



**HAL**  
open science

# Etude du neurotropisme de deux arbovirus émergents : les virus Zika et Usutu

Marion Clé

► **To cite this version:**

Marion Clé. Etude du neurotropisme de deux arbovirus émergents : les virus Zika et Usutu. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT024 . tel-03144087

**HAL Id: tel-03144087**

**<https://theses.hal.science/tel-03144087v1>**

Submitted on 17 Feb 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale n°168 - Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche Pathogénèse et Contrôle des Infections Chroniques (PCCI) - UMR1058

## Etude du neurotropisme de deux arbovirus émergents : les virus Zika et Usutu

Présentée par Marion CLÉ  
Le 29 octobre 2020

Sous la direction de Sara SALINAS  
et de Yannick SIMONIN

Devant le jury composé de

Daniel DUNIA, Directeur de recherche, INSERM U1043

Nicolas LÉVÊQUE, PU-PH, CHU de Poitiers

Isabelle LEPARC-GOFFART, Directrice du centre national de référence des arbovirus, IRBA

André CABIÉ, PU-PH, CHU de Martinique

Laurent GIVALOIS, Chargé de recherche, CNRS

Sara SALINAS, Chargée de recherche, INSERM U1058

Yannick SIMONIN, Maître de conférence, INSERM U1058 / Université de Montpellier

Président du jury

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Invité

Directrice de thèse

Co-Directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

*A mon papy,*

*A ma famille,*

# Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Nicolas Lévêque et le Docteur Daniel Dunia pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse et d'avoir pris le temps de le lire. Je remercie également les autres membres de mon jury de thèse, le Docteur Isabelle Leparc-Goffart et le Professeur André Cabié d'avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse et qui ont eu l'énergie de juger mon travail. Merci au Docteur Laurent Givalois d'avoir accepté de participer en qualité de membre invité à ce jury. Enfin, je remercie le Docteur François Rassendren et le Docteur Lucile Espert pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse au cours de ces 3 ans. Vous avez pris le temps de suivre mon travail et vous m'avez tous les deux permis de me poser de nouvelles questions et de voir les choses différemment.

Je remercie mes directeurs de thèse, Yannick et Sara, pour m'avoir accueilli dans leur équipe alors que j'avais tout à apprendre. Merci de la confiance que vous m'avez accordé. Merci d'avoir supporté mes sauts d'humeur, mon stress, mes questions, je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie également, le Professeur Philippe Van de Perre de m'avoir accueilli au sein du laboratoire qu'il dirige ainsi que le Docteur Jean Pierre Molès pour ses conseils et ses discussions concernant le travail, la vie personnelle et surtout le rugby.

Bien sûr, cet apprentissage c'est fait avec et grâce aux personnes passées et présentes de l'équipe NERVE. John et Chloé, merci d'avoir été là pour m'apprendre à tenir une pipette et à travailler en P2. John, je me souviendrais du nombre de fois que je t'ai appelé pour te montrer des contaminations qui n'existaient pas, mes journées au P2 ont été bien moins longues en ta compagnie. Merci pour tes coups de pouce.

Merci à tous les membres qui ont participé à mon travail et qui m'ont appris tout un panel de techniques qui m'ont permis de réaliser ce projet en particulier Caroline (mais aussi le personnel du laboratoire « BC2M »), Karine, Jean-Marie, Sébastien, Marie-France, Marine, Nicola ainsi que tous les membres de l'Unité U1058 pour votre bonne humeur et les moments partagés. Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien du Labex

EpiGenMed, qui m'a permis, grâce à une bourse de recherche, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Je n'oublierai pas non plus de remercier mes collègues du bureau 1B07 devenues maintenant mes amies. Audrey, plus qu'une thésarde, une maman poule. Une fin de thèse à deux, c'est toujours plus cool, merci de m'avoir supporté, de m'avoir épaulé, d'avoir refait le monde avec moi et surtout si tu dois garder un mot, n'oublies pas : BDQ ! Constance, plus qu'une thésarde, une correctrice. Je te remercie d'avoir pris le temps de relire mon manuscrit, mes abstracts, mes posters, mes papiers et j'en passe. Nos apéros saucisson/chorizo à toute heure resteront notre rituel. Mélusine, plus qu'une thésarde, une pro de la PCR. Merci pour le temps que tu as passé à m'apprendre cette technique et tout qui s'en suit. Oriane, je te souhaite tout le meilleur pour la suite et surtout plein de courage. Jacqueline, nos discussions scientifiques mais pas que, ont été très enrichissantes, merci d'avoir été là pour moi.

Merci à mes amies, Amel pour ton soutien sans faille et toutes tes anecdotes, tu as su être présente dans les bons comme dans les mauvais moments. A toutes mes copines du rugby et plus particulièrement à Steph, Mini, Marie et Laura pour m'avoir soutenu, m'avoir aidé et aiguillé dans les moments compliqués et pour tous ces moments d'évasion.

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans une énorme pensée à mes grands-parents, mes parents, mes sœurs, mes nièces et mon neveu qui m'ont permis de devenir ce que je suis aujourd'hui et ceux sans qui rien de tout ça ne serait arrivé. Merci particulièrement à Cyril de m'avoir supporté, aidé et aimé durant ces 3 ans, ça n'a pas été simple tous les jours mais on y est arrivé. Enfin un énorme merci à ma correctrice des fautes d'orthographe de cette thèse : ma grand-mère. Sa présence et ses encouragements ont été pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis. Encore MERCI à vous, je vous aime !

# Liste du contenu

Remerciements	- 2 -
Liste du contenu	- 4 -
Résumé	- 7 -
Abstract	- 8 -
Liste des figures	- 9 -
Liste des tables	- 10 -
Liste des publications	- 11 -
Abréviations	- 13 -

## **CHAPITRE I. ETAT DE L'ART** **17**

---

### **I. LES VIRUS EMERGENTS** **17**

---

<b>1. DEFINITION</b>	<b>17</b>
<b>2. ARBOVIRUS</b>	<b>18</b>
<b>3. FAMILLE DES ARBOVIRUS</b>	<b>18</b>
<b>4. FAMILLE <i>FLAVIVIRIDAE</i> ET GENRE <i>FLAVIVIRUS</i></b>	<b>19</b>
A. STRUCTURE DU VIRION DES <i>FLAVIVIRUS</i>	20
B. GENOME VIRAL DES <i>FLAVIVIRUS</i>	21
C. CYCLE VIRAL	23
i. Entrée virale	24
ii. Libération de l'ARN et traduction de la polyprotéine	24
iii. Réplication	25
iv. Assemblage des particules virales	26
<b>5. MISE EN PLACE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE INNEE SUITE A L'INFECTION DES <i>FLAVIVIRUS</i></b>	<b>27</b>
<b>6. MECANISMES D'ECHAPPEMENT DES <i>FLAVIVIRUS</i> A LA REPOSE ANTIVIRALE</b>	<b>35</b>

### **II. LE VIRUS ZIKA** **40**

---

<b>1. ORIGINE</b>	<b>40</b>
<b>2. PHYLOGENIE VIRALE ET VARIATION GENETIQUE</b>	<b>40</b>
<b>3. CYCLE DE TRANSMISSION</b>	<b>41</b>
A. TRANSMISSION VECTORIELLE	41
B. TRANSMISSION PAR VOIE SEXUELLE	43
C. TRANSMISSION DE LA MERE A L'ENFANT	44
D. AUTRES MODES DE TRANSMISSION	44
<b>4. VECTEURS</b>	<b>45</b>
<b>5. RESERVOIR ANIMAL</b>	<b>46</b>
<b>6. EPIDEMIOLOGIE : DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE</b>	<b>46</b>
<b>7. MANIFESTATIONS CLINIQUES CHEZ L'HOMME</b>	<b>48</b>
A. COMPLICATIONS CHEZ L'ADULTE	48
B. COMPLICATIONS CHEZ LES FŒTUS ET LES NOUVEAU-NES	49
<b>8. DIAGNOSTIC</b>	<b>49</b>

### **III. LE VIRUS USUTU** **52**

---

<b>1. ORIGINE</b>	<b>52</b>
-------------------	-----------

<b>2. PHYLOGENIE VIRALE ET VARIATION GENETIQUE</b>	<b>52</b>
<b>3. CYCLE DE TRANSMISSION</b>	<b>54</b>
<b>4. VECTEURS</b>	<b>55</b>
<b>5. RESERVOIR ANIMAL</b>	<b>56</b>
<b>6. EPIDEMIOLOGIE : DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE</b>	<b>58</b>
<b>7. MANIFESTATIONS CLINIQUES CHEZ L'HOMME</b>	<b>59</b>
<b>8. DIAGNOSTIC</b>	<b>61</b>
<b>IV. INFECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b>	<b>63</b>
<hr/>	
<b>1. DESCRIPTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b>	<b>63</b>
<b>2. BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE</b>	<b>67</b>
A. BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : CARACTERISTIQUES	67
B. BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : ROLES	69
C. BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : PHENOTYPE	70
i. Jonctions serrées	71
ii. Jonctions adhérentes	73
D. PROCESSUS DE TRANSPORT A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	74
E. COMPOSANTS CELLULAIRES ET ACELLULAIRES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	75
i. Cellules endothéliales	75
ii. Pericytes	80
iii. Astrocytes	84
iv. Neurones	88
v. Membrane basale	89
<b>3. DIFFERENTS MECANISMES D'ACCES AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b>	<b>90</b>
A. INFECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL VIA LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	91
i. Infection par transcytose	91
ii. Infection des cellules endothéliales	92
iii. Infection par le mécanisme de cheval de Troie	92
B. INFECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL VIA LE PLEXUS CHOROÏDE	93
C. INFECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL VIA LE TRANSPORT AXONAL	94
<b>V. INFECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL PAR LES FLAVIVIRUS</b>	<b>97</b>
<hr/>	
<b>1. VIRUS DU NIL OCCIDENTAL (WNV)</b>	<b>98</b>
<b>2. VIRUS DE LA DENGUE (DENV)</b>	<b>99</b>
<b>3. VIRUS DE LA FIEVRE JAUNE (YFV)</b>	<b>100</b>
<b>4. VIRUS DE L'ENCEPHALITE JAPONAISE (JEV)</b>	<b>101</b>
<b>5. VIRUS DE L'ENCEPHALITE A TIQUES (TBEV)</b>	<b>102</b>
<b>6. VIRUS ZIKA (ZIKV)</b>	<b>102</b>
<b>7. VIRUS USUTU (USUV)</b>	<b>105</b>
<b>OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE TRAVAIL DE LA THÈSE</b>	<b>107</b>
<hr/>	
<b>CHAPITRE II. RESULTATS – ARTICLES DE RECHERCHE</b>	<b>109</b>
<hr/>	
<b>1. ARTICLE I</b>	<b>110</b>
A. BUT DE L'ETUDE	110
B. CONCLUSION	112

<b>2. ARTICLE II</b>	<b>113</b>
A. BUT DE L'ÉTUDE	113
B. CONCLUSION	114
<b>3. ARTICLE III (EN SOUMISSION)</b>	<b>115</b>
A. BUT DE L'ÉTUDE	115
B. CONCLUSION	117
<b>CHAPITRE III. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>118</b>
<hr/>	
<b>1. ACCES AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b>	<b>118</b>
A. INFECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL PAR TRANSCYTOSE OU INFECTION DIRECTE DES CELLULES ENDOTHELIALES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	118
B. INFECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET LEUCOCYTES	121
C. RESERVOIRS VIRAUX	124
D. AUTRES MECANISMES D'ACCES AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	125
<b>2. INFECTION DES CELLULES DE L'UNITE NEUROVASCULAIRE</b>	<b>125</b>
<b>3. INDUCTION DE LA NEUROINFLAMMATION</b>	<b>126</b>
<b>4. VIRULENCE</b>	<b>130</b>
<b>5. LIMITES DES MODELES</b>	<b>134</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>135</b>
<hr/>	
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>136</b>
<hr/>	
<b>ANNEXES</b>	<b>163</b>
<hr/>	



