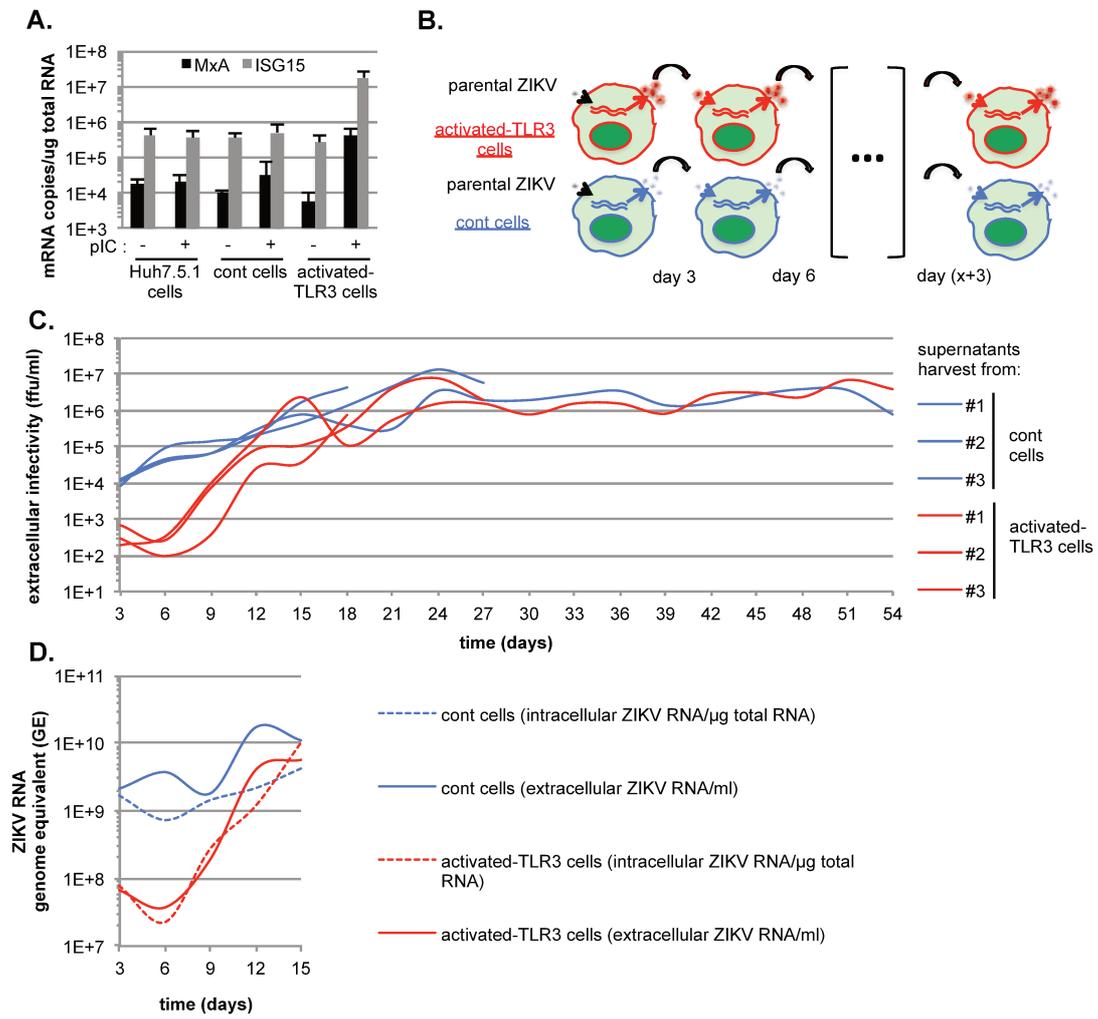
Quantification of the intracellular ZIKV RNA (A), MxA mRNA (B) and ISG15 mRNA (C) levels at 24 hours post-infection by parental virus and viral population harvested at Day 51 of the serial passaging in indicated cells. Infection performed at MOI 0.1. Results are expressed as copies numbers; 2 independent experiments; mean  $\pm$  SD.

**Figure S5. Amino acid sequence alignment of the E and NS4B flavivirus.** E (amino acids 420 to 479) (A) and NS4B proteins (amino acids 33 to 92) (B). Sequences include: ZIKAdapt (consensus sequence of adapted viral population), ZIKV\_Brazil (GenBank accession number KX197192), Dengue virus type 2 (DENV2) (GenBank accession number NC001474), Dengue virus type 4 (DENV4) (provided by Dr. Stephen Whitehead, NIH, Bethesda, USA), Japanese encephalitis virus (JEV) (Uniprot accession number Q5NT72), West Nile virus (WNV) (Uniprot accession number F1D812), Saint Louis encephalitis virus (SLEV) (Uniprot accession number D8L538), YFV\_17D (Uniprot accession number P03314), YFV\_Asibi (Uniprot accession number Q6DV88), Tick-borne encephalitis virus (TBEV) (Uniprot accession number Q01299). Identical amino acids are highlighted in green; mutated position of ZIKAdapt in red. Predicted stem helices (H1/H2) and transmembrane domain (TM) of E are indicated. Alignment performed using ClustalW software.

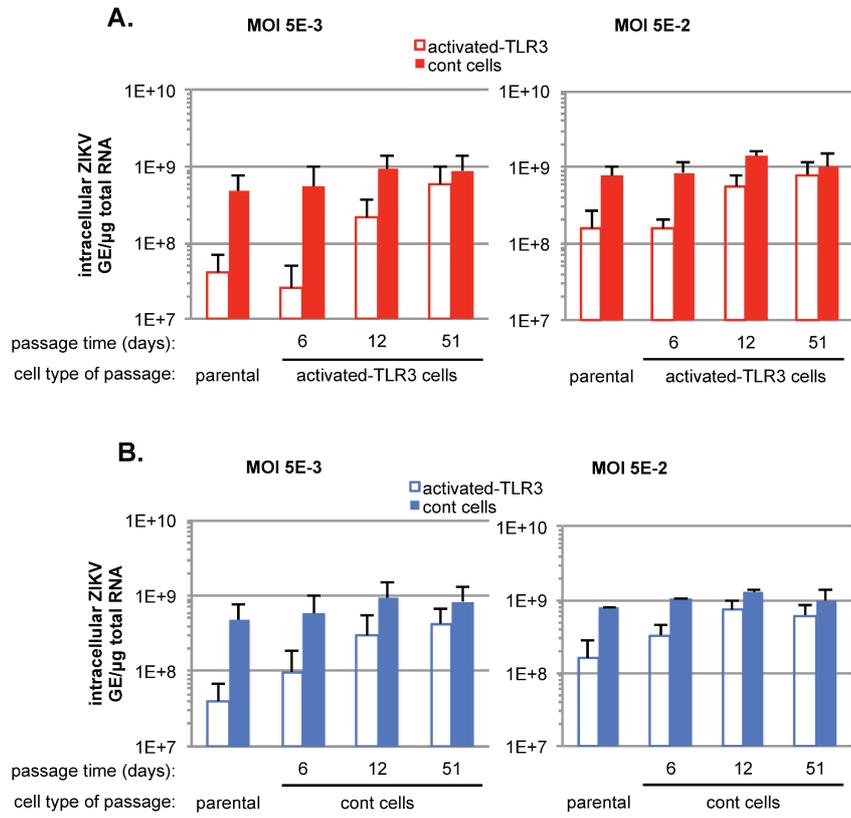
## References

- Acevedo, A., Brodsky, L., and Andino, R. (2014). Mutational and fitness landscapes of an RNA virus revealed through population sequencing. *Nature* *505*, 686–690.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732–738.
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E.A., et al. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res.* *87*, 125–148.
- Brasil, P., Pereira, J.P.J., Moreira, M.E., Ribeiro Nogueira, R.M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R.S., Valderramos, S.G., Halai, U.-A., Salles, T.S., et al. (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* *375*, 2321–2334.
- Cao-Lormeau, V.M., Blake, A., Mons, S., Lastere, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet Lond. Engl.* *387*, 1531–1539.
- Cugola, F.R., Fernandes, I.R., Russo, F.B., Freitas, B.C., Dias, J.L.M., Guimarães, K.P., Benazzato, C., Almeida, N., Pignatari, G.C., Romero, S., et al. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* *534*, 267–271.
- Dang, J., Tiwari, S.K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V.S., Eroshkin, A.M., and Rana, T.M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* *19*, 258–265.
- Décembre, E., Assil, S., Hillaire, M.L.B., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., Davidson, A.D., and Dreux, M. (2014). Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* *10*.
- Donald, C.L., Brennan, B., Cumberworth, S.L., Rezelj, V.V., Clark, J.J., Cordeiro, M.T., Freitas de Oliveira França, R., Pena, L.J., Wilkie, G.S., Da Silva Filipe, A., et al. (2016). Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *10*.
- Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S.F., and Chisari, F.V. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14046–14051.
- Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Décembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S., and Chisari, F.V. (2012). Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* *12*, 558–570.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* *89*, 8880–8896.
- Lazear, H.M., Govero, J., Smith, A.M., Platt, D.J., Fernandez, E., Miner, J.J., and Diamond, M.S. (2016). A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* *19*, 720–730.
- Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y.,

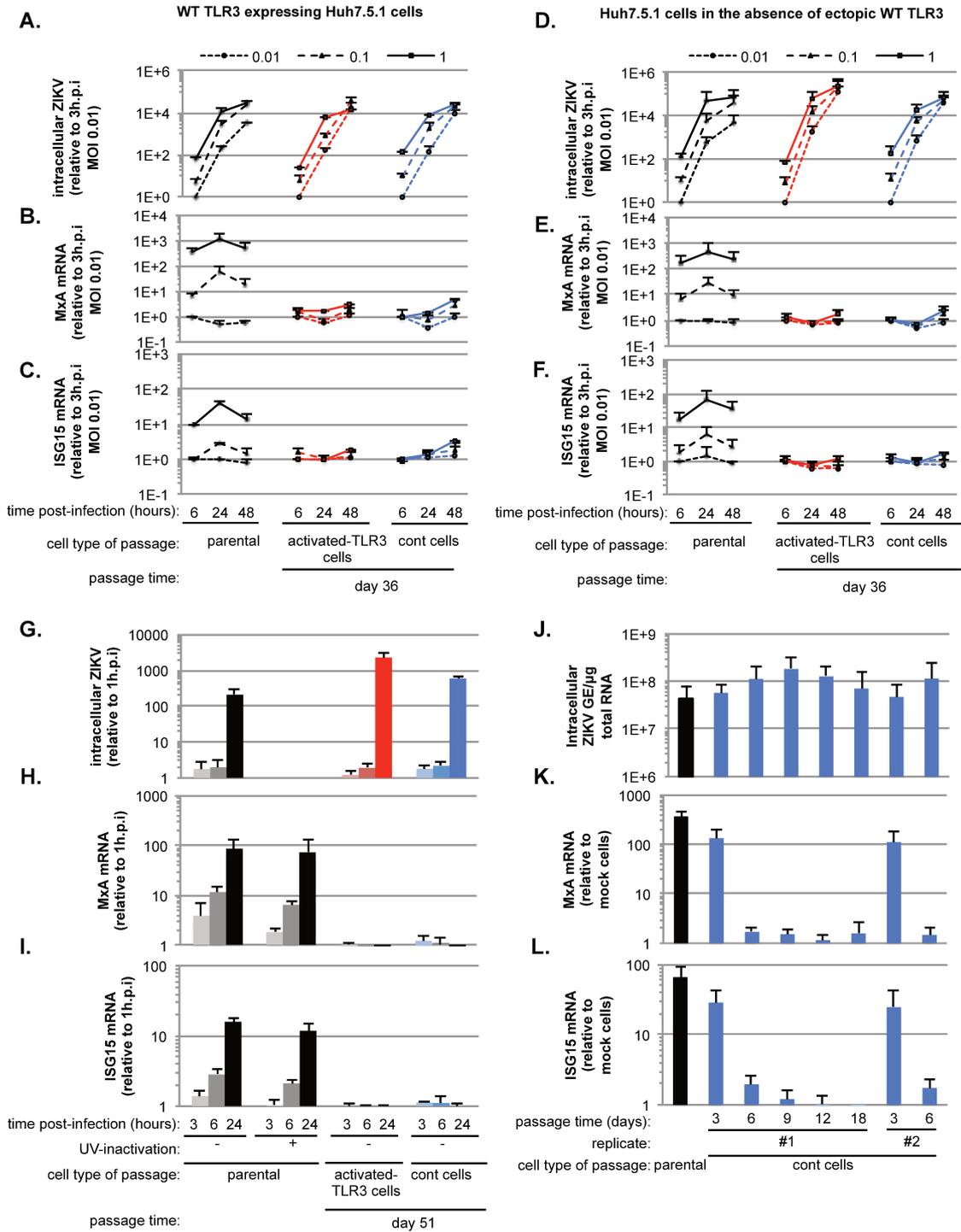
- Liu, X., Zhang, N., Shi, L., Qin, C.-F., and Xu, Z. (2016). Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* *19*, 120–126.
- Miner, J.J., Cao, B., Govero, J., Smith, A.M., Fernandez, E., Cabrera, O.H., Garber, C., Noll, M., Klein, R.S., Noguchi, K.K., et al. (2016). Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* *165*, 1081–1091.
- Mosca, J.D., and Pitha, P.M. (1986). Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 2279–2283.
- Nakaya, T., Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Suemori, H., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2001). Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *283*, 1150–1156.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* *32*, 513–545.
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M. (2005). Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *J. Virol.* *79*, 2689–2699.
- Wang, N., Liang, Y., Devaraj, S., Wang, J., Lemon, S.M., and Li, K. (2009). Toll-Like Receptor 3 Mediates Establishment of an Antiviral State against Hepatitis C Virus in Hepatoma Cells. *J. Virol.* *83*, 9824–9834.
- Yockey, L.J., Jurado, K.A., Arora, N., Millet, A., Rakib, T., Milano, K.M., Hastings, A.K., Fikrig, E., Kong, Y., Horvath, T.L., et al. (2018). Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci. Immunol.* *3*, eaao1680.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., and Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *30*, 614–620.