## Résumé

De nos jours, de nombreux facteurs tels que les modifications écologiques, l'augmentation des déplacements animaliers et de la densité de la population mondiale ainsi que l'amélioration des moyens de transport favorisent l'apparition des virus émergents et facilitent leur transmission. L'émergence de ces nouveaux virus illustrent le défi complexe et constant pour la santé humaine puisqu'ils peuvent être à l'origine de maladies parfois inconnues et potentiellement graves notamment neuroinvasives. C'est le cas, par exemple, avec l'émergence récente de deux virus neurotropes : Zika (ZIKV) et Usutu (USUV). ZIKV a été responsable d'épidémies principalement en Polynésie Française en 2013 et en Amérique Latine en 2015-2016, où il a été la cause chez certains patients, d'atteintes neurologiques (encéphalite, méningo-encéphalite, syndrome de Guillain-Barré, microcéphalie, etc.). USUV, quant à lui, a émergé récemment en Europe, où il a été impliqué dans une importante mortalité aviaire (principalement chez le merle noir) mais aussi dans des infections neuroinvasives chez l'Homme (encéphalite, méningo-encéphalite, etc.). Malgré cela, la pathogénèse de ces deux virus reste peu explorée. L'objectif de cette thèse était de caractériser l'effet de l'infection du ZIKV sur la structure et l'homéostasie de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ainsi que d'évaluer et de comparer la neuropathogénicité de différentes lignées d'USUV en combinant des approches *in vivo* et *in vitro*. Nos résultats suggèrent premièrement une interaction complexe entre le ZIKV et la BHE qui pourrait déclencher une inflammation locale, le recrutement de leucocytes et une éventuelle perturbation vasculaire cérébrale sur du long terme. Deuxièmement, pour USUV, nos résultats corrélaient avec les pathologies inflammatoires cérébrales engendrées chez l'Homme comme l'encéphalite. De plus, suite à l'analyse des lignées circulantes d'USUV, nos résultats suggèrent que certaines lignées d'USUV peuvent avoir une neurovirulence plus importante, notamment la lignée Europe 2. Prises ensemble, ces données permettent une meilleure caractérisation des mécanismes physiopathologiques de la neurovirulence liés à l'infection par ZIKV et USUV, et suggèrent que les symptômes causés par ces virus dépendent de plusieurs facteurs, notamment le tropisme cellulaire ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte. Pour ces raisons, il est nécessaire de s'intéresser aux biomarqueurs de la neuroinflammation dans le plasma et/ou dans le liquide céphalo-rachidien des patients infectés afin d'étudier les facteurs prédictifs ou les facteurs associés aux formes graves des infections à arbovirus dans le but de favoriser un diagnostic précoce.

Mots clés: Virus Zika, Virus Usutu, *flavivirus*, système nerveux central, neurovirulence et neurotropisme

## Abstract

Nowadays, many factors such as ecological changes, increased animal movements, world population density, and improved means of transportation are contributing to the appearance and transmission of emerging virus. The emergence of these new viruses constitutes a complex and constant challenge to human health since they can sometimes cause unknown and potentially serious disorders, particularly neuroinvasive diseases. This is the case, for example, with the recent emergence of two neurotropic viruses: Zika virus (ZIKV) and Usutu virus (USUV). ZIKV is responsible for epidemics in French Polynesia in 2013 and Latin America in 2015-2016, where it was also responsible for neurological disorders (encephalitis, meningoencephalitis, Guillain-Barré syndrome, microcephaly, and others) in some patients. USUV has recently emerged in Europe, where it has been implicated in significant avian mortality, mainly in blackbirds, but also in neuroinvasive infections in humans (encephalitis, meningoencephalitis, and others). Despite this, the pathogenesis of these two emerging viruses remains poorly explored. The objective of this thesis was to characterize the effects of ZIKV infection on the blood-brain barrier (BBB) structure and homeostasis and to evaluate and compare the neuropathogenicity of different USUV lineages by combining *in vivo* and *in vitro* approaches. Our results first suggest a complex interaction between ZIKV and the BBB that could trigger local inflammation, leukocyte recruitment, and possible long-term cerebrovascular impairment. Secondly, regarding USUV, our data suggest that the virus can reach the brain and cause massive inflammation leading to the recruitment of immune cells, which correlates with human brain inflammatory pathologies such as encephalitis. Also, following the analysis of circulating USUV lineages, our results suggest that some USUV lineages may have a higher degree of neurovirulence, notably the Europe 2 lineage. Taken together, these data allow a better characterization of the pathophysiology mechanisms of neurovirulence related to ZIKV and USUV infections, and suggest that the symptoms caused by these viruses depend on several factors, including cellular tropism as well as the host immune response. For these reasons, it is necessary to study biomarkers of neuroinflammation in the plasma and/or cerebrospinal fluid of infected patients in order to study predictive factors, or associated with severe forms of arbovirus infections to promote early diagnosis.

Key Words: Zika Virus, Usutu Virus, *flavivirus*, central nervous system, neurovirulence and neurotropism

## Liste des figures

FIGURE 1. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES VIRUS DE LA FAMILLE <i>FLAVIVIRIDAE</i> . .....	19
FIGURE 2. PARTICULES VIRALES DES <i>FLAVIVIRUS</i> . .....	21
FIGURE 3. POLYPROTEINE DES <i>FLAVIVIRUS</i> . .....	22
FIGURE 4. CYCLE VIRAL DES <i>FLAVIVIRUS</i> . .....	23
FIGURE 5. REPLICATION DU GENOME VIRAL DES <i>FLAVIVIRUS</i> . .....	26
FIGURE 6. ORGANISATION DES PROTEINES E/PRM A LA SURFACE DES PARTICULES VIRALES DES <i>FLAVIVIRUS</i> IMMATURES ET MATURES .....	27
FIGURE 7. REPONSE IMMUNITAIRE INNEE AUX VIRUS A ARN A BRIN POSITIF. ....	30
FIGURE 8. SIGNALISATION IFN DE CELLULE A CELLULE. ....	31
FIGURE 9. VOIE DE SIGNALISATION DE L'IFN. ....	32
FIGURE 10. VOIES DE SIGNALISATION 2',5' OAS, DE MX ET PKR. ....	33
FIGURE 11. VOIE DE SIGNALISATION DE L'INFLAMMASOME. ....	34
FIGURE 12. COMPETITION ENTRE L'IFIT1 ET LE FACTEUR DE TRADUCTION EIF4E POUR LES MODELES D'ARNM. ....	36
FIGURE 13. MODELE DECRIVANT LA FORMATION ET LES FONCTIONS DE L'ARN SOUS GENOMIQUE. ....	37
FIGURE 14. STRATEGIES D'EVASION DES <i>FLAVIVIRUS</i> . ....	39
FIGURE 15. CYCLE DE TRANSMISSION DU VIRUS ZIKA, CYCLE SYLVATIQUE. ....	42
FIGURE 16. CYCLE DE TRANSMISSION DU VIRUS ZIKA, CYCLE URBAIN. ....	43
FIGURE 17. DISTRIBUTION DU VIRUS ZIKA ET REGIONS A RISQUES. ....	47
FIGURE 18. METHODES DE DIAGNOSTIC DU VIRUS ZIKA CHEZ L'HOMME. ....	51
FIGURE 19. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES DU VIRUS USUTU. ....	53
FIGURE 20. CYCLE DE TRANSMISSION DU VIRUS USUTU, CYCLE ENZOOTIQUE. ....	55
FIGURE 21. DISTRIBUTION DU VIRUS USUTU DANS LE MONDE. ....	59
FIGURE 22. SYSTEME NERVEUX CENTRAL. ....	64
FIGURE 23. LES NEURONES. ....	65
FIGURE 24. LA NEVROGLIE. ....	66
FIGURE 25. LA BARRIERE HEMATO-CEREBRALE DU LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN. ....	66
FIGURE 26. L'UNITE NEUROVASCULAIRE. ....	67
FIGURE 27. ILLUSTRATION DES PREMIERES EXPERIENCES SUR LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE PAR EHRlich ET GOLDMANN. ....	68

FIGURE 28. PRINCIPE DE LA RESISTANCE TRANS-ENDOTHELIALE (TEER). .....	71
FIGURE 29. JONCTIONS SERREES ET ADHERENTES AU SEIN DES CELLULES ENDOTHELIALES.....	74
FIGURE 30. VOIES DE TRANSPORT A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE. ....	75
FIGURE 31. ZONES VULNERABLES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE. ....	77
FIGURE 32. ROLES DES PRINCIPALES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE INNÉ. ....	78
FIGURE 33. MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA MIGRATION DES CELLULES IMMUNITAIRES A TRAVERS LA BARRIERE ENDOTHELIALE. ....	80
FIGURE 34. INTERACTION DES PERICYTES ET DES CELLULES ENDOTHELIALES AU NIVEAU DES VAISSEaux SANGUINS. ....	81
FIGURE 35. LA VOIE DE SIGNALISATION PDGF-B/PDGFR-B LORS DE L'ANGIOGENESE. ....	83
FIGURE 36. ASTROCYTES ET BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE.....	86
FIGURE 37. MEMBRANES BASALES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE. ....	90
FIGURE 38. INFECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE.....	93
FIGURE 39. INFECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL PAR TRANSPORT AXONAL. ....	96
FIGURE 40. MODELE DE BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE DEVELOPPE A PARTIR DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES ISSUES DE SANG DE CORDON OMBILICAL HUMAIN. ....	111
FIGURE 41. SCHEMA RECAPITULATIF DE NOS RESULTATS OBTENUS AVEC LE VIRUS ZIKA. ....	112

## Liste des tables

TABLE 1. PRINCIPAUX <i>FLAVIVIRUS</i> ET LEURS PRINCIPALES CARACTERISTIQUES. ....	20
TABLE 2. DESCRIPTION DES CAS HUMAINS DU VIRUS USUTU A TRAVERS LE MONDE. ....	61
TABLE 3. RECAPITULATIF DES RESULTATS OBTENUS AVEC LE MODELE DE BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE <i>IN</i> <i>VITRO</i> EN CO-CULTURE. ....	119

# Liste des publications

## **Articles scientifiques**

Yannick Simonin, Nejla Erkilic, Krishna Damodar, Marion Clé, Caroline Desmetz, Karine Bolloré, Mehdi Taleb, Simona Torriano, Jonathan Barthelemy, Grégor Dubois, Anne Dominique Lajoix, Vincent Foulongne, Edouard Tuillon, Philippe Van de Perre, Vasiliki Kalatzis, and Sara Salinas. 2019. **Zika virus induces strong inflammatory responses and impairs homeostasis and function of the human retinal pigment epithelium.** *EBioMedicine*, 39, 315–331.

Marion Clé, Jonathan Barthelemy, Caroline Desmetz, Vincent Foulongne, Lina Lapeyre, Karine Bolloré, Edouard Tuillon, Nejla Erkilic, Vasiliki Kalatzis, Sylvie Lecollinet, Cécile Beck, Nelly Pirot, Yaël Glasson, Fabien Gosselet, Maria Teresa Alvarez Martinez, Philippe Van de Perre, Sara Salinas, and Yannick Simonin. 2020. **Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models.** *Plos neglected tropical diseases*, 14 (4): e0008223.

Marion Clé, Caroline Desmetz, Jonathan Barthelemy, Marie-France Martin, Oriane Constant, Ghizlane Maarifi, Vincent Foulongne, Karine Bolloré, Yaël Glasson, Frédéric De Bock, Marine Blaquiere, Lucie Dehouck, Nelly Pirot, Edouard Tuillon, Sébastien Nisole, Fatiha Najioullah, Philippe Van de Perre, André Cabié, Nicolas Marchi, Fabien Gosselet, Yannick Simonin, and Sara Salinas. 2020. **Zika virus infection promotes local inflammation, cell adhesion molecule upregulation, and leukocyte recruitment at the blood brain barrier.** *mBio*, 11:e01183-20.

Marion Clé\*, Oriane Constant\*, Jonathan Barthelemy, Caroline Desmetz, Marie-France Martin, Vincent Foulongne, Daniel Cadar, Giovanni Savini, Jonas Schmidt-Chanasit, Juan-Carlos Saiz, Sylvie Lecollinet, Cécile Beck, Lina Lapeyre, Fabien Gosselet, Philippe Van de Perre, Sara Salinas, and Yannick Simonin. 2020. **Differential neurovirulence of Usutu isolates in mice and neuronal cells.** (En soumission, *Journal of neuroinflammation*) \*co-premier auteur.

## **Revues**

Marion Clé, Sara Salinas, Sylvie Lecollinet, Cécile Beck, Serafin Gutierrez, Thierry Baldet, Philippe Vande Perre, Vincent Foulongne et Yannick Simonin. 2018. **Le virus Usutu : la menace fantôme.** *MS - Médecine Sciences*, 34 (8-9) : 709-716.

Vincent Foulongne, Marion Clé, Serafin Gutierrez, Philippe Vande Perre, Sara Salinas et Yannick Simonin. 2018. **Le virus Usutu : soyons vigilants.** *Virologie*, 22 (5) : 233-36.

Marion Clé, Cécile Beck, Sara Salinas, Sylvie Lecollinet, Serafin Gutierrez, Philippe Van de Perre, Thierry Baldet, Vincent Foulongne, and Yannick Simonin. 2019. **Usutu virus: A new threat?** *Epidemiology and Infection*, 147, e232, 1–11.

Marion Clé, Patrick Eldin, Laurence Briant, Annie Lannuzel, Yannick Simonin, Philippe Van de Perre, André Cabié, and Sara Salinas. 2020. **Neurocognitive impacts of Arbovirus infections.** *Journal of neuroinflammation*, 17:233.

## Abréviations

Aa	:	Acide aminé
ADE	:	Facilitation de l'infection par des anticorps
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
Ae	:	Aedes
AIM2	:	Absente dans le mélanome 2
ALR	:	Récepteurs absente dans le mélanome 2
AQP	:	Aquaporine
Arbovirus	:	<i>ARthropod-BORne VIRUSes</i>
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messenger
ARNsf	:	ARN de <i>flavivirus</i> sous-génomique
ASC	:	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	:	Adénosine triphosphate
ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	:	Pompe sodium-potassium
BCRP	:	Protéine de résistance au cancer du sein
BEC	:	Cellules endothéliales humaines primaires
BHE	:	Barrière hémato-encéphalique
C	:	Protéine de la capsid
CAM	:	Molécules d'adhérence cellulaire
CARD	:	<i>Caspase activation and recruitment domains</i>
CASK	:	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin (CaM)-activated serine-threonine kinase</i>
CHIKV	:	Virus du Chikungunya
CTD	:	Domaine carboxy-terminal
CXCL	:	Ligand des chimiokines à motif C-X-C
DC-SIGN	:	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
DENV	:	Virus de la Dengue
Dpi	:	<i>Days post infection</i>
E	:	Protéine de l'enveloppe
ECP	:	Effet cytopathogène
EIF2a	:	Facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2A

Elisa	:	Méthode immuno-enzymatique, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GFAP	:	Protéine acide fibrillaire gliale
HAD	:	<i>HIV-associated dementia</i>
HAND	:	<i>HIV-associated neurocognitive disorders</i>
HBMEC	:	Cellules endothéliales microvasculaires du cerveau humain
HCoV	:	Coronavirus humains
HSV-1	:	Virus herpès simplex 1
HTLV-1	:	Virus T-lymphotropique humain
HUVEC	:	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
ICAM-1	:	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFIT	:	<i>Interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats</i>
IFN	:	Interféron
IFNAR	:	Récepteur à l'interféron de type I
IFNGR	:	Récepteur à l'interféron de type II
IFNLR	:	Récepteur à l'interféron de type III
IgG	:	Immunoglobuline G
IgM	:	Immunoglobuline M
IL	:	Interleukine
IPSC	:	Cellules souches pluripotentes induites
IRF	:	Facteur de réponse à l'interféron
ISG	:	Gènes stimulés par l'interféron
ISGF3	:	<i>Interferon stimulated gene factor 3</i>
ISRE	:	<i>Interferon-stimulated response element</i>
JAK	:	Janus kinases
JAM	:	Molécule d'adhésion jonctionnelle
JEV	:	Virus de l'Encéphalite japonaise
JNM	:	Jonction neuromusculaire
KDa	:	Kilodalton
LCR	:	Liquide céphalo-rachidien
LGP2	:	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LRP1	:	La protéine 1 liée au récepteur des lipoprotéines de basse densité
M	:	Protéine membranaire



MAGI	:	<i>Membrane associated guanylate kinase with inverted domain structure</i>
MAVS	:	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MBEC	:	Cellules endothéliales cérébrales primaires de souris
MDA5	:	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MiARN	:	Micro ARN
MMP	:	Métalloprotéases matricielles
MOI	:	Multiplicité d'infection
MRP	:	Multirésistance aux médicaments
MUPP1	:	Multi-PDZ- protéine 1
MVEV	:	Virus de l'encéphalite de la Murray valley
MyD88	:	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NCAM	:	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NF-κB	:	Facteur nucléaire kappa B
NG2	:	<i>Neuron-glia antigen 2</i>
NIAID	:	Institut national des allergies et des maladies infectieuses
NK	:	<i>Natural killer cells</i>
NLR	:	<i>Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats containing receptors</i>
NOTCH	:	<i>Neurogenic locus notch homolog 3</i>
NSG	:	Cellules progénitrices neurales humaines
NVU	:	Unité neurovasculaire
OAS	:	2',5'-Oligoadénylate synthase
ORF	:	Cadre de lecture ouvert
PAMP	:	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PDGF-BB	:	Facteur de croissance dérivé des plaquettes-BB
PDGFR-β	:	Récepteur bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes
Pgp	:	Glycoprotéine P
PH	:	Potentiel hydrogène
PKR	:	Protéine kinase induite par l'interféron et activée par l'ARN
PolyA	:	Polyadénylé
PrM	:	Protéine pré-membranaire
PRR	:	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
RABV	:	Virus de la Rage

RdRp	:	ARN polymérase ARN-dépendante
RE	:	Réticulum endoplasmique
RIG-1	:	Gène inductible par l'acide rétinoïque
RLR	:	<i>RIG-I-like receptors</i>
RPE	:	Epithélium pigmentaire rétinien
RT-PCR	:	Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse
SARS-CoV-2	:	Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2
SGB	:	Syndrome de Guillain-Barré
SNC	:	Système nerveux central
SNP	:	Système nerveux périphérique
SOCS-5	:	Suppresseur de la signalisation des cytokines 5
STAT	:	Transducteur de signal et activateur de la transcription
STING	:	<i>Stimulator of Interferon Genes</i>
TBEV	:	Virus de l'encéphalite à tiques
TEER	:	Résistance électrique trans-endothéliale
TGF- $\beta$	:	Facteur de croissance transformant bêta
TLR	:	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- $\alpha$	:	Facteur de nécrose tumoral alpha
TRIF	:	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TYK	:	Tyrosine Kinase
USUV	:	Virus Usutu
UTR	:	Régions non traduites
VCAM-1	:	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	:	Facteur de croissance endothélial vasculaire
VIH/HIV	:	Virus de l'immunodéficience humaine
VLP	:	Pseudo-particules virales
WNV	:	Virus du Nil Occidental
Xrn1	:	Exoribonucléase cellulaire, la 5'-3' exoribonucléase-1
YFV	:	Virus de la Fièvre jaune
ZIKV	:	Virus Zika
ZO	:	Zonula occludens

# Chapitre I. Etat de l'art

## I. Les virus émergents

### 1. Définition

Les virus émergents et ré-émergents constituent un risque majeur pour la santé mondiale comme en témoignent les nombreux épisodes récents d'Ebola, du virus du Chikungunya (CHIKV), de la Grippe, du virus Zika (ZIKV), du virus de la Dengue (DENV) ou encore la pandémie associée au coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2) responsable de la maladie à COVID-19. A Washington, en 1989, lors d'une rencontre organisée entre la Fondation Rockefeller, la Fondation Fogarty et l'Institut National des Allergies et des Maladies Infectieuses (NIAID) sur la thématique des maladies nouvelles, le concept de maladie émergente est apparu. Les maladies émergentes sont des maladies qui peuvent progresser très rapidement au sein d'une population humaine et qui sont parfois responsables de problèmes de santé publique importants. Un exemple de maladie émergente est le sida au début des années 1980 causé par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, il s'agit d'une maladie nouvelle associée à des germes nouveaux. Le terme de maladie virale émergente est déterminé par plusieurs points :

- C'est une maladie qui associe de façon originale une étiologie et des symptômes non observés jusque-là.
- C'est une maladie qui apparaît dans un environnement nouveau ou qui réapparaît là où elle avait disparu.
- C'est une affection dont l'étude des causes de la maladie est nouvellement décrite.

Parmi ces maladies virales émergentes, il a été découvert de nombreux virus transmis par les arthropodes hématophages. Ces arboviroses se caractérisent par des cycles complexes qui font intervenir de multiples hôtes (mammifères, oiseaux, etc.) et vecteurs (moustiques, tiques, phlébotomes, etc.). Du fait des modifications de l'environnement et des comportements des hôtes, ces arboviroses présentent des tableaux épidémiques variés. Dans les années 1950, des réseaux de surveillance internationaux visant à recenser les virus nouveaux circulant sur un territoire donné ont été mis en place. Il en est ressorti plus de 600 virus qui pour la plupart n'étaient

associés à aucune pathologie connue. A cette époque, ces découvertes ne semblaient pas inquiéter les autorités de santé. Pourtant, ces découvertes apparaissent de nos jours très importantes. En effet, actuellement, les arboviroses représentent plus de 40% des maladies infectieuses émergentes à travers le monde dont certaines sont responsables d'atteintes neurologiques chez l'Homme.

## **2. Arbovirus**

Les arbovirus (ARthropod-Borne viruses) circulent principalement dans des régions tropicales ou subtropicales, avec depuis quelques années une augmentation de l'incidence des infections et la description de cas autochtones dans les régions tempérées, notamment en France métropolitaine. Il existe plus de 500 arbovirus décrits dont une centaine est connue comme étant pathogène pour l'Homme. L'infection peut se traduire par un tableau clinique polymorphe lié au tropisme vasculaire, hépatique et cérébral de ces virus. Ces virus sont dans leur grande majorité des virus à acide ribonucléique (ARN) et sont transmis par des vecteurs tels que les moustiques, les tiques et les phlébotomes pendant « les repas de sang » à toute une série d'hôtes, y compris l'Homme <sup>1</sup>. Le cycle de réplication des arbovirus se produit généralement chez des hôtes sauvages tels que les oiseaux et les mammifères. Les vecteurs sont alors responsables de la propagation de l'infection parmi les hôtes dans ce que l'on appelle un cycle enzootique. Dans certaines situations, les vecteurs peuvent transmettre des virus à des animaux qui ne sont pas l'hôte naturel, ce que l'on appelle des hôtes accidentels. C'est le cas par exemple des chevaux et des humains dans le cas du virus du Nil occidental (WNV) <sup>2</sup>. Certains arbovirus tels que le DENV, le CHIKV et le ZIKV dépendent moins de l'amplification virale chez les animaux sauvages et peuvent être transmis à l'Homme au cours d'un cycle urbain et sont donc potentiellement associés à des épidémies majeures chez l'Homme <sup>1,3</sup>.

## **3. Famille des arbovirus**

Au sein des arbovirus, il existe 5 familles : les virus de la famille *Togaviridae* du genre *Alphavirus*, les virus de la famille *Flaviviridae* du genre *Flavivirus*, les virus de la famille *Bunyaviridae* du genre *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, les virus de la famille *Reoviridae* du genre *Coltivirus*, *Orbivirus*, *Seadornavirus* et enfin les virus de la famille *Rhabdoviridae* du genre *Vesiculovirus*.