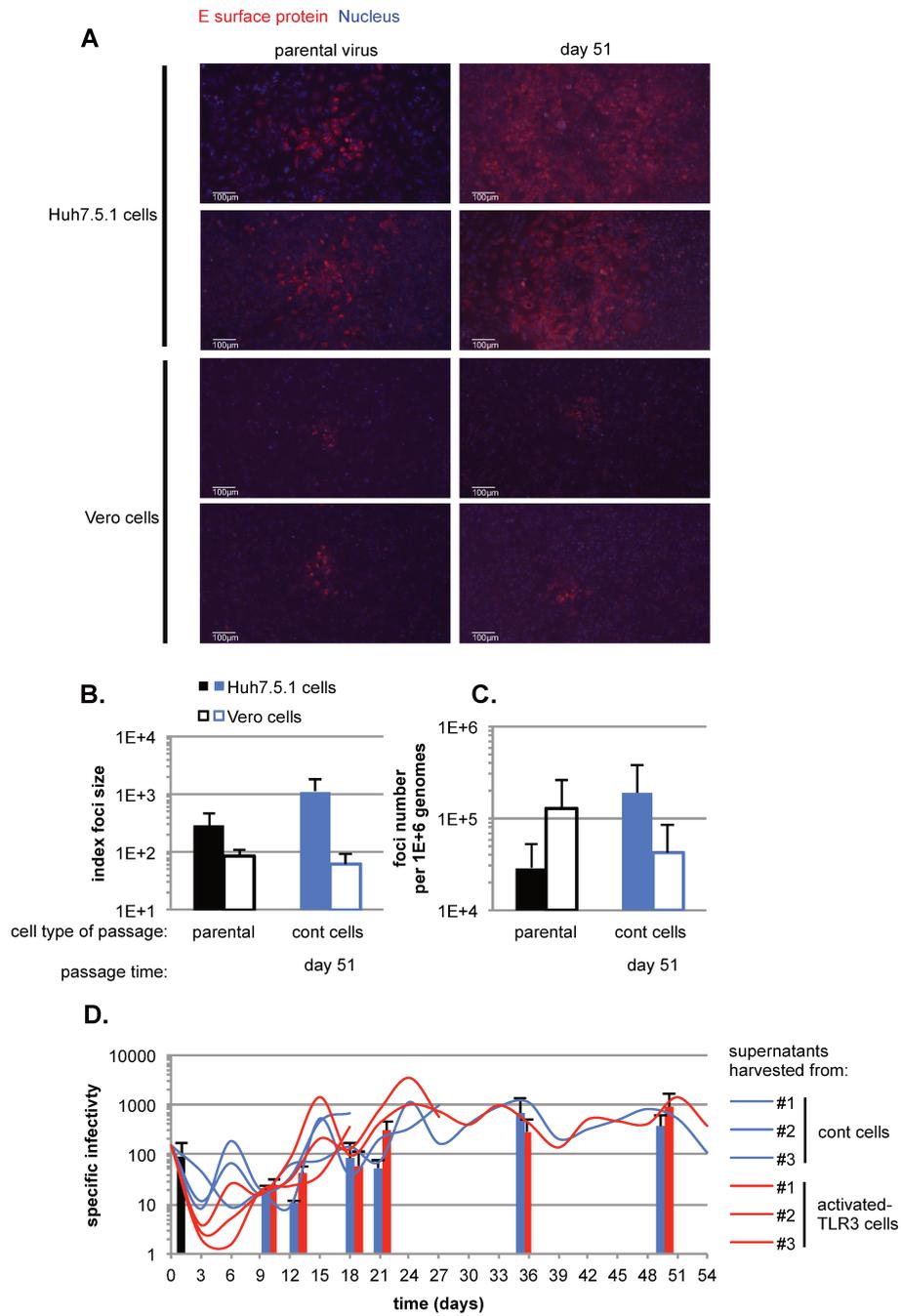
**Figure 1.**



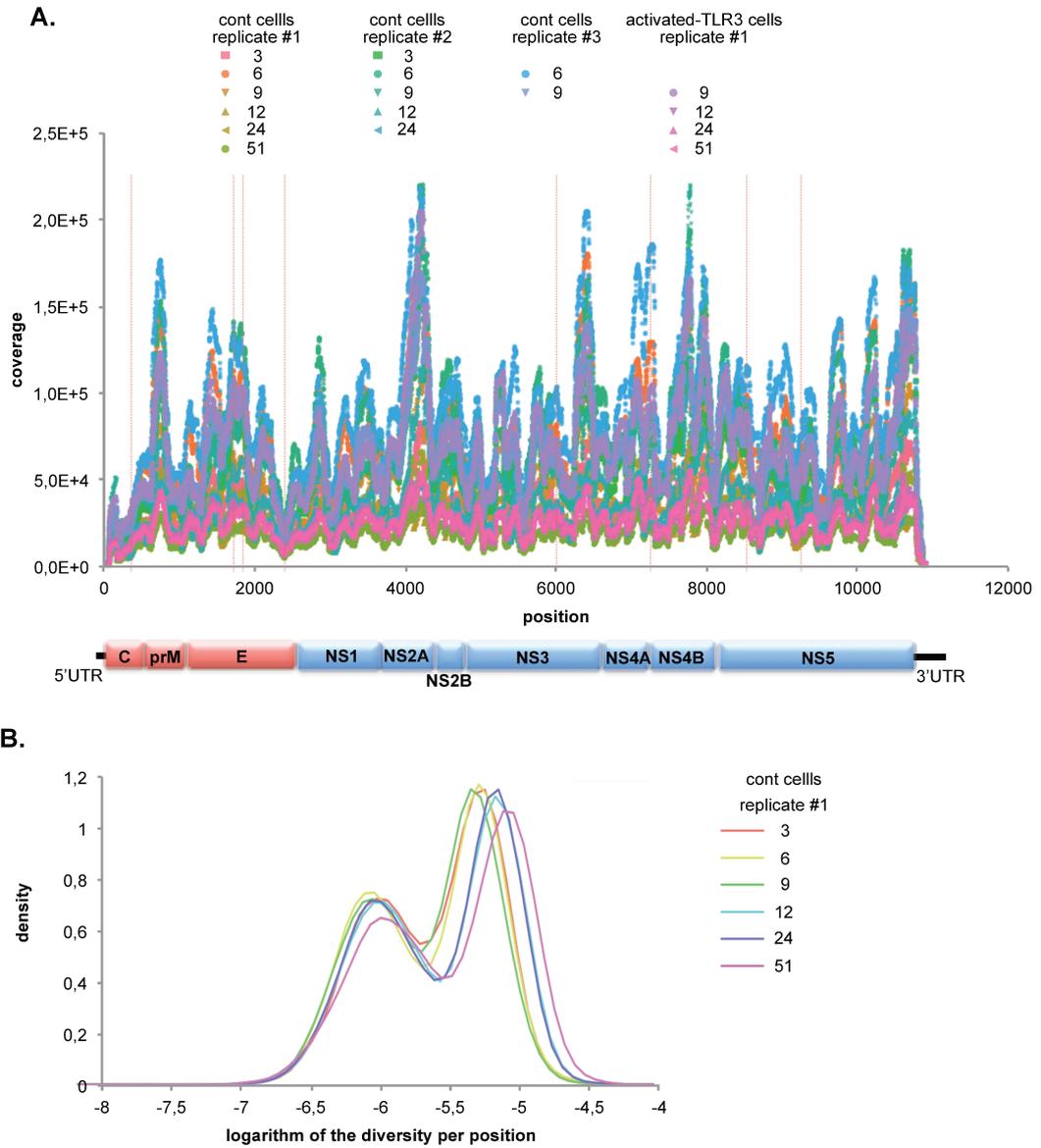
**Figure 2.**



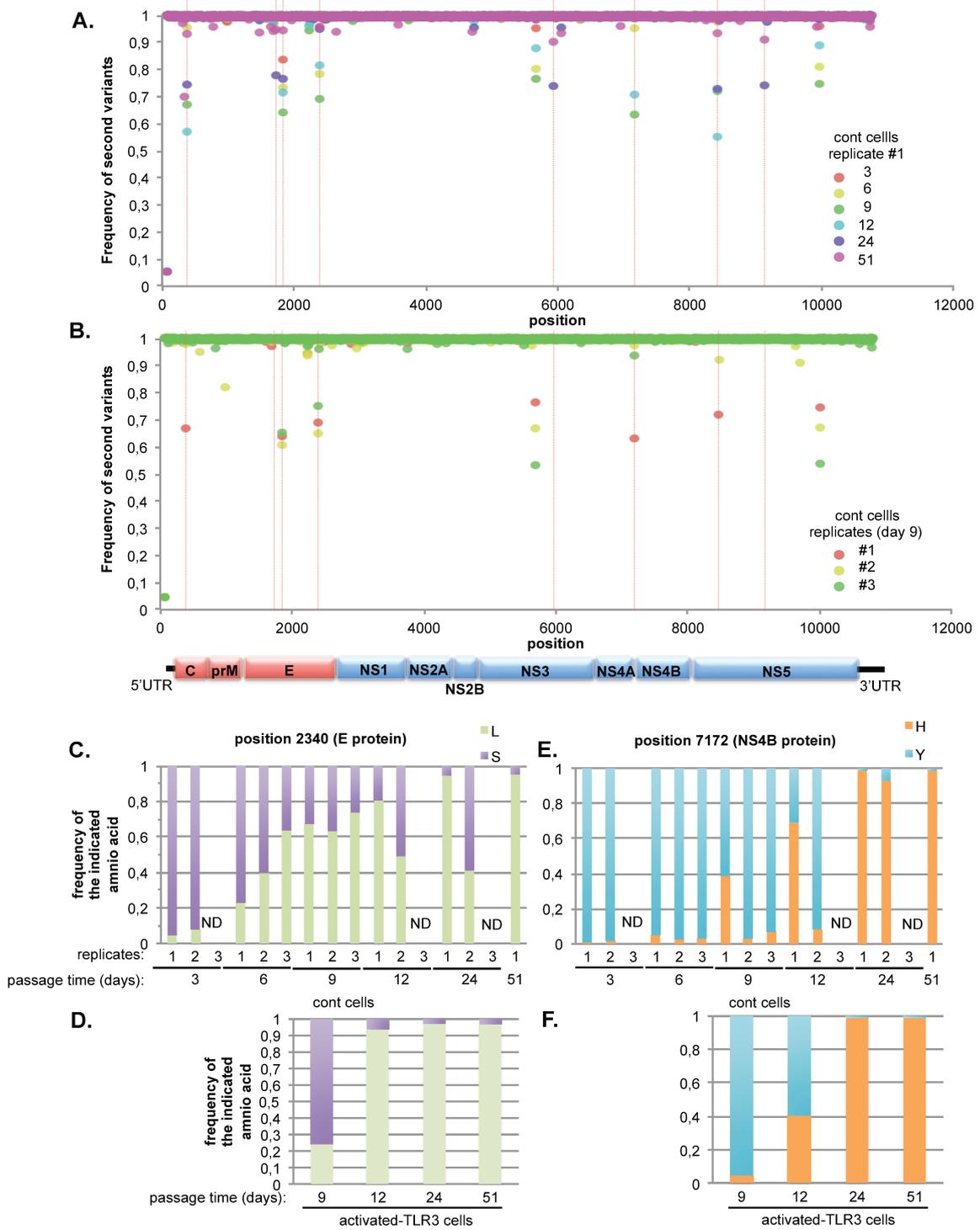
**Figure 3.**



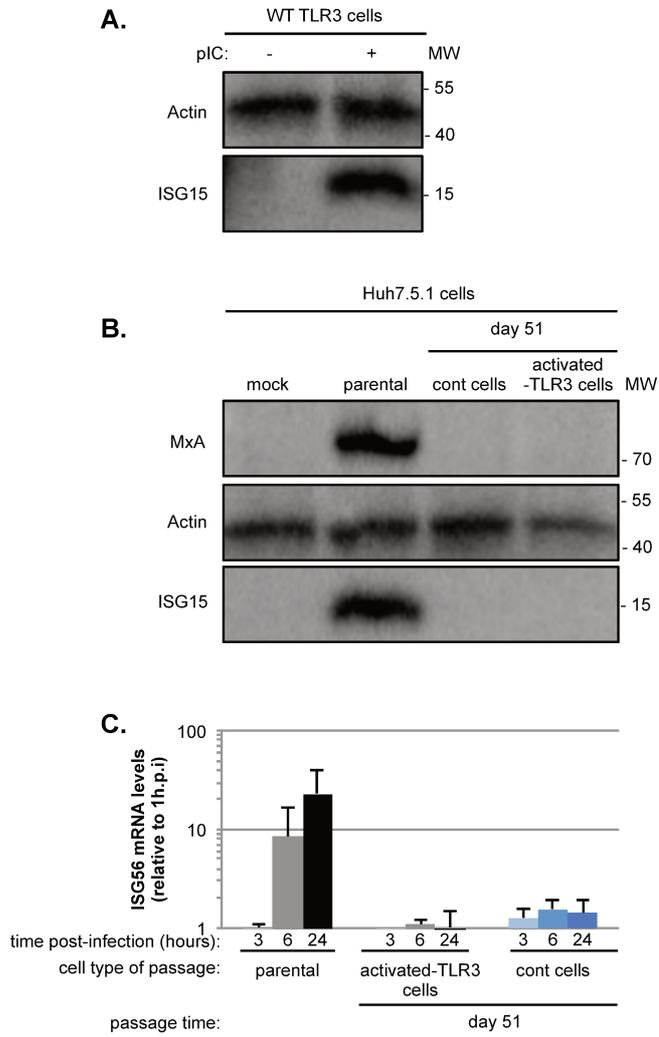
**Figure 4.**



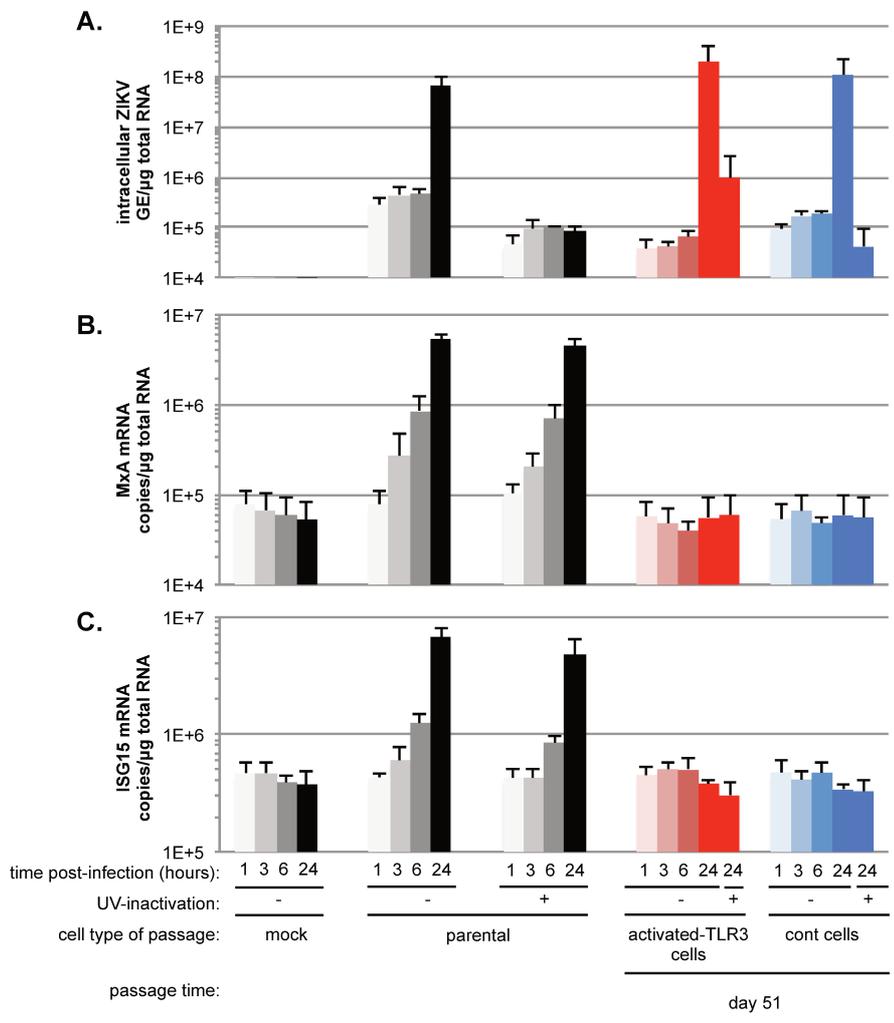
**Figure 5.**



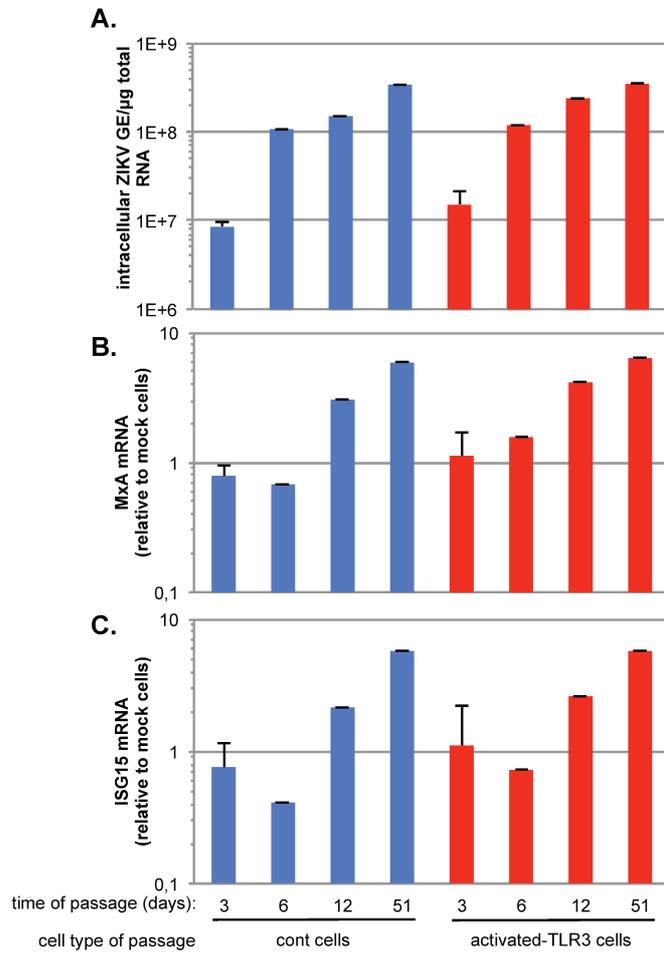
**Figure 6.**



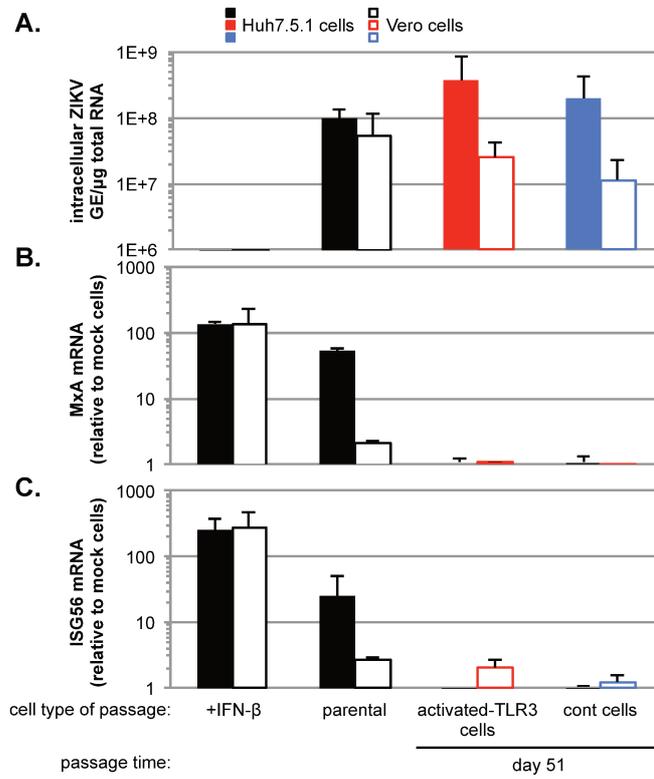
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



## IV. DISCUSSION

### A. Adaptation virale en système cellulaire conduisant à la résistance à une réponse antivirale de la cellule hôte

Les travaux *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'importance de la réponse IFN de type I et III dans le contrôle de la propagation virale de ZIKV, sa transmission, ainsi que la pathogénèse conduisant aux défauts de développement neuronal et à des avortements spontanés (Brasil *et al.*, 2016b; Yockey *et al.*, 2018). En particulier, la voie TLR3 serait d'importance dans le contrôle de l'infection (Hamel *et al.*, 2015) et la prolifération des précurseurs neuronaux (Dang *et al.*, 2016) (voir section B).