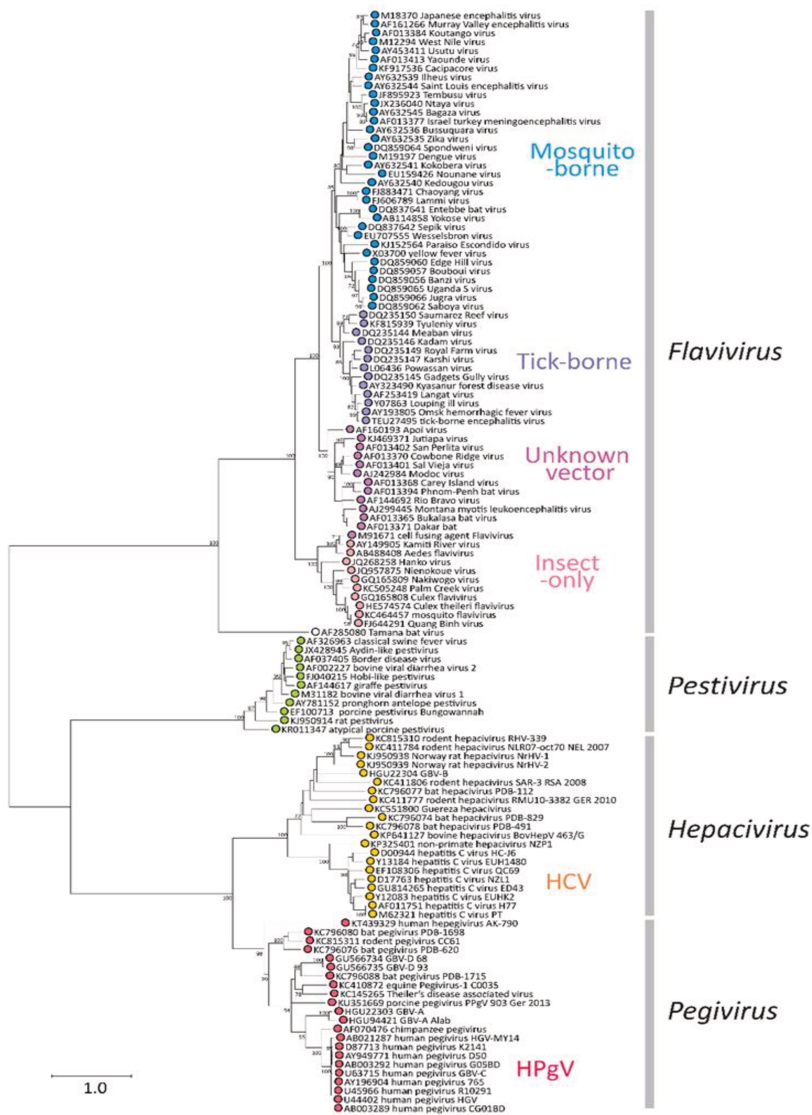
#### 4. Famille *Flaviviridae* et genre *flavivirus*

La famille des *Flaviviridae* se compose actuellement de quatre genres : *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* et *Pegivirus* <sup>4</sup> (figure 1).

Figure 1. Arbre phylogénétique des virus de la famille *Flaviviridae*.

L'arbre est représenté en fonction de la phylogénie des séquences d'acides aminés conservées dans la RdRP (NS5) des membres de la famille des *Flaviviridae*.

(Source: ICTV Virus Taxonomy Profile: *Flaviviridae*)



Bien que les membres de cette famille aient une large gamme d'hôtes qui comprend à la fois des vertébrés et des invertébrés, seuls les membres du genre *flavivirus* sont des arbovirus connus pour être transmis principalement soit par des moustiques soit par des tiques. Ces virus infectent plusieurs centaines de millions de personnes chaque année et provoquent une morbidité et une mortalité graves chez environ 1 à 5 % d'entre elles <sup>5</sup>. Parmi les *flavivirus*, nous retrouvons par exemple : le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), le WNV, le virus de la fièvre jaune (YFV), le

DENV, le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) et deux nouveaux virus émergents, le virus Usutu (USUV) et le ZIKV (**table 1**).

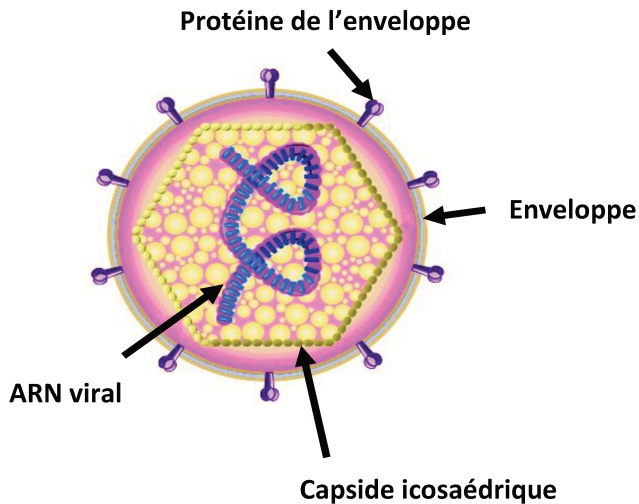
		Principaux <i>Flavivirus</i>				
Famille	Genre	Virus	Principaux Syndromes cliniques	Principaux vecteurs	Principaux hôtes	Distribution
<b>Flaviviridae</b>	<b>Flavivirus</b>	Dengue	Maladie fébrile, éruption cutanée, fièvre hémorragique	Moustiques	Humains	Afrique, Amérique Latine, Asie, Europe, Pacifique, Caraïbes
		Fièvre jaune	Fièvre hémorragique, hépatite	Moustiques	Primates Humains	Afrique, Amérique du Sud
		Encéphalite Japonaise	Encéphalites	Moustiques	Oiseaux/Porcs	Asie, Pacifique
		Virus du Nil occidental	Maladie fébrile, Encéphalites, Méningites	Moustiques	Oiseaux	Afrique, Europe, Moyen-Orient, Amérique du Nord
		L'encéphalite à tiques	Encéphalites Méningites, Myélites	Tiques	Rongeurs	Europe, Asie
		Zika	Encéphalites, syndrome Guillain barré, Microcéphalies	Moustiques	Primates et humains	Amérique, Afrique, Asie, Europe
		Usutu	Encéphalites, Méningites, Méningo-encéphalites	Moustiques	Oiseaux	Afrique, Europe

**Table 1. Principaux *flavivirus* et leurs principales caractéristiques.**

Ce tableau récapitule les principaux syndromes cliniques, vecteurs, hôtes ainsi que la distribution dans le monde des virus de la famille *Flaviviridae*, du genre *flavivirus* (virus de la Dengue, virus de la Fièvre jaune, virus de l'Encéphalite japonaise, virus du Nil occidental, virus de l'Encéphalite à tiques, le virus Zika et le virus Usutu).

### **a. Structure du virion des *flavivirus***

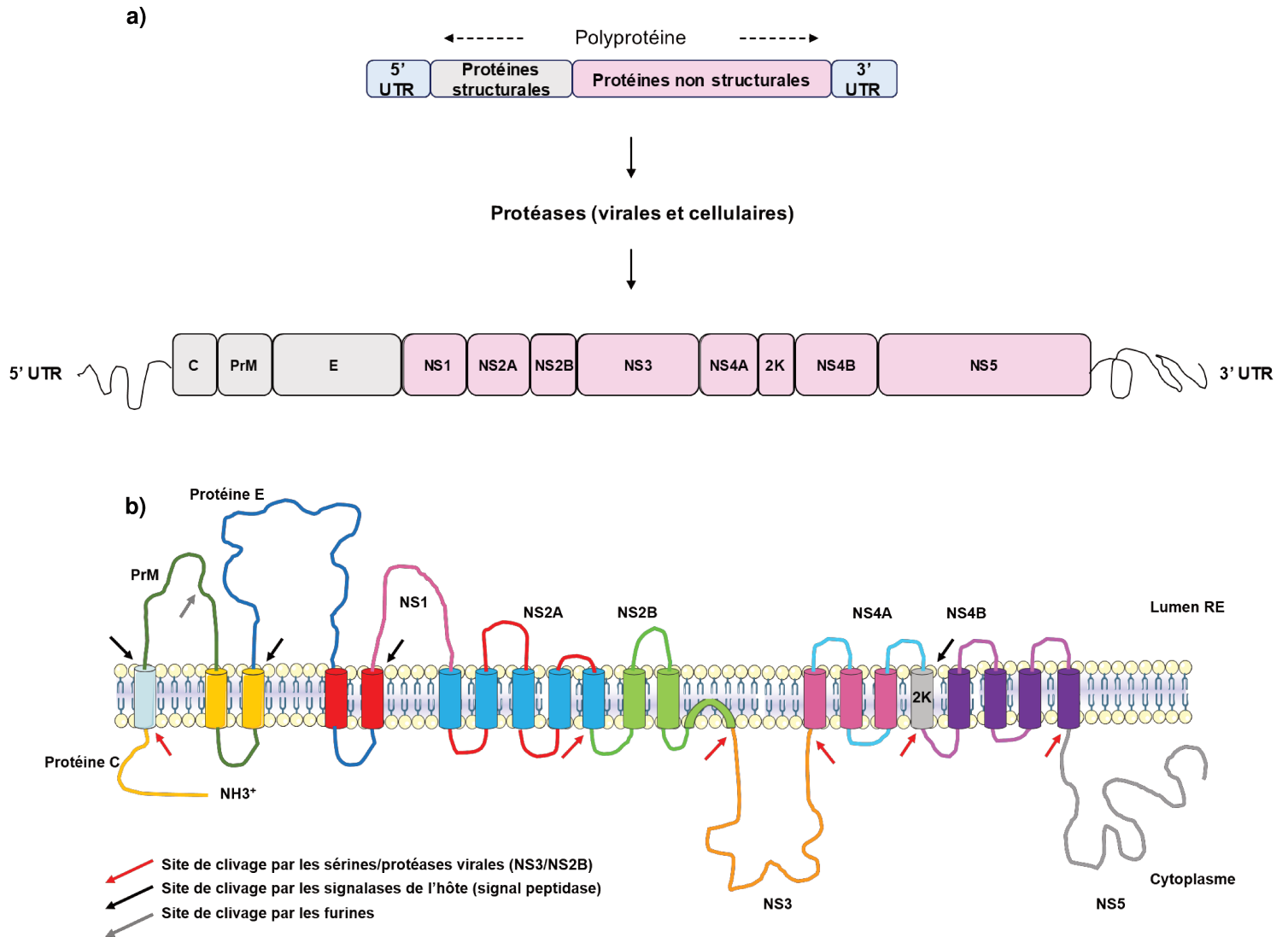
Les *flavivirus* sont des petits virus enveloppés contenant une capsidie icosaédrique d'environ 40 à 60 nanomètres de diamètre. La capsidie des *flavivirus* est entourée d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) de la cellule hôte (**figure 2**). Le virion des *flavivirus* est constitué aussi de protéines d'enveloppe et de protéines de membrane (**figure 2**). Les protéines de l'enveloppe, de la membrane et de la capsidie sont présentes en quantité stœchiométrique <sup>6</sup>.



**Figure 2. Particules virales des *flavivirus*.**  
 Vue d'ensemble de la particule virale enveloppée, sphérique à capsid de symétrie icosaédrique.  
 (*Adapté de: USUV : a new threat ?*)

**b. Génome viral des *flavivirus***

Le génome des *flavivirus* est composé d'une molécule d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 11 kilobases avec une coiffe de type I (m7GpppA) en 5' <sup>7</sup> et dépourvu de queue polyadénylée (polyA) en 3' <sup>8</sup> (**figure 3**). La coiffe a différents rôles, elle fonctionne comme une structure stabilisatrice pour l'ARN viral, elle est essentielle pour initier la traduction et stopper la défense antivirale innée <sup>9</sup>. Le génome des *flavivirus* est constitué d'un seul cadre de lecture ouvert (ORF) codant pour une polyprotéine d'environ 3400 acides aminés (aa), aboutissant, après clivage, à la libération de trois protéines structurales (capside (C), membrane (prM/M) et enveloppe (E)) et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, (2K), NS3, NS4A, NS4B, NS5) (**figure 3**).