Ainsi, mon travail de thèse a eu pour objectif d'étudier l'adaptation de ZIKV en système cellulaire, sous l'influence de la pression de sélection exercée par la réponse ISG induite par l'activation de TLR3. Nous avons choisi de réaliser ces expériences par passages itératifs dans des cellules non-infectées et stablement modifiées afin d'avoir un environnement cellulaire contrôlé et constant.

#### A.1. Rapidité de l'adaptation virale

Après passages itératifs, la population virale résiste à l'action antivirale induite par TLR3. La vitesse d'adaptation virale observée dans nos expériences d'évolution est en accord avec d'autres études. Par exemple, pour les virus à ARN tels que les poliovirus, Chikungunya et ZIKV, l'apparition de variants est observé au cours des premiers passages en culture cellulaire – *e.g.*, moins de dix passages soit 3 jours pour les poliovirus, 10 jours pour ZIKV et 15 jours pour le virus Chikungunya (Coffey *et al.*, 2011; Donald *et al.*, 2016; Pfeiffer and Kirkegaard, 2003). Cette rapide adaptation virale est en accord avec *i)* le taux élevé de mutations des virus à ARN (voir section C) et *ii)* la courte durée du cycle de réplication virale. Par exemple, pour le VHC, le brin négatif, attestant de la mise en place de la réplication, est détecté en moins de 4 heures (Shulla and Randall, 2015).

#### A.2. Adaptation indépendamment de la pression de sélection

De façon très intéressante, nous avons observé une résistance à la réponse antivirale induite par TLR3 dans la condition sans pression de sélection.

Dans le cas de virus obtenus après passages en cellules exprimant une forme tronquée de TLR3, et étant donné que l'expression endogène de TLR3 est extrêmement faible en cellules

Huh7.5.1 (Li *et al.*, 2005), il est difficile d'imaginer une adaptation du virus à un facteur absent de l'environnement cellulaire. La résistance des virus au traitement polyI:C peut donc dépendre d'une meilleure propagation virale ou bien d'une adaptation à différentes voies de l'immunité innée, voire les deux. Si toutefois il y a bien eu adaptation à l'activation de la voie TLR3, la résistance partielle des virus obtenus lors des premiers passages peut provenir du fait qu'ils ne forment pas une population virale homogène. Dans ce test de résistance, les temps d'infection étant de 3 jours, il est très fortement probable que la population virale ait continué à s'adapter à la pression de sélection. La complémentation génétique par laquelle les défauts génétiques de virus en interaction sont mutuellement compensés, en situation de coopération, peut également être entrée en jeu (voir section C). La coopération a été décrite chez de nombreux virus à ARN tel que le VHC dans le cas d'échappement aux défenses immunitaires (Skums *et al.*, 2015) ou lors des étapes d'entrée et de sécrétion du virus de la grippe (Xue *et al.*, 2016). Dans le cas de co-infection par divers variants de WNV, la coopération mène à de hauts niveaux de diversité phénotypique et génétique (Ciota *et al.*, 2012). Ces observations soulèvent également l'hypothèse que la population virale a pu s'adapter, dans un premier temps, à une pression de sélection inconnue (différente de la voie TLR3) mais vitale pour le virus, amenant à une meilleure propagation virale. L'adaptation complète de la population à la voie TLR3 a donc pu s'opérer lors de passages plus tardifs.

## **B. Perte de l'activation de la réponse ISG induite précocément par l'infection**

ZIKV, après seulement deux passages successifs (*i.e.*, 6 jours de culture), avec ou sans pression de sélection par l'activation de la voie TLR3, n'induit plus l'expression d'ISGs à des temps précoces post-infection comme observé pour le virus parental. La perte totale de l'activation est détectée après cinq passages itératifs. La modulation de réponses immunitaires par les flavivirus, et plus particulièrement par ZIKV, a déjà pu être démontrée dans différents systèmes (*in vitro* et *in vivo*) et à différents niveaux des voies de signalisation (Donald *et al.*, 2016; Grant *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2018). Ces systèmes possèdent en effet de nombreux mécanismes d'échappement ou d'inhibition de la réponse de l'hôte impliquant les senseurs de l'infection (Schnettler *et al.*, 2012), les molécules de la voie de transduction en aval des PRRs (Dalrymple *et al.*, 2015b) ou encore directement la voie de réponse à l'IFN-I (*i.e.*, voie JAK/STAT) (Grant *et al.*, 2016). Cependant, ces mécanismes nécessitent un cycle viral répliatif donnant lieu à la synthèse de protéines virales (ou ARNs viraux) inhibitrices dans la cellule infectée (voir section C.2.).

### B.1. Induction des ISGs dépendants de PAMPs associés aux particules virales

L'activation de la réponse ISG à des temps précoces par le virus parental (*i.e.*, 3 heures post-infection) que nous observons est indépendante de la réplication du virus. De plus, l'augmentation du niveau d'expression d'ISGs « précoces » (*i.e.*, ISG15) et « tardifs » (*i.e.*, MxA) apparaît durant les premières heures de l'infection par le virus parental. Cela suggère que l'induction d'ISGs est indépendante de la production d'IFN, la sécrétion d'IFN étant observable après un minimum de 4 heures post-stimulation par les cellules infectées (Egli *et al.*, 2014). D'après ces observations, il est envisageable que cette réponse rapide soit induite par la détection d'éléments viraux incorporés aux virions (immatures ou infectieux) tels que le génome viral et/ou les protéines structurales du virus, ou alternativement des protéines sécrétées. En effet, il a été démontré pour d'autres *Flaviviridae* que les protéines de capsid du VHC (Dolganiuc *et al.*, 2004) ou encore la protéine NS1 de DENV (Modhiran *et al.*, 2017) sont reconnues par les TLRs de la membrane plasmique. En revanche, l'implication de RLRs serait moins probable puisque *i)* RIG-I est non fonctionnel dans notre modèle cellulaire d'étude (Sumpter *et al.*, 2005) et *ii)* MDA-5 reconnaît préférentiellement la forme répliquative du génome viral (voir section B.1.b). L'induction d'ISGs dépendants de l'IFN (*i.e.*, MxA) peut également être une conséquence de l'activation de voies non-canoniques, notamment dépendantes du facteur de transcription IRF-1. Le mécanisme sous-jacent à l'induction de IRF-1, impliqué dans la réponse antivirale et indépendant de l'action de l'IFN, est, à ce jour, toujours inconnu (Schoggins *et al.*, 2011).

### B.2. Implications de facteurs solubles présents dans le surnageant de ZIKV

Alternativement, il est possible que des facteurs cellulaires solubles, présents dans le surnageant viral lors de l'infection, telles que des cytokines dont l'IFN (type I ou III), induisent la réponse précoce détectée pour le virus parental et lors du premier passage. En accord avec cette seconde hypothèse, l'induction de MxA, une ISG préférentiellement induite par l'action paracrine et autocrine de l'IFN-I/III, est détectée à des temps précoces. Nous avons pu observer que l'induction des ISGs dans la lignée cellulaire Huh7.5.1, suite à l'infection par le virus parental, n'avait pas lieu dans la lignée cellulaire Vero. Pourtant, ces cellules, isolées du singe vert (*Chlorocebus sabaues*), réagissent à différents stimuli, incluant l'IFN de type I (données non publiées). Il est donc peu probable que l'activation précoce des ISGs par le virus parental soit liée à l'IFN-I. Cependant, la présence et la réactivité inter-espèce de cytokines ou de l'IFN-III restent des pistes à analyser. En effet, il a été observé que

les cellules humaines (Ma *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014) et simiennes (Eberle *et al.*, 2016; Prescott *et al.*, 2010) peuvent produire et répondre à de telles molécules.

### **C. L'adaptation des populations virales entraîne une hausse du pouvoir infectieux de ZIKV en lignée cellulaire humaine**

Le passage des populations virales en cellules présentant ou non une activité TLR3 élevée a également permis de décrire une meilleure propagation de ces virus dans des lignées cellulaires humaines. Nous avons pu constater que les foyers d'infection sont plus importants pour les virus adaptés, de même qu'une meilleure amplification du niveau de réplication de ZIKV et une augmentation de l'infection spécifique au cours des passages ont été observées. Outre l'impact de facteurs impliqués dans l'attachement ou l'entrée des particules virales dans les cellules humaines, le rôle de l'immunité innée est ici aussi à considérer. La perte d'activation des ISGs peut également favoriser la propagation virale par une levée de l'inhibition de réplication virale, comme décrit dans le cas de l'expression de Vipérine (Panayiotou *et al.*, 2018). De récentes études ont également pu démontrer l'action antivirale de certains ISGs, tels que la cholestérol-25-hydroxylase (Li *et al.*, 2017) ou IFITM3 (Monel *et al.*, 2017; Savidis *et al.*, 2016), dans l'inhibition de l'entrée de ZIKV. Cependant, il n'y a pas de variation en taille des foyers d'infection lors de l'infection de cellules Vero où seuls des foyers d'infection de petites tailles sont visibles, malgré l'absence d'induction d'ISGs, aussi bien par le virus parental que par les virus adaptés. Ainsi, même si les réponses immunitaires peuvent jouer un rôle crucial dans le contrôle de la propagation de ZIKV en cellules humaines, il semble qu'un second mécanisme soit également responsable de ce phénotype.

### **D. Le changement d'hôtes est possiblement impliqué dans l'adaptation de ZIKV**

Le virus parental, produit et amplifié en cellules Vero, a subi une pression de sélection forte lors des passages en lignée cellulaire humaine, comme le montre l'adaptation similaire de la population virale en cellules contrôles ou activées pour la réponse TLR3. De plus, les virus passés dans les deux environnements cellulaires présentent une forte diminution du nombre de particules infectieuses lors des derniers passages par rapport au nombre total de particules physiques présentes lors des premiers passages. Il est donc possible que les populations virales se soient adaptées en premier lieu au changement d'hôtes. Différents facteurs, présents dans les cellules humaines, sont absents ou inactifs dans les cellules simiennes. Ils peuvent être notamment impliqués dans des processus liés à l'immunité innée, dont l'attachement ou l'entrée de la particule virale, et donc être à l'origine de la pression de sélection à laquelle

s'est adaptée la population virale lors des passages. Parmi les différences connues entre les cellules humaines et simiennes utilisées, il est admis que la réponse TLR4 des primates de l'Ancien Monde est diminuée de façon importante en comparaison des réponses humaines (Vaure and Liu, 2014). Il semble également que l'expression de TLR4 soit absente dans les cellules Vero (Paladino *et al.*, 2006). Cependant, le rôle de cette voie dans la réponse antivirale chez les cellules Vero, et plus précisément contre ZIKV, n'a, à notre connaissance, jamais été étudié.

Il semble également que les cellules Vero possèdent une composition différente en glycoaminoglycanes de surface, ceux-ci étant impliqués dans l'attachement des particules virales et dans l'infection des cellules hôtes par DENV (Lee *et al.*, 2006). Cependant, la composition en facteurs d'attachement entre ces deux lignées cellulaires n'est, à l'heure actuelle, pas encore connue, et les mécanismes glycoaminoglycanes-dépendants impactant l'infectivité de ZIKV sont encore pratiquement inexistant jusqu'à présent (Kim *et al.*, 2017). Par ailleurs, les cellules Vero fournissent à DENV une méthode d'entrée différente de celle observée en cellule humaine, indépendante de la présence de radeaux lipidiques (Acosta *et al.*, 2009). Des expériences biochimiques et cellulaires ont identifié le cholestérol comme un composant important des radeaux lipidiques et des structures apparentées (les cavéoles, par exemple) dans les membranes cellulaires des mammifères ; en effet, le taux de cholestérol membranaire est un facteur déterminant pour la stabilité et l'organisation des radeaux lipidiques (Crane and Tamm, 2004). Une conséquence de l'infection par DENV est l'augmentation des taux de cholestérol en début d'infection dans les cellules Huh7 mais pas dans les cellules Vero (Soto-Acosta *et al.*, 2013). La présence de cholestérol pendant l'adsorption virale bloque grandement l'infectivité de JEV et de DENV dans des cellules issues de neuroblastomes de souris (cellules N18) ou de reins de hamsters (cellules BHK-21), intervenant probablement lors des étapes de fusion et de décapsidation de l'ARN (Lee *et al.*, 2008). Ainsi, la dépendance au cholestérol dans l'infectivité de DENV, mais également d'autres arbovirus, semble être spécifique du type cellulaire (Sousa *et al.*, 2011). Ces différentes hypothèses nous amènent donc à dresser une liste de pressions de sélection putatives, mais ne permettent cependant pas d'expliquer les mécanismes d'adaptation dans la population virale, qu'ils soient directs ou indirects, suite à ces pressions.

### **E. Identification de mutations candidates responsables de l'adaptation virale**

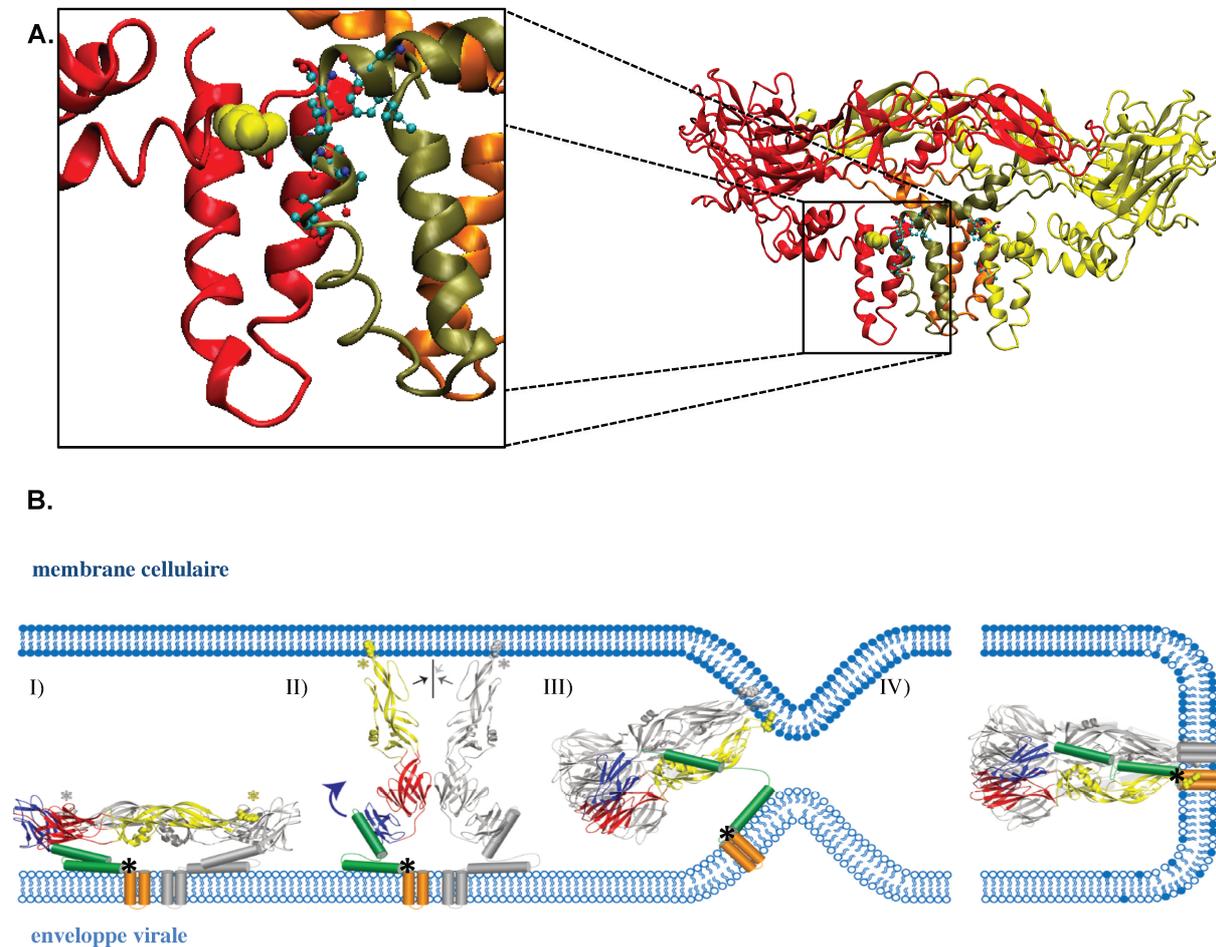
L'analyse bioinformatique des données de séquençage des populations virales a permis d'étudier *i*) la présence de variants dans différentes expériences indépendantes et *ii*) leur

augmentation en fréquence au cours des expériences d'évolution. Parmi les substitutions qui présentaient une augmentation en fréquence au cours des passages, deux substitutions nucléotidiques codants pour des mutations non-synonymes coïncidaient temporellement avec l'apparition des phénotypes décrits précédemment. Un variant situé au niveau de la glycoprotéine E (en position 2 340) a été détecté à partir du troisième passage itératif, sous forme d'une mutation non-synonyme S455L. Le second variant apparaît majoritairement à partir du quatrième passage ; la position mutée, 7 172, correspond à une modification Y87H de la protéine NS4B. Toutes les autres substitutions nucléotidiques étaient *i*) synonymes, *ii*) instables au cours des passages ou *iii*) n'étaient pas reproductibles entre les réplicats de passage.

### E.1. Mutation dans la glycoprotéine d'enveloppe E de ZIKV

La substitution S455L dans la protéine E est caractéristique d'une mutation sévère (**Figure 11.A**). L'acide aminé concerné passe d'une caractéristique hydrophile à hydrophobe. Il est donc fortement probable que ce changement impacte grandement la structure et la fonction de la protéine concernée. La substitution se situe au niveau C-terminal de la région « tige » de la glycoprotéine d'enveloppe de ZIKV, à l'interface du domaine III (impliqué dans la reconnaissance de co/récepteurs) et de la région d'ancrage transmembranaire (permettant à la glycoprotéine d'être incorporée à l'enveloppe du virus) (**Figure 11.A-B**). La tige est composée de deux hélices amphipathiques, prédites d'interagir avec la membrane virale externe, la moitié supérieure contenant des résidus hydrophiles faisant face à une moitié inférieure constituée de résidus hydrophobes interagissant avec les groupes alkyles de la membrane. Pour que la fusion entre la membrane du virus et celle de l'endosome ait lieu, la tige change de conformation et doit couvrir la longueur du domaine II de E (**Figure 11.B**). Lors de l'entrée de DENV, une interaction forte de la partie C-terminale de la tige avec le peptide de fusion lors de la conformation post-fusion de E a été observée (Klein *et al.*, 2013). Un modèle probable pour DENV est le maintien par la tige des espaces entre les oligomères de E groupés, réunissant l'ancre transmembranaire et les boucles des peptides de fusion (**Figure 11.B**). Dans ce processus, la tige induit également la courbure opposée sur la membrane virale tout en la forçant contre la compression formée dans la membrane cible, amenant les feuillettes externes des deux membranes à fusionner (**Figure 11.B**). Le changement conformationnel de la protéine E jusqu'à sa forme finale de plus basse énergie, dans laquelle le trimère est entièrement symétrique, ne peut donc être obtenu qu'en forçant la formation d'un pore (Klein *et al.*, 2013). Des observations similaires ont été faites au travers d'études

structurale sur un autre flavivirus, le virus de l'encéphalite de la tique (TBEV) (Bressanelli *et al.*, 2004; Stiasny *et al.*, 2013), et sur un alphavirus possédant, comme les flavivirus, un peptide de fusion de classe II associé à la glycoprotéine d'enveloppe (Gibbons *et al.*, 2004).



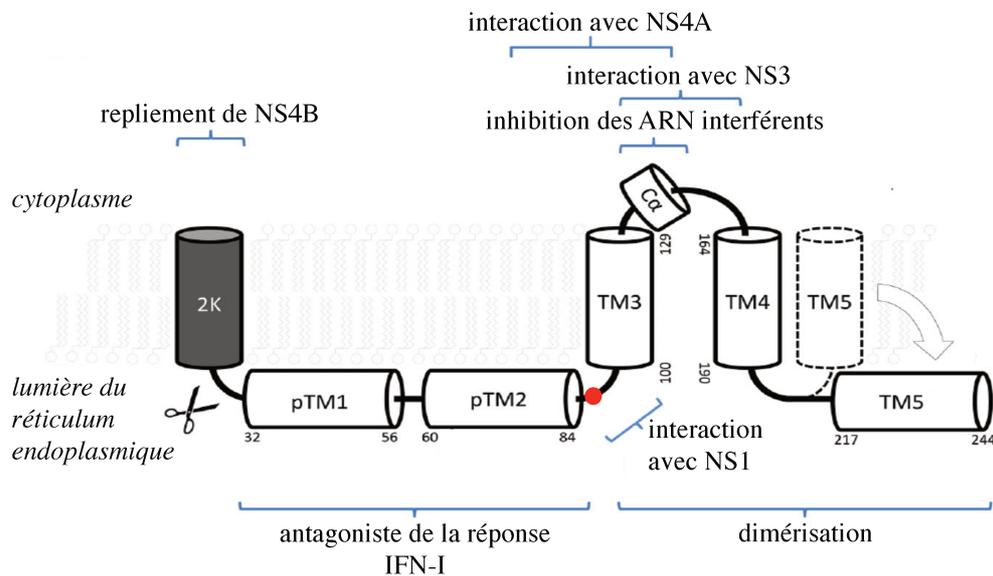
**Figure 11 : Représentation de la mutation S455L de la glycoprotéine d'enveloppe E de ZIKV.** **A.** Localisation de l'acide aminé d'intérêt (boules jaunes) sur la structure d'un homodimère E (séquence jaune et rouge) en association avec un homodimère de prM (séquence verte et orange). L'encadré correspond à un agrandissement de la région mutée. **B.** Schématisation du processus de fusion. Le processus de fusion schématisé. **(I)** Le dimère se trouve à plat sur la membrane virale à l'état de préfusion mature, avec les boucles de fusion enterrées dans les contacts du dimère. Les deux hélices amphipathiques prédites de la tige (vert) reposent contre la membrane. **(II)** Un pH bas provoque la dissociation du dimère et les monomères se projettent vers la membrane cellulaire cible où les boucles de fusion sont représentées enfouies. Le domaine III (bleu) se replie et se reconnecte du côté du domaine I (rouge), stabilisant un trimère de ce domaine. Les flèches indiquent que l'angle entre les domaines I et II (jaune) change, permettant aux boucles de fusion des trois copies du domaine II de se rejoindre. **(III)** La tige s'étend le long de l'espace entre deux domaines II, mais la tige distale et l'ancre de la membrane (orange) ne sont pas encore en contact avec la boucle de fusion. **(IV)** Les trois tiges traversent toute la longueur du domaine II, réunissant l'ancre transmembranaire et la boucle de fusion, complétant la fusion des membranes et la formation de pores. La mutation candidate S455L est représentée par un astérisque noir. (adapté de Klein *et al.*, 2013).

Notre substitution d'intérêt, située juste avant l'ancrage transmembranaire et apportant un acide aminé hydrophobe, il est attendu que la partie C-terminale de la région tige soit plus fortement incorporée dans l'enveloppe du virus. Il se pourrait que ce changement permette une fusion plus efficace et moins énergétique entre l'enveloppe du virus et la membrane de l'endosome. De manière intéressante, une comparaison entre les séquences des différents flavivirus connus pour infecter l'Homme indique que WNV possède également cette substitution. Un tel changement dans l'étape de fusion de ZIKV, si toutefois il est prouvé, pourrait expliquer la meilleure propagation de la population virale adaptée en cellules humaines. De plus, la fusion de la particule virale est, non seulement nécessaire au relargage du matériel génétique viral dans le cytoplasme, mais est considérée comme un mécanisme d'échappement aux voies de l'immunité innée, notamment aux voies TLRs, connues pour avoir une localisation endolysosomale (voir section B.1.a).

## E.2. Mutation dans la protéine NS4B de ZIKV

La substitution Y87H au sein de la protéine NS4B est plus délicate à étudier, la structure de cette protéine virale n'ayant toujours pas pu être résolue. Le changement d'un acide aminé polaire à polaire ne permet pas non plus de prédire avec certitude sur le(s) changement(s) de conformation apporté(s). Toutefois, sachant que la position de la substitution se situe au niveau de deux hélices amphipathiques prédites d'interagir avec la membrane de la lumière du réticulum endoplasmique, l'hypothèse que la substitution en position 87 en faveur d'une histidine permette une interaction de meilleure affinité entre la protéine et la membrane du réticulum endoplasmique semble plausible. Cette région de la protéine de DENV (*i.e.*, les 125 premiers acides aminés de NS4B) a été démontrée *in vitro* comme suffisante pour bloquer partiellement l'activation de STAT1 et des promoteurs de l'élément de réponse stimulé par l'interféron (ISRE) dans des cellules stimulées par l'IFN-I (Muñoz-Jordán *et al.*, 2005). Cependant, NS4B doit obligatoirement interagir avec la protéine mature NS4A pour que l'inhibition soit fonctionnelle, plus précisément entre les positions 84 à 146 de NS4B (Zou *et al.*, 2015). Dans le contexte d'infection par ZIKV, NS4B inhibe la phosphorylation de TBK1 et empêche l'activation de IRF3 (voir section C.2.c) (Wu *et al.*, 2017). De plus, l'hétérodimère NS4A/NS4B est impliqué dans la modulation de la voie Akt-mTOR, participant ainsi à l'inhibition de la neurogénèse (Liang *et al.*, 2016). L'implication de NS4B, et plus particulièrement la partie N-terminale où se situe notre mutation, dans le contrôle des réponses antivirales permet de faire l'hypothèse que cette protéine ait un rôle dans la perte d'induction des ISGs, notamment à la suite de l'activation de la voie TLR3. La protéine

NS4B n'est pas associée à la particule virale ; son action est donc dépendante de la réplication du virus. Or, nous avons pu observer que la perte de réponse des ISGs pouvait être indépendante de la réplication du virus. Il est donc probable que le mécanisme sous-jacent fasse intervenir plusieurs éléments viraux.



**Figure 12 : Représentation de la mutation Y87H de la protéine NS4B de ZIKV.** Topologie structurelle et fonctionnelle de la protéine transmembranaire NS4B. Le peptide signal 2K (N-terminal, en noir) est clivé dans la membrane du réticulum endoplasmique par la protéase cellulaire (ciseaux). La protéine NS4B mature contient cinq domaines hélicoïdaux majeurs, dont trois sont expérimentalement prouvés comme étant des hélices transmembranaires (TM3-5) et deux sont prédits (pTM1 et pTM2) mais susceptibles de résider dans la lumière du réticulum endoplasmique. La mutation candidate Y87H est représentée par un rond rouge (adapté de Zmurko *et al.*, 2015).

La protéine NS1 des flavivirus est une protéine non structurale glycosylée, oligomérisée dans la lumière du réticulum endoplasmique. Elle est localisée dans la membrane plasmique des cellules infectées et est sécrétée dans l'espace extracellulaire. Le mécanisme d'expression de NS1 à la surface des cellules infectées reste incertain, bien qu'il y ait des évidences d'ancrages atypiques à des glycosyl-phosphatidylinositols ou encore à des radeaux lipidiques (Noisakran *et al.*, 2008). NS1 se lie également aux cellules non infectées et antagonise plusieurs réponses immunitaires (Chung *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2018). Même si NS1 est localisée à la lumière du réticulum endoplasmique et que la réplication virale se produit sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique, NS1 est une protéine essentielle régulant la réplication de l'ARN viral de manière précoce (Alcon-LePoder *et al.*, 2005; Lindenbach and Rice, 1997, 1999). Dans le cas de WNV, l'instabilité de NS1 peut être induite par la double substitutions RQ10NK, et se traduit par des changements de son

oligomérisation, de sa sécrétion et d'une infectivité du virus atténuée (Youn *et al.*, 2012). Cette mutation, très instable en culture cellulaire, est rapidement compensée après deux passages soit par un retour spontané à la séquence sauvage ou soit par l'apparition d'une mutation F86C de la protéine NS4B. Alors que la substitution seule de NS4B n'apporte pas de phénotype particulier au virus, la double présence des mutations de NS1 et NS4B restaure complètement la réplication de l'ARN viral par une interaction directe des deux protéines (Youn *et al.*, 2012). L'analyse des séquences de différents isolats de ZIKV a indiqué la présence d'une substitution R98G dans NS1 dans l'isolat que nous avons utilisé. Une analyse structurale de la conséquence de cette mutation a mis en avant une instabilité de la structure de la protéine par la perte de nombreux ponts hydrogènes, maintenus originalement par l'arginine. Il est tentant de spéculer que la mutation détectée dans NS4B, très semblable à celle décrite par Youn *et al.*, pourrait impacter la stabilisation de NS1 et ainsi permettre une meilleure réplication virale, ainsi qu'une sécrétion d'hexamères de NS1 conduisant dès lors au contrôle des réponses immunitaires des cellules. Ce mécanisme inhibiteur et indépendant de la réplication ferait alors le lien avec nos observations phénotypiques sur les populations virales de ZIKV adaptées. De plus, le possible impact de la différence de composition des radeaux lipidiques entre les cellules Vero et les cellules Huh7.5.1, ainsi que la potentielle interaction de NS1 avec ces lipides, permettrait de mettre en avant une probable origine de la pression de sélection qu'a subie le virus.

## **F. Le passage de ZIKV en cellules humaines permet la diversification génétique de la population virale**

### **F.1. Stabilisation de la diversité virale au cours des premiers passages**

Une population de virus à ARN se stabilise génétiquement lorsque qu'elle est maintenue dans un hôte ; un changement de la diversité génétique est du à une modification des relations hôte-virus ou à un changement d'hôte (Schneider and Roossinck, 2001). L'hôte apporte des composants essentiels à la réplication du virus, en plus de contrôler l'apport en nucléotides, le pH et d'autres propriétés d'éléments solubles tels que les cations divalents, tous pouvant affecter la fidélité de la polymérase virale. Notre système de passages de virus en culture cellulaire s'affranchit de nombreuses contraintes adaptatives présentes *in vivo* (*i.e.*, réponse humorale, température notamment). La stabilité génétique est ici rendue possible en l'absence de pression de sélection (*i.e.*, cellules contrôle). Inversement, les virus peuvent être capables de générer des niveaux équivalents de diversité dans différents hôtes, bien qu'une pression de

sélection spécifique à un hôte particulier agit comme un cap, limitant l'accumulation de diversité. En effet, les analyses bioinformatiques des différentes populations secrétées de ZIKV obtenues au cours des passages ont indiqué que la diversité virale est stable lors des premiers passages en cellules contrôle, malgré l'augmentation en fréquence de variants, où notre analyse a été principalement ciblée sur l'évolution de séquences consensus. De plus, la couverture de séquençage pour les virus issus de passages précoces est plus faible (environ 4 fois) que pour les virus adaptés. Il est donc possible que de nombreux variants à faibles fréquences se situent à la limite de détection, ce qui pourrait biaiser la visualisation de la diversité génétique aux temps précoces (Acevedo *et al.*, 2014).

## F.2. Augmentation de la diversification génétique après fixation des mutations

Etant donné que nos séquençages ont porté sur les virus secrétés, il est envisageable qu'une sélection s'opère lors de l'assemblage de virions. Nous n'observons donc pas les virus portant des mutations létales (*i.e.*, codon STOP prématuré, perte d'activité catalytique). La diversité génétique doit être donc moins importante en comparaison d'études portant sur des populations virales présentes au niveau intracellulaire. On peut corrélérer temporellement la fixation des mutations dans la population virale avec une augmentation de la diversité génétique dans les passages plus tardifs. La perte de diversification génétique de la population virale secrétée lors des premiers passages semble indiquer que ZIKV a subi une pression de sélection à ces instants précis. L'augmentation tardive de la diversité peut être due au changement d'hôte, le virus ayant été amplifié en cellules de singe avant passages en cellules humaines. Une multiplicité d'infections basse sur une large population cellulaire a été utilisée dans cette étude. L'impact du nombre de particules utilisées pour le passage de ZIKV est inconnu ; néanmoins, ce paramètre pourrait théoriquement promouvoir la diversification génétique et favoriser l'apparition précoce de variants.