**Figure 3. Polyprotéine des *flavivirus*.**

**a) Génome des *flavivirus*.** (*Adapté de: USUV : a new threat ?*)

**b) Topologie des protéines flavivirales et des domaines transmembranaires prévus.**

(*Adapté de: Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses, Images Biorender*)



### c. Cycle viral

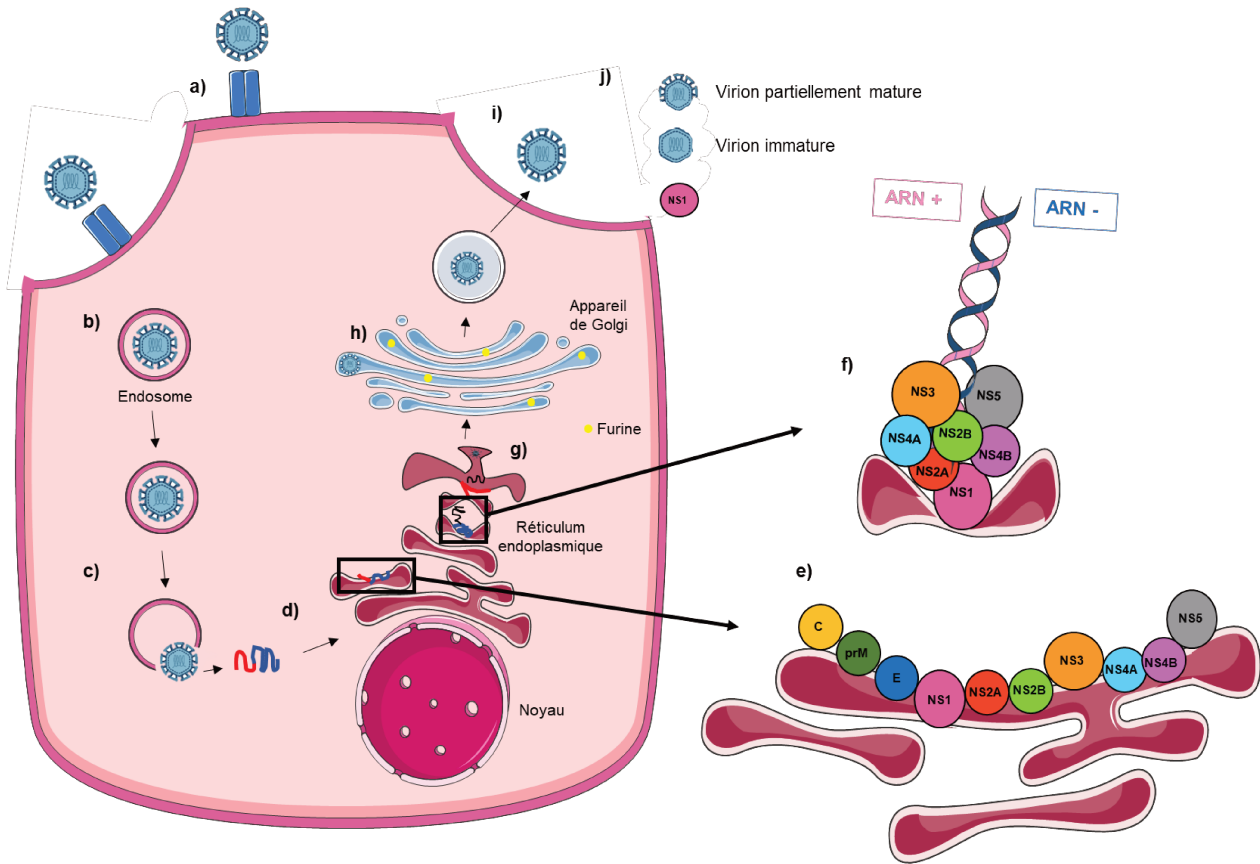


Figure 4. Cycle viral des *flavivirus*.

a) Le virus se lie aux récepteurs de la cellule hôte. b) Le virus est endocyté dans la cellule et se retrouve dans l'endosome. c) L'acidification de l'endosome induit un changement conformationnel de la protéine E ce qui permet au virus de fusionner avec la membrane endosomale et de libérer son matériel ARN génomique dans le cytoplasme de la cellule. d) La réplication et la traduction de l'ARN viral se produisent au niveau du réticulum endoplasmique. e) Le ribosome de la cellule hôte traduit directement l'ARN génomique en polyprotéine. Les protéases virales et de l'hôte clivent les protéines structurales (rouge) et non structurales (bleu). f) La réplication de l'ARN se produit dans des vésicules membranaires induites par le virus. La réplication est réalisée par un complexe de réplication virale agissant en tant que matrice. g) Le génome viral est emballé dans les particules virales immatures lors de l'assemblage. h) Ces particules sont transportées à travers l'appareil de Golgi où les protéases de l'hôte clivent le peptide prM. i) La particule virale naissante sort de la cellule par exocytose sous forme de virions arrivés à maturité. j) Certains peptides pr ne sont pas clivés ce qui donne des virions immatures (non infectieux) ou partiellement matures. L'hexamère NS1 soluble est également sécrété.

(Adapté de: Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins, Images Servier Medical Art)

### **i. Entrée virale**

L'internalisation de la particule virale enveloppée dans la cellule hôte se fait suite à la reconnaissance et à l'interaction de la protéine de l'enveloppe virale avec les récepteurs de la cellule ou avec des facteurs cellulaires de la cellule cible <sup>10</sup> (**figure 4a**). Des études ont mis en évidence différents facteurs d'attachement à la cellule pour le ZIKV comme : la lectine membranaire, DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) ou des récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM : Axl et Tyro 3 <sup>11,12</sup>. Pour l'USUV, aucune étude a mis en évidence des récepteurs d'attachement. Après l'attachement de la particule virale à la cellule hôte, les particules virales sont internalisées par endocytose dépendante de la clathrine <sup>13</sup> (**figure 4b**). La vésicule ainsi formée se détache de la membrane plasmique grâce à la dynamine. Une fois qu'elle est à l'intérieur de la cellule elle perd rapidement sa couverture de clathrine et fusionne avec un endosome précoce. Dans la vésicule endosomale, la diminution du potentiel hydrogène (pH) va entraîner un environnement acide ce qui va déclencher des changements de conformation des protéines virales d'enveloppe et de membrane. La protéine E va se trimériser et un réarrangement de sa surface va exposer le peptide de fusion vers la membrane cible ce qui va entraîner un désassemblage des particules <sup>14</sup>. A cette étape, le peptide de fusion va s'insérer et va se replier en tige boucle afin de rapprocher la membrane virale et la membrane endosomale. La fusion des deux membranes va créer un pore et permettre la libération du génome associé à la capsidie dans le cytoplasme de la cellule infectée <sup>11</sup> (**figure 4c**).

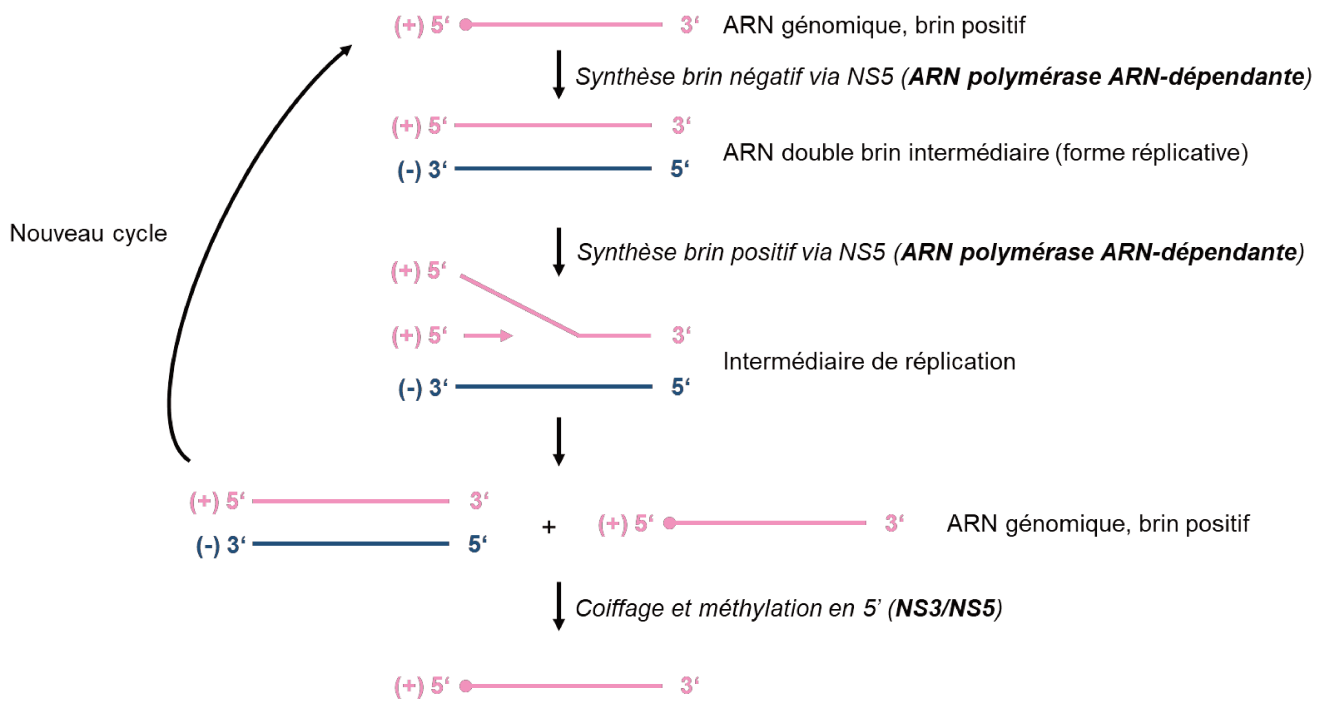
### **ii. Libération de l'ARN et traduction de la polyprotéine**

Une fois que le génome viral est libéré dans le cytoplasme, il est ensuite décapsidé afin d'être accessible pour sa traduction. La traduction du génome viral débute au niveau du codon AUG localisé au niveau d'une structure tige-boucle dans la région codant la protéine C. L'ARN de sens positif coiffé en 5' mais dépourvu de queue polyA est traduit en une seule polyprotéine par la machinerie cellulaire. Elle est ensuite clivée de manière co- et post-traductionnelle par des protéases virales et cellulaires de l'hôte en 3 protéines structurales et 7 protéines non structurales <sup>15</sup>. La majorité des protéines est située au niveau du RE mais également dans le noyau comme pour la protéine C et NS5, une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). La

présence de ces protéines dans le noyau semble nécessaire pour la production des particules virales <sup>16</sup> (**figure 4d-e**).

### ***iii. Réplication***

La réplication virale s'effectue pour les *flavivirus* principalement dans le cytoplasme de la cellule infectée. Plus précisément la réplication du génome se produit sur les membranes intracellulaires du RE. Les protéines non structurales vont entraîner un réarrangement membranaire de la membrane du RE et s'y regrouper pour former le complexe de réplication viral (**figure 4f**). Ce complexe va permettre de répliquer l'ARN génomique grâce à l'activité ARN polymérase ARN-dépendante de la protéine NS5 et l'activité hélicase de NS3. L'initiation de la réplication nécessite des interactions entre les régions hautement structurées 5' et 3' des régions non traduites (UTR) *via* les éléments en tige-boucle induisant la circularisation du génome viral <sup>17,18</sup>. Cette structure circulaire permet le recrutement de la polymérase virale et la synthèse du brin complémentaire au brin matrice de polarité négative, ce qui génère une molécule intermédiaire d'ARN à double brin. Le brin ARN de polarité négative sert alors de base pour la synthèse d'un nouveau brin d'ARN génomique (viral) positif sous un mode asymétrique et semi-conservatif (**figure 5**). Puis, la protéine NS5 qui a également un domaine méthyltransférase fera la méthylation de la coiffe du brin d'ARN néoformé. Ces nouveaux brins sont ensuite encapsidés dans la capsid afin de former la nucléocapside <sup>17</sup>.