## F.3. Relation entre diversification génétique et changement d'hôtes

ZIKV, comme beaucoup d'arbovirus, est transmis majoritairement à l'Homme par les moustiques et possède un réservoir naturel qu'est le singe. Il est donc possible que cette adaptation arrive naturellement lors de la transition du cycle sylvatique au cycle urbain. Il serait alors intéressant d'étudier la diversité de séquences pour une souche donnée de ZIKV dans une population de singes et de patients d'une même zone géographique afin de détecter des régions génétiques impliquées dans la diversité virale liée à l'hôte. Malheureusement, bien que les banques de données soient en pleine expansion, le nombre de séquences virales

disponibles issues directement de singes ou de patients reste réduit. De plus, l'étude du passage naturel de l'hôte simien à l'Homme doit prendre en compte le troisième facteur essentiel au phénomène d'adaptation : le moustique. La transition du virus par l'hôte arthropode semble être une étape importante à l'adaptation de ZIKV, de par une population virale ayant une plus grande hétérogénéité de séquences chez les singes infectés par des moustiques que chez les animaux inoculés par injection (Dudley *et al.*, 2017).

## V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le passage de populations virales de ZIKV en cellules humaines nous a menés à l'observation d'une adaptation rapide. Elle se traduit par la perte de la réponse ISG précoce suivie d'une augmentation de la propagation virale en association temporelle avec une résistance à la réponse antivirale induite par la voie TLR3. Cette adaptation virale est aussi apparue en l'absence de la pression de sélection par l'activation de la voie TLR3. Ces observations laissent donc présumer que le passage de virus issus d'un isolat clinique dans un environnement cellulaire potentiellement plus homogène (*i.e.*, dans le contexte de lignée cellulaire : type cellulaire unique, voie de l'immunité innée fonctionnelle limitée, absence de réponse adaptative, absence de contrainte physico-chimique comme dans le sang etc..) a constitué un environnement sélectif ayant visiblement guidé l'acquisition de mutations adaptatives.

L'analyse bioinformatique des populations virales nous a permis de sélectionner deux mutations candidates : la mutation S455L dans la glycoprotéine d'enveloppe E et la mutation Y87H dans la protéine NS4B. Afin de valider ces candidats, la réintroduction de ces différentes mutations dans un clone moléculaire apparenté à l'isolat clinique utilisé est actuellement en cours. L'impact de chaque mutation sur le phénotype du virus pourra donc être étudié, ainsi que la présence simultanée des deux candidats dans le clone infectieux.

### A. Caractérisation des voies immunitaires impliquées dans l'activation précoce des réponses ISGs

Comme développées précédemment, deux hypothèses sont envisagées pour expliquer l'expression d'ISGs induites initialement par le virus parental : *via* une activation directe par le virus ou *via* la présence de facteurs solubles.

Dans le cas où une réponse immunitaire serait en jeu, il est judicieux de s'intéresser à plusieurs voies candidates.

#### A.1. Activation indirecte

La présence de facteurs cellulaires solubles dans le surnageant utilisé pour infecter les cellules est probable. Une analyse poussée de la composition du surnageant du virus parental inactivé aux UV, comparée à la composition du surnageant de virus adapté, pourrait mettre à jour des différences (*i.e.*, cytokine pro-inflammatoire ou IFN-III). Pour vérifier cette hypothèse, le

caractère immunostimulant du surnageant pourrait être testé sur d'autres lignées cellulaires déficientes pour différents senseurs de protéines solubles. Ainsi, le suivi de la réponse ISG à la suite de l'infection de cellules dépourvues de récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires ou à l'IFN-III devrait indiquer la présence, ou non, de ces molécules dans le surnageant. De même, la caractérisation des réponses fonctionnelles dans les cellules Huh7.5.1 et Vero pourrait également apporter des informations quant à leur capacité à sécréter différentes cytokines. Pour cela, de nombreux agonistes pour l'induction d'une réponse pro-inflammatoire existent (*i.e.*, prostratine ou PMA). Le PRR, impliqué dans l'activation de IRF-1, n'est toujours pas connu, bien que son rôle antiviral soit cependant prouvé à l'encontre de DENV (Carlin *et al.*, 2017). L'implication de IRF-1 dans la réponse antivirale déclenchée par ZIKV reste une possibilité. De plus, la signature d'ISGs induits par IRF-1 est semblable aux niveaux d'induction détectés lors d'infection avec le virus parental (*i.e.*, forte expression IFN-indépendante de MxA) (Schoggins *et al.*, 2011). L'utilisation de lignées cellulaires déficientes pour IRF-1 lors d'infection par le virus parental permettrait de lever le voile sur une possible implication de ce facteur dans une voie encore peu détaillée.

#### A.2. Activation par des protéines virales

Il existe plusieurs exemples d'activation de la réponse ISG précoce suite à la détection de protéines virales par divers PRRs et notamment la protéine NS1 de DENV qui semble être détectée par TLR4 (Modhiran *et al.*, 2017) ou par TLR2 et TLR6 (Chen *et al.*, 2015) en fonction des études. Bien que cela n'ait jamais été étudié pour ZIKV, il serait d'intérêt de vérifier l'impact d'une surexpression de TLR4 sur l'expression d'ISGs (*i.e.*, ISG15 et MxA) dans le cas d'une infection par la souche parentale et adaptée de ZIKV. A la suite de récentes controverses, une même étude devrait également être effectuée sur des lignées cellulaires exprimant TLR2 et TLR6. De manière concomitante, la détection par Western blot de la forme sécrétée de NS1 dans les surnageants infectieux des virus parental et adapté permettrait de savoir si cette protéine peut être responsable de l'induction d'ISGs ou si cette réponse est liée directement à la reconnaissance de la particule virale (*i.e.*, glycoprotéine d'enveloppe E).

#### B. Augmentation de l'infectivité de ZIKV dépendant du type cellulaire

L'apparition d'un pouvoir infectieux augmenté chez les virus adaptés est également une notion à prendre en compte afin de comprendre l'histoire évolutive du virus. Le fait que ZIKV présente une meilleure propagation exclusivement en cellules Huh7.5.1, et non pas en cellules Vero, soulève de nombreuses questions.

### B.1. Mécanisme d'entrée du virus adapté

Il semble que ce mécanisme soit hôte-dépendant du fait que les cellules Huh7.5.1 et Vero soient respectivement d'origine humaine et simienne. Un mode d'entrée particulier, indépendant de la présence de radeaux lipidique, a été décrit dans le cas d'infection de cellules Vero par des flavivirus (Acosta *et al.*, 2009). Il se peut que le virus adapté ait développé de nouvelles stratégies d'entrée en cellules humaines. La participation des différents compartiments endosomaux à l'entrée du virus peut facilement être observé par imagerie. L'analyse pourrait également être couplée à un traitement par différentes drogues connues pour déréguler le trafic vésiculaire (*e.g.*, Bafilomycine). L'entrée de certains virus met également en jeu des mécanismes de captation, comme la macropinocytose, dont le rôle peut être évalué par une inhibition des principaux régulateurs de la macropinocytose, y compris Pak1 et CtBP / BARS, ainsi que par un traitement des cellules à l'EIPA (Aleksandrowicz *et al.*, 2011).

Un effet synergique entre la méthode d'entrée et l'induction de la réponse ISG est envisageable et peut également expliquer les différences hôte-dépendantes observées. En effet, des perturbations membranaires peuvent induire l'activation de réponses innées non-canoniques (Hare *et al.*, 2016; Noyce *et al.*, 2011). De plus, nous avons précédemment discuté de la possible importance du cholestérol, et plus précisément des radeaux lipidiques, dans l'infectivité des flavivirus. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'infecter des cellules traitées au méthyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), un composé connu pour appauvrir le cholestérol membranaire et perturber les radeaux lipidiques. Afin de mieux détailler l'effet hôte-dépendant, des cellules Huh7.5.1 et Vero pourraient être utilisées en parallèle. Si les précédentes observations sont validées (Lee *et al.*, 2008; Soto-Acosta *et al.*, 2013), l'infectivité de ZIKV en cellules Huh7.5.1 devrait augmenter mais rester identique en cellules Vero.

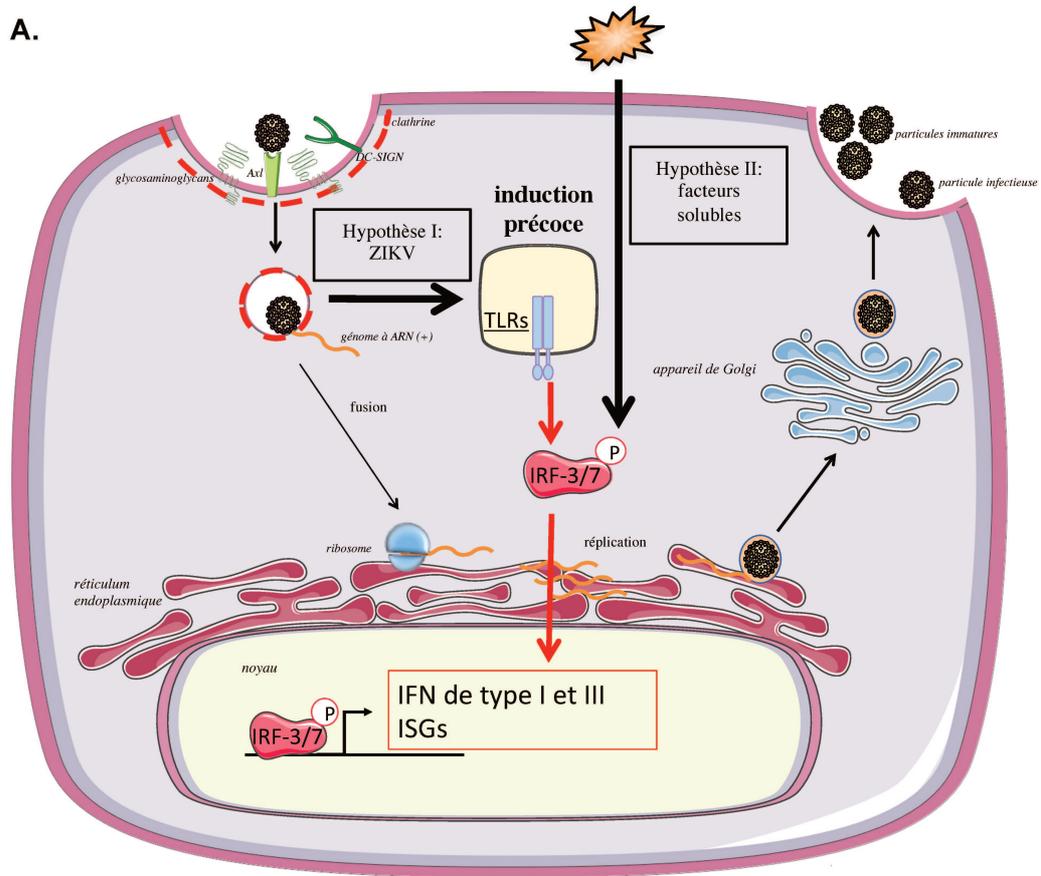
### B.2. Optimisation de la particule virale

Il est également possible que l'étape conventionnelle d'entrée de ZIKV ait été optimisée par les passages successifs. En effet, la voie d'entrée canonique de ZIKV est probablement utilisée, mais certains paramètres, telles que la fusion ou la stabilité de la particule virale, ont pu évoluer. Il serait donc d'intérêt de définir les interactions qu'il existe entre la particule virale et les membranes cellulaires, notamment au niveau du processus de fusion de la particule virale. Pour cela, un test de fusion des différentes particules virales obtenues lors des

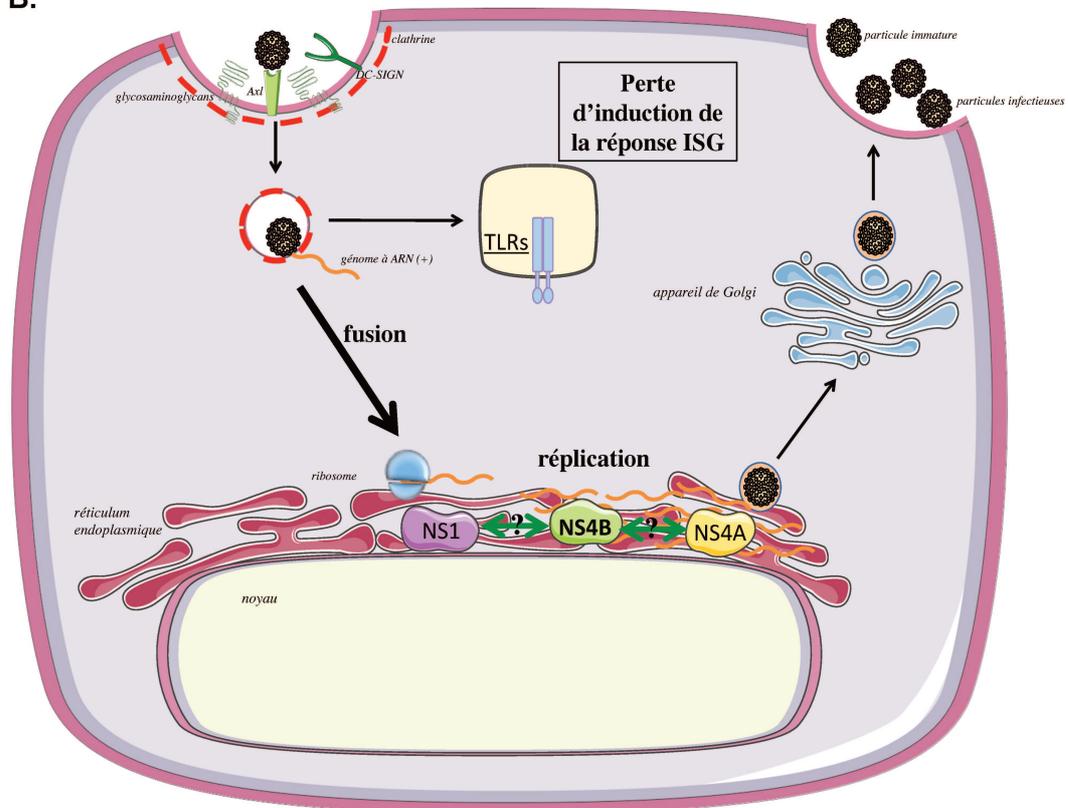
passages sur des liposomes est envisageable (Dreux *et al.*, 2007). Etant donné que ZIKV est considéré comme étant plus résistant que d'autres flavivirus aux changements de température, il serait également intéressant de comparer la stabilité de virions issus du surnageant parental à celle de virions issus du surnageant adapté à différentes températures (*i.e.*, 37°C et 50°C). Bien que notre mutation candidate S455L de la protéine E n'est pas, à notre connaissance, impliquée dans la stabilisation de la structure virale, il semble y avoir des évidences que la région mutée a un rôle essentiel dans la conformation de E lors des étapes de fusion de DENV (Klein *et al.*, 2013).

**Figure 13 : Modèle de l'adaptation virale de ZIKV observée après de multiples passages en lignée cellulaire humaine.** **A.** Lors d'une infection par le virus parental, une induction forte et précoce de la réponse ISG, indépendante de la réplication du virus, est observée. Le mécanisme activateur de la réponse immunitaire innée est donc soit *i*) dépendant de la reconnaissance de la particule virale par la cellule, soit *ii*) une conséquence de la présence de facteurs solubles dans le surnageant du virus. **B.** Dans le cas d'une infection par le virus adapté, il n'y a plus d'augmentation précoce de l'expression d'ISGs. De plus, comparé à l'infection par le virus parental, le pouvoir infectieux du virus adapté est augmenté. Les mutations candidates associées à ces phénotypes impactent les protéines E et NS4B de ZIKV. Il est donc possible que ces mutations jouent un rôle dans les étapes d'entrée (*i.e.*, fusion de la particule virale) ou de réplication du virus (*i.e.*, possible interaction de NS4B avec les protéines virales NS1 et/ou NS4A).

A.



B.



## VI. RÉFÉRENCES

- Abbink, P., Larocca, R.A., De La Barrera, R.A., Bricault, C.A., Moseley, E.T., Boyd, M., Kirilova, M., Li, Z., Ng'ang'a, D., Nanayakkara, O., et al. (2016). Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science* 353, 1129–1132.
- Acevedo, A., Brodsky, L., and Andino, R. (2014). Mutational and fitness landscapes of an RNA virus revealed through population sequencing. *Nature* 505, 686–690.
- Acosta, E.G., Castilla, V., and Damonte, E.B. (2009). Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell. Microbiol.* 11, 1533–1549.
- Aguirre, S., Maestre, A.M., Pagni, S., Patel, J.R., Savage, T., Gutman, D., Maringer, K., Bernal-Rubio, D., Shabman, R.S., Simon, V., et al. (2012). DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS Pathog.* 8, e1002934.
- Aguirre, S., Luthra, P., Sanchez-Aparicio, M.T., Maestre, A.M., Patel, J., Lamothe, F., Fredericks, A.C., Tripathi, S., Zhu, T., Pintado-Silva, J., et al. (2017). Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat. Microbiol.* 2, 17037.
- Aid, M., Abbink, P., Larocca, R.A., Boyd, M., Nityanandam, R., Nanayakkara, O., Martinot, A.J., Moseley, E.T., Blass, E., Borducchi, E.N., et al. (2017). Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. *Cell* 169, 610–620.e14.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Alcon-LePoder, S., Drouet, M.-T., Roux, P., Frenkiel, M.-P., Arborio, M., Durand-Schneider, A.-M., Maurice, M., Le Blanc, I., Gruenberg, J., and Flamand, M. (2005). The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. *J. Virol.* 79, 11403–11411.
- Aleksandrowicz, P., Marzi, A., Biedenkopf, N., Beimforde, N., Becker, S., Hoenen, T., Feldmann, H., and Schnittler, H.-J. (2011). Ebola Virus Enters Host Cells by Macropinocytosis and Clathrin-Mediated Endocytosis. *J. Infect. Dis.* 204, S957–S967.
- Arend, W.P., Palmer, G., and Gabay, C. (2008). IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol. Rev.* 223, 20–38.
- Arnaud, N., Dabo, S., Akazawa, D., Fukasawa, M., Shinkai-Ouchi, F., Hugon, J., Wakita, T., and Meurs, E.F. (2011). Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog.* 7, e1002289.
- Ashour, J., Laurent-Rolle, M., Shi, P.-Y., and García-Sastre, A. (2009). NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J. Virol.* 83, 5408–5418.
- Atkinson, B., Thorburn, F., Petridou, C., Bailey, D., Hewson, R., Simpson, A.J.H., Brooks,

- T.J.G., and Aarons, E.J. (2017). Presence and Persistence of Zika Virus RNA in Semen, United Kingdom, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 611–615.
- Barbier, V., Lang, D., Valois, S., Rothman, A.L., and Medin, C.L. (2017). Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. *Virology* 500, 149–160.
- Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J.-M., Lavillette, D., and Cosset, F.-L. (2005). An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies. *J. Virol.* 79, 8217–8229.
- Bayless, N.L., Greenberg, R.S., Swigut, T., Wysocka, J., and Blish, C.A. (2016). Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe* 20, 423–428.
- Beatty, P.R., Puerta-Guardo, H., Killingbeck, S.S., Glasner, D.R., Hopkins, K., and Harris, E. (2015). Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci. Transl. Med.* 7, 304ra141.
- Blagrove, M.S.C., Arias-Goeta, C., Failloux, A.-B., and Sinkins, S.P. (2011). Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Bohannan, B. j. m., and Lenski, R. e. (2000). Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage. *Ecol. Lett.* 3, 362–377.
- Boots, M., and Meador, M. (2007). Local interactions select for lower pathogen infectivity. *Science* 315, 1284–1286.
- Brasil, P., Pereira, J.P.J., Moreira, M.E., Ribeiro Nogueira, R.M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R.S., Valderramos, S.G., Halai, U.-A., Salles, T.S., et al. (2016a). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro.
- Brasil, P., Pereira, J.P.J., Moreira, M.E., Ribeiro Nogueira, R.M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R.S., Valderramos, S.G., Halai, U.-A., Salles, T.S., et al. (2016b). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* 375, 2321–2334.
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X., and Rey, F.A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 23, 728–738.
- Brinkmann, M.M., Spooner, E., Hoebe, K., Beutler, B., Ploegh, H.L., and Kim, Y.-M. (2007). The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.* 177, 265–275.
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C. (2015). Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 257–290.

- Byk, L.A., and Gamarnik, A.V. (2016). Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annu. Rev. Virol.* 3, 263–281.
- Cairns, D.M., Boorgu, D.S.S.K., Levin, M., and Kaplan, D.L. (2018). Niclosamide rescues microcephaly in a humanized in vivo model of Zika infection using human induced neural stem cells. *Biol. Open* 7.
- Cao, B., Parnell, L.A., Diamond, M.S., and Mysorekar, I.U. (2017). Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J. Exp. Med.* jem.20170957.
- Cao-Lormeau, V.M., Blake, A., Mons, S., Lastere, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet Lond. Engl.* 387, 1531–1539.
- Carlin, A.F., Plummer, E.M., Vizcarra, E.A., Sheets, N., Joo, Y., Tang, W., Day, J., Greenbaum, J., Glass, C.K., Diamond, M.S., et al. (2017). An IRF-3-, IRF-5-, and IRF-7-Independent Pathway of Dengue Viral Resistance Utilizes IRF-1 to Stimulate Type I and II Interferon Responses. *Cell Rep.* 21, 1600–1612.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., and Cannizzaro, L.A. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97–100.
- Chao, L., and Elena, S.F. (2017). Nonlinear trade-offs allow the cooperation game to evolve from Prisoner's Dilemma to Snowdrift. *Proc. Biol. Sci.* 284.
- Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C.J., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., et al. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* 20, 342–356.
- Chavali, P.L., Stojic, L., Meredith, L.W., Joseph, N., Nahorski, M.S., Sanford, T.J., Sweeney, T.R., Krishna, B.A., Hosmillo, M., Firth, A.E., et al. (2017). Neurodevelopmental protein Musashi 1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication. *Science* eaam9243.
- Chawla-Sarkar, M., Leaman, D.W., and Borden, E.C. (2001). Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 1821–1831.
- Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.-F., Williams, B.R., Sen, G.C., Silverman, R.H., and Borden, E.C. (2003). Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8, 237–249.
- Chen, J., Ng, M.M.-L., and Chu, J.J.H. (2015). Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog.* 11, e1005053.
- Chen, J., Yang, Y., Chen, J., Zhou, X., Dong, Z., Chen, T., Yang, Y., Zou, P., Jiang, B., Hu,

- Y., et al. (2017). Zika virus infects renal proximal tubular epithelial cells with prolonged persistency and cytopathic effects. *Emerg. Microbes Infect.* *6*, e77.
- Chung, K.M., Liszewski, M.K., Nybakken, G., Davis, A.E., Townsend, R.R., Fremont, D.H., Atkinson, J.P., and Diamond, M.S. (2006). West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 19111–19116.
- Ciota, A.T., Ehrbar, D.J., Van Slyke, G.A., Willsey, G.G., and Kramer, L.D. (2012). Cooperative interactions in the West Nile virus mutant swarm. *BMC Evol. Biol.* *12*, 58.
- Coffey, L.L., Beeharry, Y., Bordería, A.V., Blanc, H., and Vignuzzi, M. (2011). Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16038–16043.
- Corrales, L., Matson, V., Flood, B., Spranger, S., and Gajewski, T.F. (2017). Innate immune signaling and regulation in cancer immunotherapy. *Cell Res.* *27*, 96–108.
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E.G., Neufeldt, C.J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., et al. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep.* *18*, 2113–2123.
- Coutard, B., Barral, K., Lichière, J., Selisko, B., Martin, B., Aouadi, W., Lombardia, M.O., Debart, F., Vasseur, J.-J., Guillemot, J.C., et al. (2017). Zika Virus Methyltransferase: Structure and Functions for Drug Design Perspectives. *J. Virol.* *91*.
- Crane, J.M., and Tamm, L.K. (2004). Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes. *Biophys. J.* *86*, 2965–2979.
- Cuddihy, A.R., Wong, A.H., Tam, N.W., Li, S., and Koromilas, A.E. (1999). The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene* *18*, 2690–2702.
- Daffis, S., Samuel, M.A., Suthar, M.S., Gale, M., and Diamond, M.S. (2008). Toll-Like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection. *J. Virol.* *82*, 10349–10358.
- Dalrymple, N.A., Cimica, V., and Mackow, E.R. (2015a). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *MBio* *6*, e00553-15.
- Dalrymple, N.A., Cimica, V., and Mackow, E.R. (2015b). Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *MBio* *6*.
- Dang, J., Tiwari, S.K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V.S., Eroshkin, A.M., and Rana, T.M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* *19*, 258–265.
- Dar, A.C., Dever, T.E., and Sicheri, F. (2005). Higher-order substrate recognition of

eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* 122, 887–900.

Décembre, E., Assil, S., Hillaire, M.L.B., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Screaton, G.R., Davidson, A.D., and Dreux, M. (2014). Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* 10.

Dey, M., Cao, C., Dar, A.C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F., and Dever, T.E. (2005). Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* 122, 901–913.

Dick, G.W.A., Kitchen, S.F., and Haddock, A.J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509–520.

Dolganiuc, A., Oak, S., Kodys, K., Golenbock, D.T., Finberg, R.W., Kurt-Jones, E., and Szabo, G. (2004). Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology* 127, 1513–1524.

Donald, C.L., Brennan, B., Cumberworth, S.L., Rezelj, V.V., Clark, J.J., Cordeiro, M.T., Freitas de Oliveira França, R., Pena, L.J., Wilkie, G.S., Da Silva Filipe, A., et al. (2016). Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10.

Dowd, K.A., Jost, C.A., Durbin, A.P., Whitehead, S.S., and Pierson, T.C. (2011). A Dynamic Landscape for Antibody Binding Modulates Antibody-Mediated Neutralization of West Nile Virus. *PLOS Pathog.* 7, e1002111.

Dowd, K.A., Ko, S.-Y., Morabito, K.M., Yang, E.S., Pelc, R.S., DeMaso, C.R., Castilho, L.R., Abbink, P., Boyd, M., Nityanandam, R., et al. (2016). Rapid Development of a DNA Vaccine for Zika Virus. *Science* 354, 237–240.

Dreux, M., Pietschmann, T., Granier, C., Voisset, C., Ricard-Blum, S., Mangeot, P.-E., Keck, Z., Foug, S., Vu-Dac, N., Dubuisson, J., et al. (2006). High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J. Biol. Chem.* 281, 18285–18295.

Dreux, M., Boson, B., Ricard-Blum, S., Molle, J., Lavillette, D., Bartosch, B., Pécheur, E.-I., and Cosset, F.-L. (2007). The Exchangeable Apolipoprotein ApoC-I Promotes Membrane Fusion of Hepatitis C Virus. *J. Biol. Chem.* 282, 32357–32369.

Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Décembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S., and Chisari, F.V. (2012). Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* 12, 558–570.

Dudley, D.M., Newman, C.M., Lalli, J., Stewart, L.M., Koenig, M.R., Weiler, A.M., Semler, M.R., Barry, G.L., Zarbock, K.R., Mohns, M.S., et al. (2017). Infection via mosquito bite alters Zika virus tissue tropism and replication kinetics in rhesus macaques. *Nat. Commun.* 8, 2096.

Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick,

- M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., et al. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2536–2543.
- Eberle, K.C., McGill, J.L., Reinhardt, T.A., and Sacco, R.E. (2016). Parainfluenza Virus 3 Blocks Antiviral Mediators Downstream of the Interferon Lambda Receptor by Modulating Stat1 Phosphorylation. *J. Virol.* *90*, 2948–2958.
- Egli, A., Santer, D.M., O’Shea, D., Tyrrell, D.L., and Houghton, M. (2014). The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerg. Microbes Infect.* *3*, e51.
- Estornes, Y., Toscano, F., Virard, F., Jacquemin, G., Pierrot, A., Vanbervliet, B., Bonnin, M., Lalaoui, N., Mercier-Gouy, P., Pachéco, Y., et al. (2012). dsRNA induces apoptosis through an atypical death complex associating TLR3 to caspase-8. *Cell Death Differ.* *19*, 1482–1494.
- Ewald, S.E., Lee, B.L., Lau, L., Wickliffe, K.E., Shi, G.-P., Chapman, H.A., and Barton, G.M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* *456*, 658–662.
- Faye, O., Freire, C.C.M., Iamarino, A., Faye, O., de Oliveira, J.V.C., Diallo, M., Zanotto, P.M.A., and Sall, A.A. (2014). Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *8*.
- Filomatori, C.V., Carballeda, J.M., Villordo, S.M., Aguirre, S., Pallarés, H.M., Maestre, A.M., Sánchez-Vargas, I., Blair, C.D., Fabri, C., Morales, M.A., et al. (2017). Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells. *PLoS Pathog.* *13*.
- Fourati, S., Malet, I., Lambert, S., Soulie, C., Wirden, M., Flandre, P., Fofana, D.B., Sayon, S., Simon, A., Katlama, C., et al. (2012). E138K and M184I mutations in HIV-1 reverse transcriptase coemerge as a result of APOBEC3 editing in the absence of drug exposure. *AIDS Lond. Engl.* *26*, 1619–1624.
- Fredericksen, B.L., Keller, B.C., Fornek, J., Katze, M.G., and Gale, M. (2008). Establishment and Maintenance of the Innate Antiviral Response to West Nile Virus Involves both RIG-I and MDA5 Signaling through IPS-1. *J. Virol.* *82*, 609–616.
- Frentiu, F.D., Zakir, T., Walker, T., Popovici, J., Pyke, A.T., van den Hurk, A., McGraw, E.A., and O’Neill, S.L. (2014). Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *8*, e2688.
- Friedberg, E.C., Wagner, R., and Radman, M. (2002). Specialized DNA Polymerases, Cellular Survival, and the Genesis of Mutations. *Science* *296*, 1627–1630.
- Funami, K., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Akazawa, T., Yamamoto, A., and Seya, T. (2004). The cytoplasmic “linker region” in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int. Immunol.* *16*, 1143–1154.
- Gao, D., Lou, Y., He, D., Porco, T.C., Kuang, Y., Chowell, G., and Ruan, S. (2016). Prevention and Control of Zika as a Mosquito-Borne and Sexually Transmitted Disease: A

Mathematical Modeling Analysis. *Sci. Rep.* 6, 28070.

Gao, Z., Zhu, M., Wu, Y., Gao, P., Qin, Z., and Wang, H. (2014). Interferon- $\lambda$ 1 induces G1 phase cell cycle arrest and apoptosis in gastric carcinoma cells in vitro. *Oncol. Rep.* 32, 199–204.

Garaigorta, U., and Chisari, F.V. (2009). Hepatitis C virus blocks interferon effector function by inducing protein kinase R phosphorylation. *Cell Host Microbe* 6, 513–522.

Gibbons, D.L., Vaney, M.-C., Roussel, A., Vigouroux, A., Reilly, B., Lepault, J., Kielian, M., and Rey, F.A. (2004). Conformational change and protein–protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature* 427, 320–325.

Glass, W.G., Lim, J.K., Cholera, R., Pletnev, A.G., Gao, J.-L., and Murphy, P.M. (2005). Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* 202, 1087–1098.

Goh, K.C., deVeer, M.J., and Williams, B.R. (2000). The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *EMBO J.* 19, 4292–4297.

Gough, D.J., Messina, N.L., Clarke, C.J.P., Johnstone, R.W., and Levy, D.E. (2012). Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity* 36, 166–174.

Grant, A., Ponia, S.S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M.C., Sánchez-Seco, M.P., Evans, M.J., Best, S.M., et al. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* 19, 882–890.

Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* 89, 8880–8896.

Hanners, N.W., Eitson, J.L., Usui, N., Richardson, R.B., Wexler, E.M., Konopka, G., and Schoggins, J.W. (2016). Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. *Cell Rep.* 15, 2315–2322.

Hare, D.N., Collins, S.E., Mukherjee, S., Loo, Y.-M., Gale, M., Janssen, L.J., and Mossman, K.L. (2016). Membrane Perturbation-Associated Ca<sup>2+</sup> Signaling and Incoming Genome Sensing Are Required for the Host Response to Low-Level Enveloped Virus Particle Entry. *J. Virol.* 90, 3018–3027.

Härtlova, A., Erttmann, S.F., Raffi, F.A., Schmalz, A.M., Resch, U., Anugula, S., Lienenklaus, S., Nilsson, L.M., Kröger, A., Nilsson, J.A., et al. (2015). DNA Damage Primes the Type I Interferon System via the Cytosolic DNA Sensor STING to Promote Anti-Microbial Innate Immunity. *Immunity* 42, 332–343.

Heaton, N.S., and Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 8, 422–432.