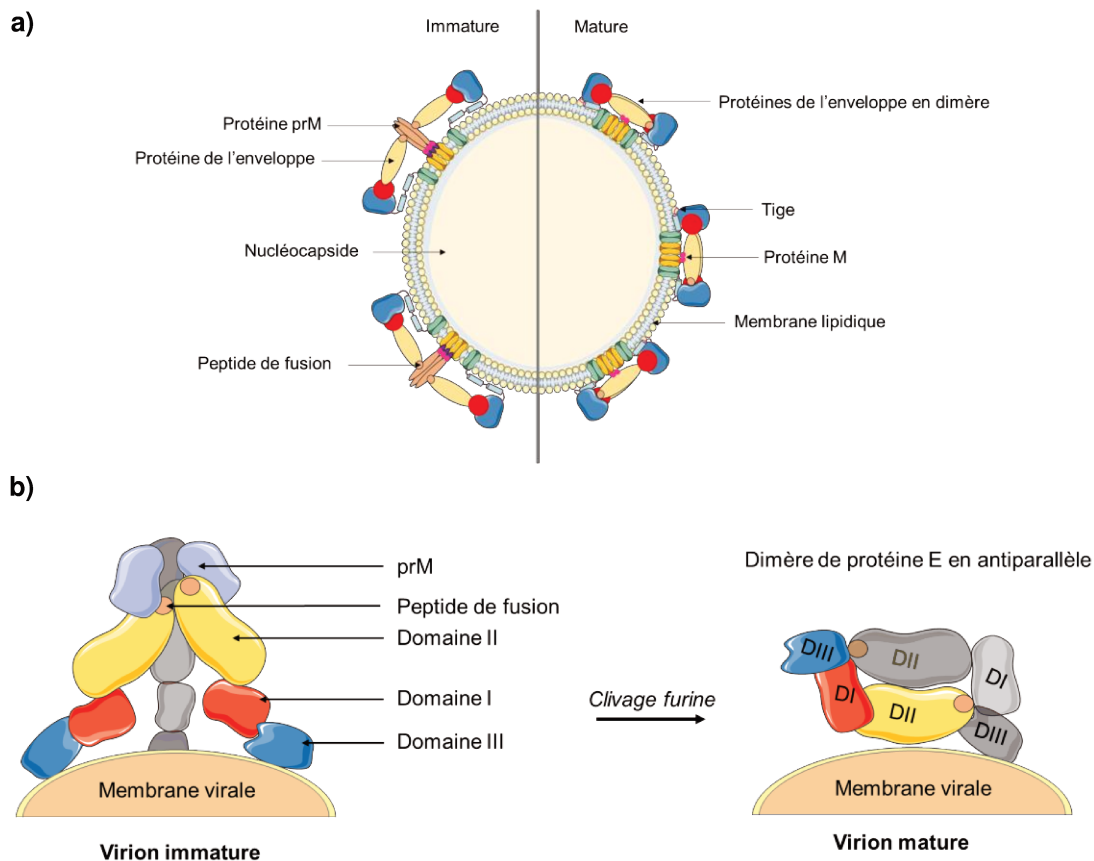


**Figure 5. Réplication du génome viral des *flavivirus*.**

Représentation schématisée de l'ARN génomique au niveau du réticulum endoplasmique. Le brin ARN positif est représenté en rose et le brin d'ARN négatif est représenté en bleu.

#### **iv. Assemblage des particules virales**

L'assemblage des particules virales des *flavivirus* a lieu dans des saccules situés à proximité de vésicules contenant les complexes de réplication et dépend aussi du réarrangement membranaire du RE (**figure 4g**). La nucléocapside interagit avec les protéines prM et E. La particule virale immature (non infectieuse) va se former par bourgeonnement au niveau de la membrane du RE avec un aspect hérissé correspondant à l'insertion d'hétérodimères prM-E dans l'enveloppe virale (**figure 6**). Les particules virales non infectieuses et immatures qui en résultent sont transportées *via* l'appareil de Golgi. Dans l'appareil de Golgi se déroule le clivage de prM en M par la furine cellulaire (protéase qui clive les protéines juste en aval d'une séquence cible d'aa) permettant ainsi la maturation de la particule virale <sup>19</sup> (**figure 4h et 6**). Les particules virales infectieuses sont ensuite libérées de la cellule par exocytose (**figure 4i**).



**Figure 6. Organisation des protéines E/prM à la surface des particules virales des *flavivirus* immatures et matures.**

a) A gauche est schématisé un virus immature et à droite un virus mature. Contrairement à cette représentation schématisée, les protéines de surface sont étroitement tassées dans les particules virales.

b) La particule immature est recouverte de 60 complexes trimériques « en pointe » de prM-E. Sur les virions matures la protéine E existe sous forme d'homodimère antiparallèles qui reposent à plat sur la surface du virion, il y en a 90. **Codes de couleur :** DI, rouge ; DII, jaune ; DIII, bleu ; peptide de fusion (FP), orange ; hélices 1 et 2 de la "tige", bleu clair ; hélices transmembranaires C-terminales (ancrage de la membrane), vert ; son de membrane lipidique, gris.

(Adapté de: *Flavivirus membrane fusion et A game of numbers: the stoichiometry of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection*, Images Biorender)

## **5. Mise en place de la réponse immunitaire innée suite à l'infection des *flavivirus***

Il existe deux grands types de réponses immunitaires. L'immunité innée est la plus ancestrale et existe chez tous les métazoaires. Elle permet une réponse immédiate non spécifique de l'hôte contre les agents pathogènes envahissants. L'immunité innée est composée des macrophages, des cellules dendritiques, des

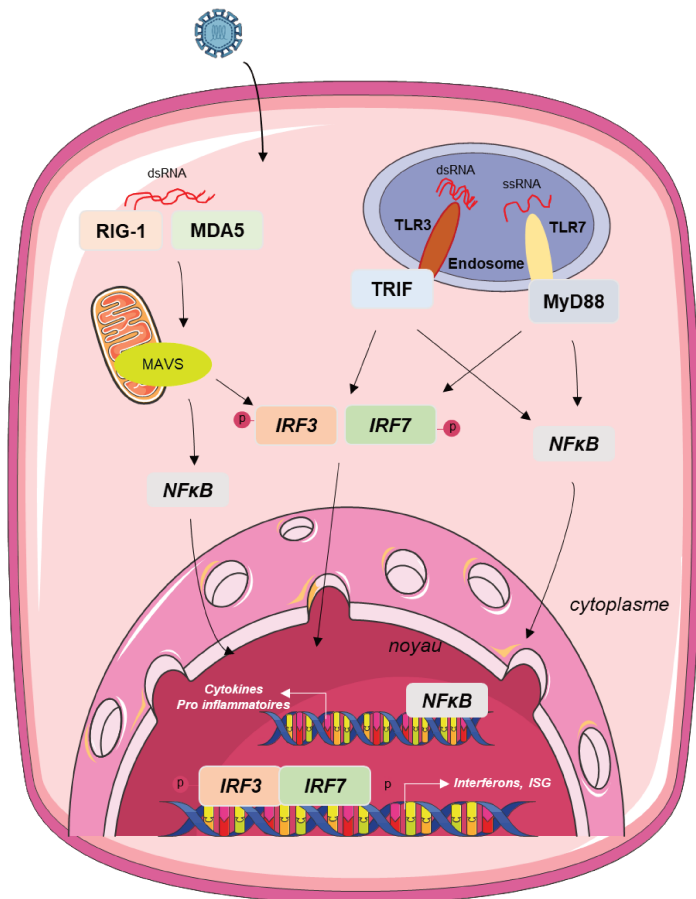
cellules tueuses (natural killer (NK) cells), des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), des mastocytes, des microglies et des monocytes. Elle participe à la lutte antivirale. L'immunité adaptative, qui est plus récente, n'est apparue que chez les gnathostomes et n'existe donc que chez 5% des espèces du règne animal. Le système immunitaire adaptatif est activé en réponse à l'immunité innée. Il permet à l'hôte de reconnaître et de se souvenir des antigènes spécifiques du non-soi pour mettre en place des réponses immunitaires humorales (production d'anticorps) par les lymphocytes B ou à médiation cellulaire par les lymphocytes T. De plus, les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules B et les microglies stimulent les cellules T naïves pour qu'elles deviennent des cellules effectrices.

Dans le cerveau, les cellules microgliales sont la première ligne de défense du système immunitaire inné. Les microglies représentent une population spécialisée de cellules de type macrophages du système nerveux central (SNC), considérées comme des sentinelles immunitaires capables d'orchestrer une puissante réponse inflammatoire. Lorsqu'un agent infectieux atteint le SNC, les microglies ont la capacité de passer à différents états fonctionnels modifiant leur prolifération<sup>20</sup>, leur morphologie (c'est-à-dire des processus raccourcis)<sup>21</sup>, leur activité phagocytaire<sup>22</sup>, la présentation des antigènes<sup>23,24</sup> et la libération de facteurs inflammatoires tels que les cytokines et les chimiokines<sup>25</sup> afin de diminuer l'inflammation et détruire le pathogène pour qu'il n'endommage pas le tissu nerveux. Les cellules microgliales peuvent développer différents états d'activation fonctionnelle participant activement à l'homéostasie du cerveau. Cependant, une réponse inflammatoire incontrôlée des cellules microgliales peut avoir des conséquences néfastes. Un autre facteur clé de la réponse microgliale spécifique est lié à l'expression et à l'activation de différents récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, *pattern recognition receptors*). En effet, les PRR sont des récepteurs qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) impliqués dans la réponse interféron (IFN) et qui sont exprimés par un grand nombre de cellules<sup>26</sup>. Les PAMP sont des composés présents dans les agents infectieux mais pas naturellement dans les cellules de l'hôte. Cela peut être, par exemple des acides ribonucléiques double brin présents dans le cytoplasme des cellules de l'hôte qui viennent d'être infectées<sup>27</sup>. Les PRR appartiennent à différentes familles protéiques. On retrouve principalement : les *Toll-like receptors* (TLR), les *RIG-I-like receptors* (RLR) et les *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeats containing receptors* (NLR)<sup>28,29</sup>.

Lors d'une infection virale les cellules du système immunitaire inné sont capables de détecter rapidement le virus grâce à la présence de PAMP par les PRR. Suite à la reconnaissance des pathogènes, les récepteurs activent plusieurs voies de signalisation qui aboutissent à la mise en place de systèmes de défense afin de contrôler très vite la réplication virale. Cette détection va entraîner des cascades d'activation moléculaire qui vont mener à la sécrétion de l'IFN et à la sécrétion de cytokines. Les IFN vont stimuler les cellules *via* les récepteurs présents à leur surface et déclencher l'activation de gènes ayant une activité antivirale. Les cytokines synthétisées et libérées au cours de la réponse immunitaire sont essentielles à l'activation des cellules de l'immunité adaptative.

Parmi les TLR, les TLR 3, 7, 8 et 9 sont impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques viraux présents dans le milieu extracellulaire ou dans les voies endosomales de la cellule hôte <sup>30</sup>. Les récepteurs 7 et 8 vont activer une cascade de signalisation suite à la détection de l'ARN simple brin <sup>31</sup>. Ils vont interagir avec une molécule adaptatrice la MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) qui va activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) en aval, laquelle favorise la production de cytokines <sup>32</sup> (**figure 7**). Le TLR3 reconnaît l'ARN double brin et va recruter la molécule *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF) (**figure 7**). TRIF activée va à son tour activer les facteurs de transcription IRF3/7 (*Interferon Regulatory Factor*). Ceux-ci activés vont migrer dans le noyau et induire la production d'IFN en se fixant sur des éléments de transcription de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (ISRE, *interferon-stimulated response element*) (**figure 7**). L'extrémité 5' triphosphate des ARN viraux et l'ARN double brin sont également détectés par les RLR. La famille des récepteurs de type RLR comprend: RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) et LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*). RIG-1 et MDA5 ont des hélicases à ARN, elles ont deux domaines CARD (*caspase activation and recruitment domains*) à l'extrémité amino-terminale, un domaine hélicase central et un domaine carboxy-terminal (CTD). Le domaine CTD est le senseur d'ARN viral <sup>33</sup>. Suite à la reconnaissance de l'extrémité 5' triphosphate des ARN viraux ou/et de l'ARN double brin par les RLR, le domaine CARD de RIG-I ou de MDA5 interagit avec le domaine CARD d'une protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS) (**figure 7**). C'est une protéine située sur la membrane externe de la mitochondrie mais qui peut également être présente sur des peroxyosomes ou d'autres membranes. Quand la

protéine MAVS est activée, elle peut recruter des partenaires cellulaires et activer ces kinésines qui jouent un rôle important dans l'activation des NF- $\kappa$ B et IRF3<sup>34</sup>. Une fois activée NF- $\kappa$ B déclenche la production de cytokines pro-inflammatoires. L'IRF3 est quant à lui capable de déclencher très vite au cours de l'infection des gènes stimulés par l'IFN (ISG, *interferon-stimulated genes*). Les ISG vont permettre de produire une réponse antivirale en ciblant toutes les étapes des cycles réplcatifs des virus<sup>35</sup>.