- Heaton, N.S., Perera, R., Berger, K.L., Khadka, S., Lacount, D.J., Kuhn, R.J., and Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17345–17350.
- Hipp, M.M., Shepherd, D., Gileadi, U., Aichinger, M.C., Kessler, B.M., Edelmann, M.J., Essalmani, R., Seidah, N.G., Reis e Sousa, C., and Cerundolo, V. (2013). Processing of human Toll-like receptor 7 by furin-like proprotein convertases is required for its accumulation and activity in endosomes. *Immunity* *39*, 711–721.
- Hoffmann, H.-H., Schneider, W.M., and Rice, C.M. (2015). Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol.* *36*, 124–138.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 4531–4537.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* *314*, 994–997.
- Hou, S., Kumar, A., Xu, Z., Airo, A.M., Stryapunina, I., Wong, C.P., Branton, W., Tchesnokov, E., Götte, M., Power, C., et al. (2017). Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. *J. Virol.* *91*.
- Ippagunta, S.K., Malireddi, R.K.S., Shaw, P.J., Neale, G.A., Vande Walle, L., Green, D.R., Fukui, Y., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2011). The inflammasome adaptor ASC regulates adaptive immune cell functions by controlling DOCK2-mediated Rac activation and actin polymerization. *Nat. Immunol.* *12*, 1010–1016.
- Ishii, N., Funami, K., Tatematsu, M., Seya, T., and Matsumoto, M. (2014). Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* *193*, 5118–5128.
- Jemielity, S., Wang, J.J., Chan, Y.K., Ahmed, A.A., Li, W., Monahan, S., Bu, X., Farzan, M., Freeman, G.J., Umetsu, D.T., et al. (2013). TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. *PLOS Pathog.* *9*, e1003232.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.-G., Lee, H., and Lee, J.-O. (2007). Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* *130*, 1071–1082.
- Jurado, K.A., Yockey, L.J., Wong, P.W., Lee, S., Huttner, A.J., and Iwasaki, A. (2017). Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. *Nat. Microbiol.*
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-

stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* *205*, 1601–1610.

Katzelnick, L.C., Gresh, L., Halloran, M.E., Mercado, J.C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., and Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* eaan6836.

Kauffman, E.B., and Kramer, L.D. (2017). Zika Virus Mosquito Vectors: Competence, Biology, and Vector Control. *J. Infect. Dis.* *216*, S976–S990.

Kaukinen, P., Sillanpää, M., Nousiainen, L., Melén, K., and Julkunen, I. (2013). Hepatitis C virus NS2 protease inhibits host cell antiviral response by inhibiting IKK $\epsilon$  and TBK1 functions. *J. Med. Virol.* *85*, 71–82.

Kerr, P.J., Liu, J., Cattadori, I., Ghedin, E., Read, A.F., and Holmes, E.C. (2015). Myxoma virus and the Leporipoxviruses: an evolutionary paradigm. *Viruses* *7*, 1020–1061.

Khromykh, A.A., Meka, H., Guyatt, K.J., and Westaway, E.G. (2001). Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication. *J. Virol.* *75*, 6719–6728.

Kim, H.M., Park, B.S., Kim, J.-I., Kim, S.E., Lee, J., Oh, S.C., Enkhbayar, P., Matsushima, N., Lee, H., Yoo, O.J., et al. (2007). Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran. *Cell* *130*, 906–917.

Kim, S.Y., Zhao, J., Liu, X., Fraser, K., Lin, L., Zhang, X., Zhang, F., Dordick, J.S., and Linhardt, R.J. (2017). Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry (Mosc.)* *56*, 1151–1162.

Kirkegaard, K., and Baltimore, D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* *47*, 433–443.

Klein, D.E., Choi, J.L., and Harrison, S.C. (2013). Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion Intermediate. *J. Virol.* *87*, 2287–2293.

Kostyuchenko, V.A., Lim, E.X.Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T.-S., Ooi, J.S.G., Shi, J., and Lok, S.-M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* *533*, 425–428.

Kraemer, M.U., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A.Q., Shearer, F.M., Barker, C.M., Moore, C.G., Carvalho, R.G., Coelho, G.E., Bortel, W.V., et al. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *ELife* *4*, e08347.

Krejchich-Trotot, P., Gay, B., Li-Pat-Yuen, G., Hoarau, J.-J., Jaffar-Bandjee, M.-C., Briant, L., Gasque, P., and Denizot, M. (2011). Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virol. J.* *8*, 432.

Kumar, A., Yang, Y.L., Flati, V., Der, S., Kadereit, S., Deb, A., Haque, J., Reis, L., Weissmann, C., and Williams, B.R. (1997). Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB. *EMBO J.* *16*, 406–416.

Kumthip, K., Chusri, P., Jilg, N., Zhao, L., Fusco, D.N., Zhao, H., Goto, K., Cheng, D., Schaefer, E.A., Zhang, L., et al. (2012). Hepatitis C virus NS5A disrupts STAT1 phosphorylation and suppresses type I interferon signaling. *J. Virol.* *86*, 8581–8591.

Larocca, R.A., Abbink, P., Peron, J.P.S., Zanotto, P.M. de A., Iampietro, M.J., Badamchi-Zadeh, A., Boyd, M., Ng'ang'a, D., Kirilova, M., Nityanandam, R., et al. (2016). Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature* *536*, 474–478.

Laurent-Rolle, M., Boer, E.F., Lubick, K.J., Wolfinbarger, J.B., Carmody, A.B., Rockx, B., Liu, W., Ashour, J., Shupert, W.L., Holbrook, M.R., et al. (2010). The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J. Virol.* *84*, 3503–3515.

Laurent-Rolle, M., Morrison, J., Rajsbaum, R., Macleod, J.M.L., Pisanelli, G., Pham, A., Ayllon, J., Miorin, L., Martinez, C., tenOever, B.R., et al. (2014). The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I interferon. *Cell Host Microbe* *16*, 314–327.

Lazear, H.M., Govero, J., Smith, A.M., Platt, D.J., Fernandez, E., Miner, J.J., and Diamond, M.S. (2016). A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* *19*, 720–730.

Lee, C.-J., Lin, H.-R., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2008). Cholesterol Effectively Blocks Entry of Flavivirus. *J. Virol.* *82*, 6470–6480.

Lee, E., Wright, P.J., Davidson, A., and Lobigs, M. (2006). Virulence attenuation of Dengue virus due to augmented glycosaminoglycan-binding affinity and restriction in extraneural dissemination. *J. Gen. Virol.* *87*, 2791–2801.

Li, C., Deng, Y.-Q., Wang, S., Ma, F., Aliyari, R., Huang, X.-Y., Zhang, N.-N., Watanabe, M., Dong, H.-L., Liu, P., et al. (2017). 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model. *Immunity* *46*, 446–456.

Li, J.-K., Liang, J.-J., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2012). Autophagy is involved in the early step of Japanese encephalitis virus infection. *Microbes Infect.* *14*, 159–168.

Li, K., Chen, Z., Kato, N., Gale, M., and Lemon, S.M. (2005). Distinct Poly(I-C) and Virus-activated Signaling Pathways Leading to Interferon- $\beta$  Production in Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *280*, 16739–16747.

Li, X.-F., Dong, H.-L., Wang, H.-J., Huang, X.-Y., Qiu, Y.-F., Ji, X., Ye, Q., Li, C., Liu, Y., Deng, Y.-Q., et al. (2018). Development of a chimeric Zika vaccine using a licensed live-attenuated flavivirus vaccine as backbone. *Nat. Commun.* *9*.

Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S.-S., Lee, S.-A., Ge, J., Wang, S., Goldman, S.A., Zlokovic, B.V., et al. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* *19*, 663–671.

Lin, R.-J., Chang, B.-L., Yu, H.-P., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2006). Blocking of interferon-induced Jak-Stat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase-mediated mechanism. *J. Virol.* *80*, 5908–5918.

- Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (1997). trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J. Virol.* *71*, 9608–9617.
- Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.* *73*, 4611–4621.
- Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., and Davies, D.R. (2008). Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* *320*, 379–381.
- Liu, S., Cai, X., Wu, J., Cong, Q., Chen, X., Li, T., Du, F., Ren, J., Wu, Y.-T., Grishin, N.V., et al. (2015). Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* *347*, aaa2630.
- Liu, Z.-Y., Li, X.-F., Jiang, T., Deng, Y.-Q., Ye, Q., Zhao, H., Yu, J.-Y., and Qin, C.-F. (2016). Viral RNA switch mediates the dynamic control of flavivirus replicase recruitment by genome cyclization. *ELife* *5*.
- Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* *34*, 680–692.
- Ma, D., Jiang, D., Qing, M., Weidner, J.M., Qu, X., Guo, H., Chang, J., Gu, B., Shi, P.-Y., Block, T.M., et al. (2009). Antiviral Effect of Interferon lambda against West Nile Virus. *Antiviral Res.* *83*, 53–60.
- Manangeeswaran, M., Ireland, D.D.C., and Verthelyi, D. (2016). Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. *PLOS Pathog.* *12*, e1006004.
- Manche, L., Green, S.R., Schmedt, C., and Mathews, M.B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 5238–5248.
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E.Z., Tan, H.C., Sessions, O.M., Ward, A.M., Gubler, D.J., et al. (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science* *350*, 217–221.
- Mansuy, J.M., Pasquier, C., Daudin, M., Chapuy-Regaud, S., Moinard, N., Chevreau, C., Izopet, J., Mengelle, C., and Bujan, L. (2016). Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. *Lancet Infect. Dis.* *16*, 894–895.
- Mateo, R., Nagamine, C.M., Spagnolo, J., Méndez, E., Rahe, M., Gale, M., Jr, Yuan, J., and Kirkegaard, K. (2013). Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *J. Virol.* *87*, 1312–1321.
- Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., and Seya, T. (2002). Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *293*, 1364–1369.
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., and Seya, T. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells.

J. Immunol. Baltim. Md 1950 *171*, 3154–3162.

Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., and Amara, A. (2012). The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* *12*, 544–557.

Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., Le Charpentier, T., Hafirassou, M.L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V.-M., et al. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* *18*, 324–333.

Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* *437*, 1167.

Miner, J.J., and Diamond, M.S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* *21*, 134–142.

Modhiran, N., Watterson, D., Muller, D.A., Panetta, A.K., Sester, D.P., Liu, L., Hume, D.A., Stacey, K.J., and Young, P.R. (2015). Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci. Transl. Med.* *7*, 304ra142.

Modhiran, N., Watterson, D., Blumenthal, A., Baxter, A.G., Young, P.R., and Stacey, K.J. (2017). Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunol. Cell Biol.* *95*, 491–495.

Monel, B., Compton, A.A., Bruel, T., Amraoui, S., Burlaud-Gaillard, J., Roy, N., Guivel-Benhassine, F., Porrot, F., Génin, P., Meertens, L., et al. (2017). Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *EMBO J.* *36*, 1653–1668.

Moon, S.L., Dodd, B.J.T., Brackney, D.E., Wilusz, C.J., Ebel, G.D., and Wilusz, J. (2015). Flavivirus sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery. *Virology* *485*, 322–329.

Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., et al. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* *139*, 1268–1278.

Morran, L.T., Schmidt, O.G., Gelarden, I.A., Parrish, R.C., and Lively, C.M. (2011). Running with the Red Queen: Host-parasite coevolution selects for biparental sex. *Science* *333*, 216–218.

Muñoz-Jordán, J.L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W.I., and García-Sastre, A. (2005). Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *J. Virol.* *79*, 8004–8013.

Mura, M., Combredet, C., Najburg, V., Sanchez David, R.Y., Tangy, F., and Komarova, A.V. (2017). Nonencapsidated 5' Copy-Back Defective Interfering Genomes Produced by Recombinant Measles Viruses Are Recognized by RIG-I and LGP2 but Not MDA5. *J. Virol.*

Murray, K.O., Gorchakov, R., Carlson, A.R., Berry, R., Lai, L., Natrajan, M., Garcia, M.N., Correa, A., Patel, S.M., Aagaard, K., et al. (2017). Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 99–101.

Mutso, M., Saul, S., Rausalu, K., Susova, O., Žusinaite, E., Mahalingam, S., and Merits, A. (2017). Reverse genetic system, genetically stable reporter viruses and packaged subgenomic replicon based on a Brazilian Zika virus isolate. *J. Gen. Virol.* 98, 2712–2724.

Nachman, M.W., and Crowell, S.L. (2000). Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* 156, 297–304.

Nakaya, T., Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Suemori, H., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2001). Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 1150–1156.

Nanduri, S., Carpick, B.W., Yang, Y., Williams, B.R., and Qin, J. (1998). Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *EMBO J.* 17, 5458–5465.

Ng, M., Ndungo, E., Kaczmarek, M.E., Herbert, A.S., Binger, T., Kuehne, A.I., Jangra, R.K., Hawkins, J.A., Gifford, R.J., Biswas, R., et al. (2015). Filovirus receptor NPC1 contributes to species-specific patterns of ebolavirus susceptibility in bats. *ELife* 4, e11785.

Nishiya, T., Kajita, E., Miwa, S., and Defranco, A.L. (2005). TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 280, 37107–37117.

Noisakran, S., Dechtawewat, T., Avirutnan, P., Kinoshita, T., Siripanyaphinyo, U., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Malasit, P., and Sittisombut, N. (2008). Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. *J. Gen. Virol.* 89, 2492–2500.

Noyce, R.S., Taylor, K., Ciechonska, M., Collins, S.E., Duncan, R., and Mossman, K.L. (2011). Membrane Perturbation Elicits an IRF3-Dependent, Interferon-Independent Antiviral Response. *J. Virol.* 85, 10926–10931.

Offerdahl, D.K., Dorward, D.W., Hansen, B.T., and Bloom, M.E. (2017). Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. *Virology* 501, 54–62.

Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K., and Shimizu, T. (2015). Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* 520, 702–705.

Onorati, M., Li, Z., Liu, F., Sousa, A.M.M., Nakagawa, N., Li, M., Dell’Anno, M.T., Gulden, F.O., Pochareddy, S., Tebbenkamp, A.T.N., et al. (2016). Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. *Cell Rep.* 16, 2576–2592.

- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., and Seya, T. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat. Immunol.* *4*, 161–167.
- Osuna, C.E., Lim, S.-Y., Deleage, C., Griffin, B.D., Stein, D., Schroeder, L.T., Orange, R., Best, K., Luo, M., Hraber, P.T., et al. (2016). Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. *Nat. Med.* *22*, 1448.
- Paladino, P., Cummings, D.T., Noyce, R.S., and Mossman, K.L. (2006). The IFN-Independent Response to Virus Particle Entry Provides a First Line of Antiviral Defense That Is Independent of TLRs and Retinoic Acid-Inducible Gene I. *J. Immunol.* *177*, 8008–8016.
- Palchetti, S., Starace, D., De Cesaris, P., Filippini, A., Ziparo, E., and Riccioli, A. (2015). Transfected Poly(I:C) Activates Different dsRNA Receptors, Leading to Apoptosis or Immunoadjuvant Response in Androgen-independent Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *290*, 5470–5483.
- Panayiotou, C., Lindqvist, R., Kurhade, C., Vonderstein, K., Pasto, J., Edlund, K., Upadhyay, A.S., and Överby, A.K. (2018). Viperin restricts Zika virus and tick-borne encephalitis virus replication by targeting NS3 for proteasomal degradation. *J. Virol.*
- Pardi, N., Hogan, M.J., Pelc, R.S., Muramatsu, H., Andersen, H., DeMaso, C.R., Dowd, K.A., Sutherland, L.L., Scarce, R.M., Parks, R., et al. (2017). Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* *543*, 248–251.
- Patel, R.C., and Sen, G.C. (1998). Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 7009–7019.
- Paul, A.M., Acharya, D., Duty, L., Thompson, E.A., Le, L., Stokic, D.S., Leis, A.A., and Bai, F. (2017). Osteopontin facilitates West Nile virus neuroinvasion via neutrophil “Trojan horse” transport. *Sci. Rep.* *7*, 4722.
- Pfeiffer, J.K., and Kirkegaard, K. (2003). A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7289–7294.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., and Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* *314*, 997–1001.
- Pippig, D.A., Hellmuth, J.C., Cui, S., Kirchhofer, A., Lammens, K., Lammens, A., Schmidt, A., Rothenfusser, S., and Hopfner, K.-P. (2009). The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res.* *37*, 2014–2025.
- Plevka, P., Battisti, A.J., Junjhon, J., Winkler, D.C., Holdaway, H.A., Keelapang, P., Sittisombut, N., Kuhn, R.J., Steven, A.C., and Rossmann, M.G. (2011). Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. *EMBO Rep.* *12*, 602–606.

- Poirier, E.Z., Mounce, B.C., Rozen-Gagnon, K., Hooikaas, P.J., Stapleford, K.A., Moratorio, G., and Vignuzzi, M. (2016). Low-Fidelity Polymerases of Alphaviruses Recombine at Higher Rates To Overproduce Defective Interfering Particles. *J. Virol.* *90*, 2446–2454.
- Prescott, J., Hall, P., Acuna-Retamar, M., Ye, C., Wathélet, M.G., Ebihara, H., Feldmann, H., and Hjelle, B. (2010). New World hantaviruses activate IFN $\lambda$  production in type I IFN-deficient vero E6 cells. *PLoS One* *5*, e11159.
- Pulendran, B., and Maddur, M.S. (2015). Innate Immune Sensing and Response to Influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *386*, 23–71.
- Ramos, H.J., Lanteri, M.C., Blahnik, G., Negash, A., Suthar, M.S., Brassil, M.M., Sodhi, K., Treuting, P.M., Busch, M.P., Norris, P.J., et al. (2012). IL-1 $\beta$  Signaling Promotes CNS-Intrinsic Immune Control of West Nile Virus Infection. *PLoS Pathog.* *8*.
- Reid, D.W., Campos, R.K., Child, J.R., Zheng, T., Chan, K.W.K., Bradrick, S.S., Vasudevan, S.G., Garcia-Blanco, M.A., and Nicchitta, C.V. (2018). Dengue virus selectively annexes endoplasmic reticulum-associated translation machinery as a strategy for co-opting host cell protein synthesis. *J. Virol.*
- Retallack, H., Di Lullo, E., Arias, C., Knopp, K.A., Laurie, M.T., Sandoval-Espinosa, C., Mancía Leon, W.R., Krencik, R., Ullian, E.M., Spatazza, J., et al. (2016). Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 14408–14413.
- Rey, F.A., Stiasny, K., and Heinz, F.X. (2017). Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. *Curr. Opin. Virol.* *24*, 132–139.
- Rey, F.A., Stiasny, K., Vaney, M.-C., Dellarole, M., and Heinz, F.X. (2018). The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Rep.* *19*, 206–224.
- Richner, J.M., Himansu, S., Dowd, K.A., Butler, S.L., Salazar, V., Fox, J.M., Julander, J.G., Tang, W.W., Shresta, S., Pierson, T.C., et al. (2017a). Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell* *168*, 1114–1125.e10.
- Richner, J.M., Jagger, B.W., Shan, C., Fontes, C.R., Dowd, K.A., Cao, B., Himansu, S., Caine, E.A., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., et al. (2017b). Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. *Cell* *170*, 273–283.e12.
- Roberts, S.A., Lawrence, M.S., Klimczak, L.J., Grimm, S.A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G.V., Carter, S.L., Saksena, G., et al. (2013). An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat. Genet.* *45*, 970–976.
- Roby, J.A., Setoh, Y.X., Hall, R.A., and Khromykh, A.A. (2015). Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* *96*, 1551–1569.
- Rodero, M.P., and Crow, Y.J. (2016). Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: The type I interferonopathies, a conceptual overview. *J. Exp. Med.* *213*, 2527–2538.

Rothman, A.L. (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 532–543.

Rozen-Gagnon, K., Stapleford, K.A., Mongelli, V., Blanc, H., Failloux, A.-B., Saleh, M.-C., and Vignuzzi, M. (2014). Alphavirus Mutator Variants Present Host-Specific Defects and Attenuation in Mammalian and Insect Models. *PLoS Pathog* *10*, e1003877.

Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.-M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., and Gale, M. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 582–587.

Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Jr, M.G. (2008). Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* *454*, 523–527.

Samuel, M.A., Whitby, K., Keller, B.C., Marri, A., Barchet, W., Williams, B.R.G., Silverman, R.H., Gale, M., and Diamond, M.S. (2006). PKR and RNase L Contribute to Protection against Lethal West Nile Virus Infection by Controlling Early Viral Spread in the Periphery and Replication in Neurons. *J. Virol.* *80*, 7009–7019.

Sanjuán, R., and Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 4433–4448.

Sariol, C.A., Nogueira, M.L., and Vasilakis, N. (2017). A Tale of Two Viruses: Does Heterologous Flavivirus Immunity Enhance Zika Disease? *Trends Microbiol.*

Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S., and Takeuchi, O. (2010). LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 1512–1517.

Savidis, G., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Meraner, P., Guo, Z., Green, S., and Brass, A.L. (2016). The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. *Cell Rep.* *15*, 2323–2330.

van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Waarts, B.-L., van der Ende-Metselaar, H., Kuhn, R.J., Wilschut, J., Zhuang, X., and Smit, J.M. (2007). Characterization of the Early Events in Dengue Virus Cell Entry by Biochemical Assays and Single-Virus Tracking. *J. Virol.* *81*, 12019–12028.

Scherbik, S.V., Paranjape, J.M., Stockman, B.M., Silverman, R.H., and Brinton, M.A. (2006). RNase L plays a role in the antiviral response to West Nile virus. *J. Virol.* *80*, 2987–2999.

Schneider, W.L., and Roossinck, M.J. (2001). Genetic Diversity in RNA Virus Quasispecies Is Controlled by Host-Virus Interactions. *J. Virol.* *75*, 6566–6571.

Schnell, G., Loo, Y.-M., Marcotrigiano, J., and Jr, M.G. (2012). Uridine Composition of the Poly-U/UC Tract of HCV RNA Defines Non-Self Recognition by RIG-I. *PLOS Pathog.* *8*, e1002839.

Schnettler, E., Sterken, M.G., Leung, J.Y., Metz, S.W., Geertsema, C., Goldbach, R.W., Vlak,

- J.M., Kohl, A., Khromykh, A.A., and Pijlman, G.P. (2012). Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells. *J. Virol.* 86, 13486–13500.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse array of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481–485.
- Schuler-Faccini, L. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65.
- Sellier, C., Campanari, M.-L., Julie Corbier, C., Gaucherot, A., Kolb-Cheynel, I., Oulad-Abdelghani, M., Ruffenach, F., Page, A., Ciura, S., Kabashi, E., et al. (2016). Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *EMBO J.* 35, 1276–1297.
- Shan, C., Xie, X., Muruato, A.E., Rossi, S.L., Roundy, C.M., Azar, S.R., Yang, Y., Tesh, R.B., Bourne, N., Barrett, A.D., et al. (2016). An Infectious cDNA Clone of Zika Virus to Study Viral Virulence, Mosquito Transmission, and Antiviral Inhibitors. *Cell Host Microbe* 19, 891–900.
- Shan, C., Muruato, A.E., Nunes, B.T.D., Luo, H., Xie, X., Medeiros, D.B.A., Wakamiya, M., Tesh, R.B., Barrett, A.D., Wang, T., et al. (2017a). A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nat. Med.* 23, 763–767.
- Shan, C., Muruato, A.E., Jagger, B.W., Richner, J., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., Xie, X., Nunes, J.G.C., Morabito, K.M., Kong, W.-P., et al. (2017b). A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. *Nat. Commun.* 8, 676.
- Shen, J., Devery, J.M., and King, N.J. (1995). Adherence status regulates the primary cellular activation responses to the flavivirus West Nile. *Immunology* 84, 254–264.
- Shulla, A., and Randall, G. (2015). Spatiotemporal Analysis of Hepatitis C Virus Infection. *PLOS Pathog.* 11, e1004758.
- Simanjuntak, Y., Liang, J.-J., Chen, S.-Y., Li, J.-K., Lee, Y.-L., Wu, H.-C., and Lin, Y.-L. (2018). Ebselen alleviates testicular pathology in mice with Zika virus infection and prevents its sexual transmission. *PLoS Pathog.* 14.
- Simoni, M.K., Jurado, K.A., Abrahams, V.M., Fikrig, E., and Guller, S. (2017). Zika Virus Infection of Hofbauer Cells. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* 1989 77.
- Skums, P., Bunimovich, L., and Khudyakov, Y. (2015). Antigenic cooperation among intrahost HCV variants organized into a complex network of cross-immunoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 6653–6658.
- Soto-Acosta, R., Mosso, C., Cervantes-Salazar, M., Puerta-Guardo, H., Medina, F., Favari, L., Ludert, J.E., and del Angel, R.M. (2013). The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology* 442, 132–147.

- Sousa, I.P., Carvalho, C.A.M., Ferreira, D.F., Weissmüller, G., Rocha, G.M., Silva, J.L., and Gomes, A.M.O. (2011). Envelope Lipid-packing as a Critical Factor for the Biological Activity and Stability of Alphavirus Particles Isolated from Mammalian and Mosquito Cells. *J. Biol. Chem.* 286, 1730–1736.
- Stiasny, K., Kiermayr, S., Bernhart, A., and Heinz, F.X. (2013). The Membrane-Proximal “Stem” Region Increases the Stability of the Flavivirus E Protein Postfusion Trimer and Modulates Its Structure. *J. Virol.* 87, 9933–9938.
- Sumpter, R., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., and Gale, M. (2005). Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *J. Virol.* 79, 2689–2699.
- Swiecki, M., and Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 471–485.
- Szretter, K.J., Brien, J.D., Thackray, L.B., Virgin, H.W., Cresswell, P., and Diamond, M.S. (2011). The Interferon-Inducible Gene viperin Restricts West Nile Virus Pathogenesis. *J. Virol.* 85, 11557–11566.
- Tabata, T., Petitt, M., Puerta-Guardo, H., Michlmayr, D., Wang, C., Fang-Hoover, J., Harris, E., and Pereira, L. (2016). Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* 20, 155–166.
- Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M., and Chisari, F.V. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 7431–7436.
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., and Taniguchi, T. (2008). The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 535–584.
- Tan, C.H., Wong, P.J., Li, M.I., Yang, H., Ng, L.C., and O’Neill, S.L. (2017). wMel limits zika and chikungunya virus infection in a Singapore Wolbachia-introgressed *Ae. aegypti* strain, wMel-Sg. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005496.
- Tanaka, Y., and Chen, Z.J. (2012). STING Specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the Cytosolic DNA Signaling Pathway. *Sci. Signal.* 5, ra20.
- Tang, W.W., Young, M.P., Mamidi, A., Regla-Nava, J.A., Kim, K., and Shresta, S. (2016). A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. *Cell Rep.* 17, 3091–3098.
- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., and Shimizu, T. (2013). Structural Reorganization of the Toll-Like Receptor 8 Dimer Induced by Agonistic Ligands. *Science* 339, 1426–1429.
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., et al. (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 823–829.

Taylor, S.S., Haste, N.M., and Ghosh, G. (2005). PKR and eIF2 $\alpha$ : integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* 122, 823–825.

Thaiss, C.A., Zmora, N., Levy, M., and Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature* 535, 65–74.

Thomas, D.D., Donnelly, C.A., Wood, R.J., and Alphey, L.S. (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* 287, 2474–2476.

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., and Aunins, J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768–774.

Tisoncik, J.R., Korth, M.J., Simmons, C.P., Farrar, J., Martin, T.R., and Katze, M.G. (2012). Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 76, 16–32.

Toscano, F., Estornes, Y., Virard, F., Garcia-Cattaneo, A., Pierrot, A., Vanbervliet, B., Bonnin, M., Ciancanelli, M.J., Zhang, S.-Y., Funami, K., et al. (2013). Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 190, 764–773.

Tsetsarkin, K.A., Kenney, H., Chen, R., Liu, G., Manukyan, H., Whitehead, S.S., Laassri, M., Chumakov, K., and Pletnev, A.G. (2016). A Full-Length Infectious cDNA Clone of Zika Virus from the 2015 Epidemic in Brazil as a Genetic Platform for Studies of Virus-Host Interactions and Vaccine Development. *MBio* 7, e01114-16.

Twiddy, S.S., and Holmes, E.C. (2003). The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J. Gen. Virol.* 84, 429–440.

Vaure, C., and Liu, Y. (2014). A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Front. Immunol.* 5.

Venkataraman, T., Valdes, M., Elsbey, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., and Barber, G.N. (2007). Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 6444–6455.

Vonderstein, K., Nilsson, E., Hubel, P., Skalman, L.N., Upadhyay, A., Pasto, J., Pichlmair, A., Lundmark, R., and Överby, A.K. (2017). Viperin targets flavivirus virulence by inducing assembly of non-infectious capsid particles. *J. Virol.* JVI.01751-17.

Vorou, R. (2016). Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *Int. J. Infect. Dis.* 48, 85–90.

Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J.F., Fikrig, E., and Flavell, R.A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* 10, 1366–1373.

- Wang, W., Li, G., De Wu, Luo, Z., Pan, P., Tian, M., Wang, Y., Xiao, F., Li, A., Wu, K., et al. (2018). Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 $\beta$  secretion. *Nat. Commun.* *9*.
- Wang, Y., Li, J., Wang, X., Ye, L., Zhou, Y., Thomas, R.M., and Ho, W. (2014). Hepatitis C virus impairs TLR3 signaling and inhibits IFN- $\lambda$  1 expression in human hepatoma cell line. *Innate Immun.* *20*, 3–11.
- Weber, M., Gawanbacht, A., Habjan, M., Rang, A., Borner, C., Schmidt, A.M., Veitinger, S., Jacob, R., Devignot, S., Kochs, G., et al. (2013). Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and anti-viral signaling. *Cell Host Microbe* *13*, 336–346.
- Webster, B., Assil, S., and Dreux, M. (2016). Cell-Cell Sensing of Viral Infection by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Virol.* *90*, 10050–10053.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K.E., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* *5*, 365–375.
- Werme, K., Wigerius, M., and Johansson, M. (2008). Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cell. Microbiol.* *10*, 696–712.
- West, S.A., Griffin, A.S., and Gardner, A. (2007). Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. *J. Evol. Biol.* *20*, 415–432.
- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V.V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., et al. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* *333*, 228–233.
- Wilson, J.R., de Sessions, P.F., Leon, M.A., and Scholle, F. (2008). West Nile Virus Nonstructural Protein 1 Inhibits TLR3 Signal Transduction. *J. Virol.* *82*, 8262–8271.
- Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., Yang, H., and Cui, J. (2017). Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discov.* *3*, 17006.
- Wu, Y.-W., Mettling, C., Wu, S.-R., Yu, C.-Y., Perng, G.-C., Lin, Y.-S., and Lin, Y.-L. (2016). Autophagy-associated dengue vesicles promote viral transmission avoiding antibody neutralization. *Sci. Rep.* *6*.
- Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A.E., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., Zou, J., Xie, X., Giraldo, M.I., Vasconcelos, P.F.C., et al. (2018). An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat. Commun.* *9*.
- Xiao, Y., Rouzine, I.M., Bianco, S., Acevedo, A., Goldstein, E.F., Farkov, M., Brodsky, L., and Andino, R. (2016). RNA recombination enhances adaptability and is required for virus spread and virulence. *Cell Host Microbe* *19*, 493–503.

Xie, X., Zhang, D., Zhao, B., Lu, M.-K., You, M., Condorelli, G., Wang, C.-Y., and Guan, K.-L. (2011). IkappaB kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 6474–6479.

Xie, X., Zou, J., Puttikhunt, C., Yuan, Z., and Shi, P.-Y. (2015). Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. *J. Virol.* *89*, 1298–1313.

Xue, K.S., Hooper, K.A., Ollodart, A.R., Dingens, A.S., and Bloom, J.D. (2016). Cooperation between distinct viral variants promotes growth of H3N2 influenza in cell culture. *ELife* *5*, e13974.

Yockey, L.J., Jurado, K.A., Arora, N., Millet, A., Rakib, T., Milano, K.M., Hastings, A.K., Fikrig, E., Kong, Y., Horvath, T.L., et al. (2018). Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci. Immunol.* *3*, eaao1680.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* *5*, 730.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., et al. (2005). Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J. Immunol.* *175*, 2851–2858.

Youn, S., Li, T., McCune, B.T., Edeling, M.A., Fremont, D.H., Cristea, I.M., and Diamond, M.S. (2012). Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. *J. Virol.* *86*, 7360–7371.

Yu, C.-Y., Liang, J.-J., Li, J.-K., Lee, Y.-L., Chang, B.-L., Su, C.-I., Huang, W.-J., Lai, M.M.C., and Lin, Y.-L. (2015). Dengue Virus Impairs Mitochondrial Fusion by Cleaving Mitofusins. *PLOS Pathog.* *11*, e1005350.

Yuan, L., Huang, X.-Y., Liu, Z.-Y., Zhang, F., Zhu, X.-L., Yu, J.-Y., Ji, X., Xu, Y.-P., Li, G., Li, C., et al. (2017). A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* *358*, 933–936.

Zhang, Q., Sun, K., Chinazzi, M., Piontti, A.P., Dean, N.E., Rojas, D.P., Merler, S., Mistry, D., Poletti, P., Rossi, L., et al. (2017). Spread of Zika virus in the Americas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E4334–E4343.

Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Krayukhina, E., Taoka, M., Yamauchi, Y., Tanji, H., Isobe, T., Uchiyama, S., Miyake, K., et al. (2016). Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity* *45*, 737–748.

Zhu, X., He, Z., Yuan, J., Wen, W., Huang, X., Hu, Y., Lin, C., Pan, J., Li, R., Deng, H., et al. (2015). IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cell. Microbiol.* *17*, 105–118.

Zmurko, J., Neyts, J., and Dallmeier, K. (2015). Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. *Rev. Med. Virol.* 25, 205–223.

Zou, J., Xie, X., Wang, Q.-Y., Dong, H., Lee, M.Y., Kang, C., Yuan, Z., and Shi, P.-Y. (2015). Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. *J. Virol.* 89, 3455–3470.