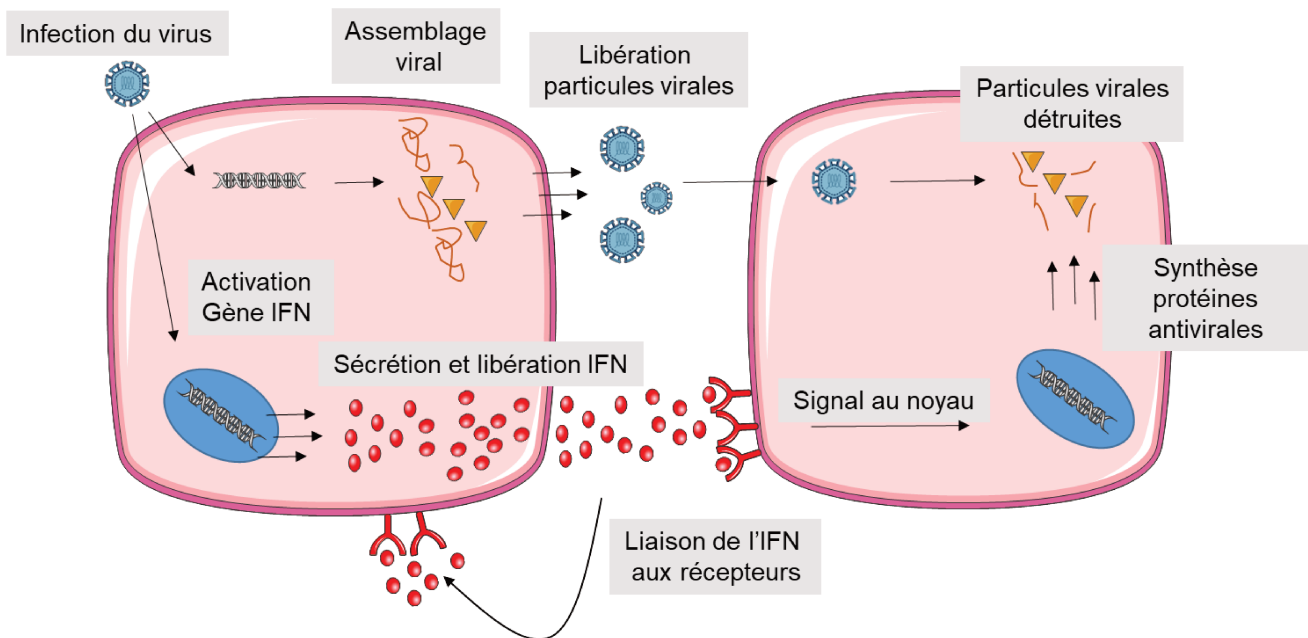


**Figure 7. Réponse immunitaire innée aux virus à ARN à brin positif.**

(Adapté de: *Viral Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections*, Images Servier Medical Art)

Les IFN produits par les cellules de l'organisme en réponse à des virus sont d'importants modulateurs de la réponse immunitaire. Ils peuvent stimuler les cellules de manière autocrine et paracrine. En effet, lors d'une infection, l'IFN sécrété n'inhibe pas directement la multiplication du virus. Au contraire, il stimule les cellules infectées et celles qui sont à proximité pour qu'elles produisent des protéines qui empêchent le virus de se répliquer en leur sein (**figure 8**). La production ultérieure du virus est ainsi inhibée et l'infection est empêchée ou réduite<sup>36</sup>.



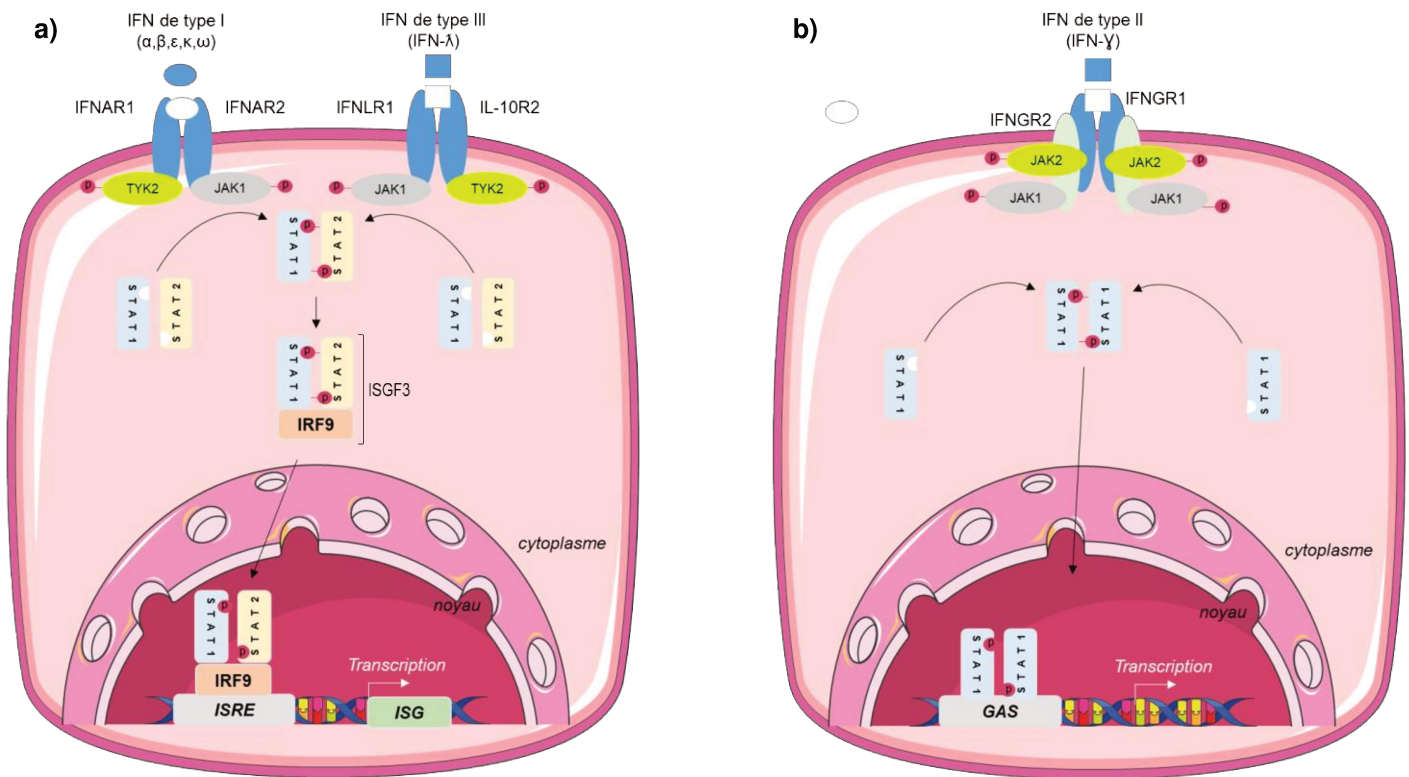


**Figure 8. Signalisation IFN de cellule à cellule.**

(Adapté de: *Interferon Lambda Genetics and Biology in Regulation of Viral Control*, Images Servier Medical Art)

Les différentes formes d'IFN constituent la défense la plus rapide et la plus importante de l'organisme contre les virus. Ces IFN ont été classés en trois types : le type I comprend les formes alpha ( $\alpha$ ), bêta ( $\beta$ ), oméga ( $\omega$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) et kappa ( $\kappa$ )<sup>37</sup>, le type II comprend la forme gamma ( $\gamma$ )<sup>38</sup> et le type III comprend la forme lambda ( $\lambda$ )<sup>39</sup>. La production d'IFN commence lors de la perception de signaux indiquant l'infection. Les IFN sont des protéines sécrétées par les cellules qui diffusent dans le milieu extracellulaire. Elles se fixent sur leur(s) récepteur(s) afin d'induire une cascade de signalisation intracellulaire. Les IFN  $\alpha$  et  $\beta$  ont un récepteur (IFNAR) en commun, constitué une fois activé d'une sous unité IFNAR1 et une sous unité IFNAR2<sup>40</sup> (**figure 9**). Les IFN  $\gamma$  se lient au récepteur IFNGR qui est constitué d'une chaîne IFNGR1 et d'une chaîne IFNGR2<sup>38</sup> (**figure 9**). Les IFN  $\lambda$  se fixent sur un récepteur constitué une fois activé d'une sous unité IFNLR1 et d'une sous unité IL-10R2 (**figure 9**). La fixation de l'IFN de type I et de type III entraîne la dimérisation des récepteurs et l'activation des tyrosine kinases de la famille JAK (*Janus Kinases*) du récepteur qui vont s'autophosphoryler. Sur une sous unité il y a phosphorylation de JAK1 et sur l'autre phosphorylation de TYK2 (*Tyrosine Kinase 2*). L'activation de ces protéines va entraîner la phosphorylation de protéines libres cytosoliques, les protéines STAT (transducteur de signal et activateur de la transcription). Cette phosphorylation provoque leur dimérisation et s'associe avec IRF9 (complexe ISGF3, *Interferon stimulated gene factor 3*). Le complexe ISGF3 va alors se fixer sur une séquence

consensus ISRE dans le noyau et permettre l'expression des ISG afin d'induire un état dit antiviral (**figure 9**).



**Figure 9. Voie de signalisation de l'IFN.**

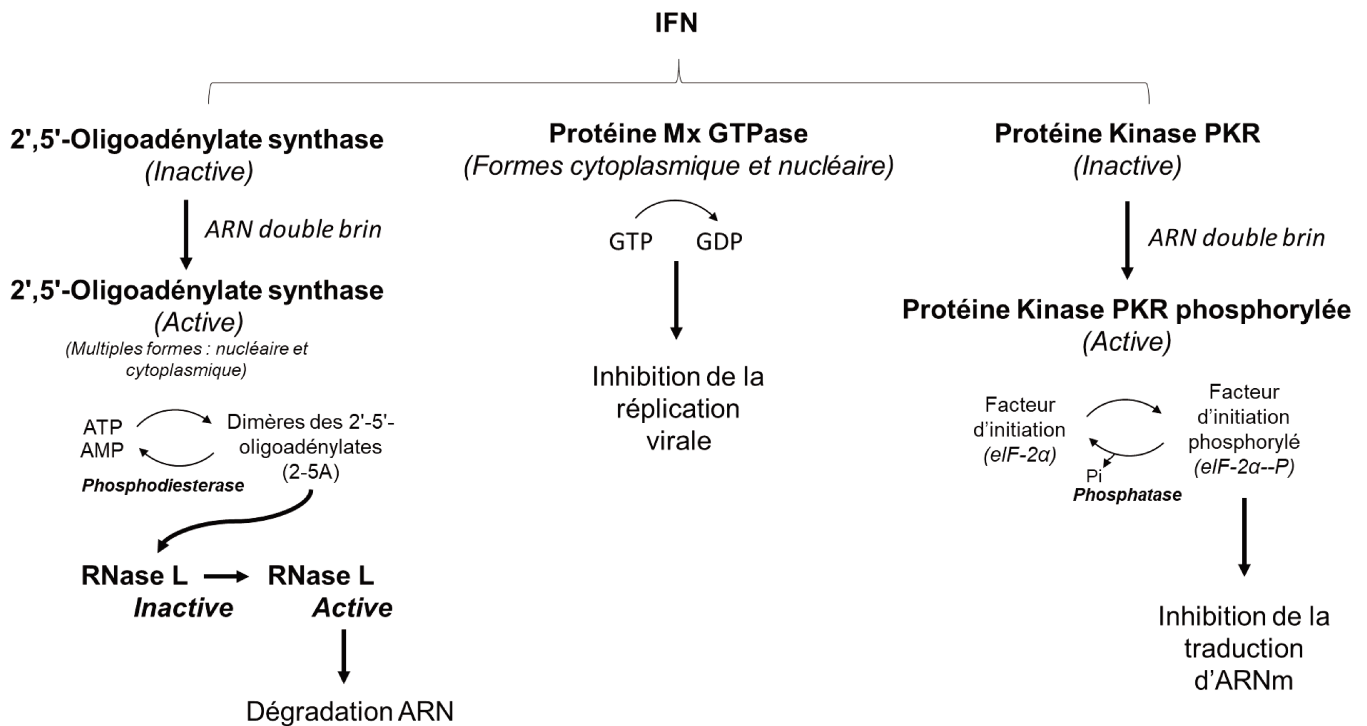
**a) Voie de signalisation de l'IFN de type I et de type III.**

**b) Voie de signalisation de l'IFN de type II. La liaison des IFN  $\gamma$  au domaine extracellulaire de la sous-unité réceptrice de IFN- $\gamma$ R1 conduit à l'engagement de la sous-unité IFN- $\gamma$ R2 ce qui provoque la phosphorylation croisée de JAK1 et JAK2 entre eux et avec les sous-unités réceptrices. Les homodimères parallèles STAT1 sont alors recrutés sur les récepteurs et leur phosphorylation convertit les homodimères en une configuration antiparallèle. Les homodimères STAT1 réorientés se transloquent vers le noyau où ils se lient aux sites d'activation de l'IFN- $\gamma$  (GAS), des gènes de réponse innée, y compris l'IRF1. L'IRF1 active ensuite un grand nombre de gènes de réponse secondaire qui remplissent toute une série de fonctions immunomodulatrices.**

*(Adapté de: The Two Faces of Interferon- $\gamma$  in Cancer et Viral Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections, Images Servier Medical Art)*

Les ISG induit par la signalisation des voies IFN de type I et III codent principalement des PRR ou des facteurs de transcription <sup>41</sup>. On retrouve également des protéines qui influent des cascades enzymatiques antivirales régulées elles-

mêmes par l'IFN telles que : les kinases activées par l'ARN double brin (PKR), les Mx GTPases (Mx), les OAS (2',5' oligoadénylate synthase). Ces protéines ont différents rôles par exemple : PKR bloque la synthèse de protéines virales, Mx1 inhibe la réplication virale à différents endroits et OAS peut participer à la dégradation des ARNs viraux (**figure 10**)<sup>42,43</sup>.



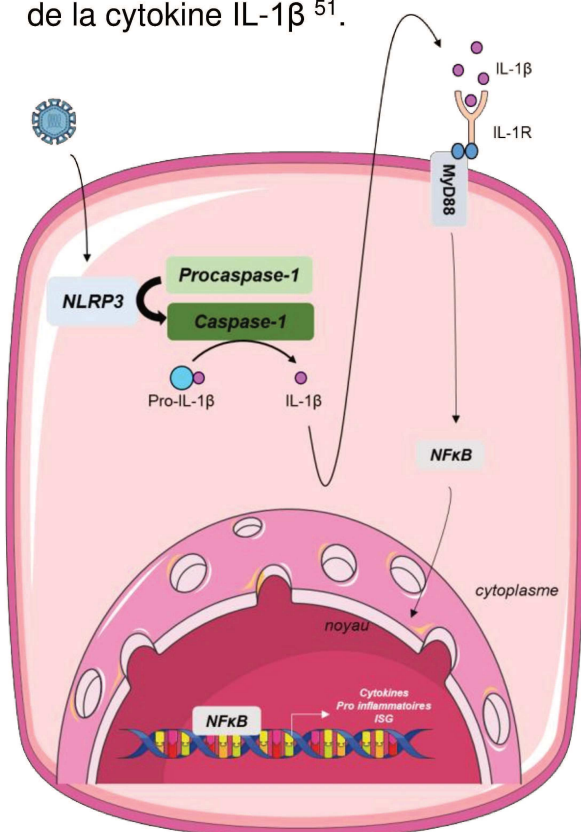
**Figure 10. Voies de signalisation 2',5' OAS, de Mx et PKR.**

**Fonctions biochimiques des protéines inductibles par l'IFN.** On retrouve la famille des 2',5'-Oligoadénylate synthases et la nucléase RNase L qui intervient dans la dégradation de l'ARN, la famille des GTPases de la protéine Mx qui semble cibler les nucléocapsides virales et inhiber la synthèse de l'ARN ainsi que la kinase PKR qui inhibe l'initiation de la traduction par phosphorylation du facteur d'initiation de la synthèse des protéines eIF-2α.

*Abréviations: eIF-2α, Eukaryotic translation initiation factor 2A ; 2',5' OAS (2',5' oligoadénylate synthase. (Adapté de: Host genetic variability and West Nile virus susceptibility)*

Suite à une infection virale, il y a également la mise en place de réponses inflammatoires. L'activation de ses réponses peut se faire *via* l'inflammasome (**figure 11**)<sup>44</sup>. L'inflammasome est un complexe macromoléculaire comprenant : un PRR, un adaptateur et la caspase inflammatoire, la caspase-1. Au sein de ce complexe, on retrouve trois familles de récepteurs : les NLR, les ALR (*AIM2, [absent in melanoma*

2]-like receptors) et les RLR <sup>45-47</sup>. Par exemple, après détection du virus, NLRP3, s'active et s'oligomérisse puis interagit avec le domaine CARD de la protéine *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC). ASC est une protéine adaptatrice (car elle a un domaine PYD en amino-terminal qui interagit avec les récepteurs et un domaine CARD en carboxy-terminal) et commune à tous les inflammasomes. Une fois l'interaction établie, le complexe recrute une procaspase-1 et induit la conversion auto protéolytique de la pro-enzyme en caspase 1 active <sup>48</sup>. La caspase-1 active entraîne le clivage et la libération d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. Ces deux interleukines vont se lier à leurs récepteurs respectifs pour déclencher l'activation de NF- $\kappa$ B et la transcription des gènes dépendants de NF- $\kappa$ B ainsi que pour réguler l'expression des ISG. La caspase-1 joue un rôle important dans la voie immunitaire innée et régule au moins deux réponses de l'hôte : la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires <sup>49</sup> et l'induction de la pyroptose, une forme hautement inflammatoire de mort cellulaire programmée qui dépend de l'activation d'au moins une des caspases inflammatoires comme la caspase-1 <sup>50</sup>. Plusieurs études ont démontré que certains virus ont la capacité d'activer les inflammasomes qui à leur tour contribuent à la médiation de la réponse de l'hôte à l'infection virale. C'est le cas par exemple pour le ZIKV où des études montrent que la protéine virale NS5 du ZIKV favorise l'activation de l'inflammasome en interagissant avec la NLRP3 et en induisant la génération d'espèces radicaux oxygénés mitochondriaux. La caspase-1 activée catalyse la transformation protéolytique de pro-IL-1 $\beta$  en sa forme mature conduisant à la sécrétion de la cytokine IL-1 $\beta$  <sup>51</sup>.



**Figure 11. Voie de signalisation de l'inflammasome.**

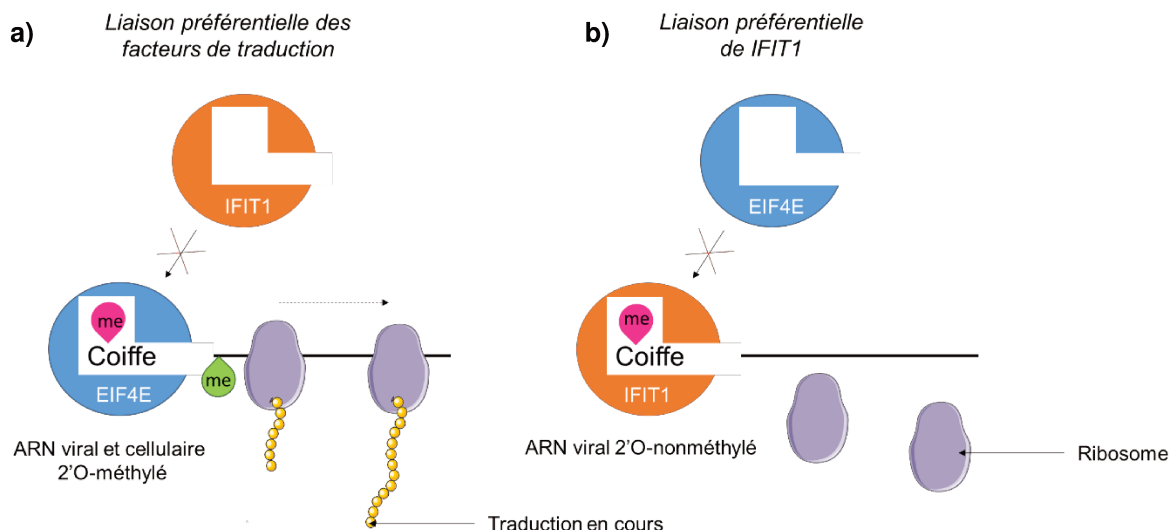
L'inflammasome NLRP3 est activé en réponse à l'infection par les virus ce qui entraîne le clivage de la pro-interleukine-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) en la forme IL-1 $\beta$  mature. L'IL-1 $\beta$  est sécrétée par la cellule et se lie au récepteur IL-1 (IL-1R) pour déclencher l'activation de NF- $\kappa$ B et la transcription des gènes dépendant de NF- $\kappa$ B telles que les cytokines pro-inflammatoires ainsi que pour réguler l'expression de l'ISG.

(Adapté de: West Nile virus infection and immunity, Images Servier Medical Art)

## **6. Mécanismes d'échappement des *flavivirus* à la réponse antivirale**

Afin d'envahir et de se disséminer dans l'hôte qu'ils ont infecté, les virus doivent échapper et détourner au mieux la réponse antivirale déclenchée par les cellules de l'hôte infecté. Pour éviter d'être reconnus ou pour perturber la machinerie cellulaire, différentes stratégies ont été mises en place par les *flavivirus*. Ces stratégies permettent de contourner la réponse antivirale, tant la réponse immunitaire innée que la réponse immunitaire adaptative <sup>52</sup>. Cependant, ils ont comme cible prioritaire la réponse antivirale innée, en particulier la réponse IFN. Les *flavivirus* peuvent par exemple, empêcher les interactions entre les PAMP et les PRR cellulaires ou encore, synthétiser des molécules afin d'inhiber les différentes étapes de la réponse immunitaire ou bloquer la machinerie cellulaire en agissant directement sur les effecteurs de voies biologiques <sup>53,54</sup>.

Une des principales stratégies mise en place par les *flavivirus* consiste à imiter l'ARN de l'hôte en modifiant le génome de l'ARN viral. Pour cela, les *flavivirus* ont évolué pour incorporer une 2'-O-méthyltransférase (2'-O-MTase) au sein du gène NS5. Cette 2'-O-MTase ajoute un groupement méthyle à la position 2'-O du ribose du premier nucléotide adjacent à la coiffe (**figure 12**). L'ajout du groupement méthyle en 5' sur l'ARN néo formé permet de mimer les ARN cellulaires. De cette façon, les membres des protéines induites par l'IFN à répétition tétratricopeptidique (IFIT) ne sont pas capables de se lier et de séquestrer l'ARN viral pour arrêter la production de protéines virales <sup>9</sup>.



**Figure 12. Compétition entre l'IFIT1 et le facteur de traduction EIF4E pour les modèles d'ARNm.**

**Modèle proposé pour l'inhibition traductionnelle par médiation IFIT1 de l'ARN viral non méthylation 2'O.** a) L'ARN cellulaire et viral coiffé et 2'O-méthylé est lié par EIF4E pour initier la traduction. b) L'ARNm viral dépourvu de méthylation 2'O au niveau du premier ribose est reconnu par IFIT1 qui empêche la liaison des facteurs cellulaires nécessaires à une traduction efficace.

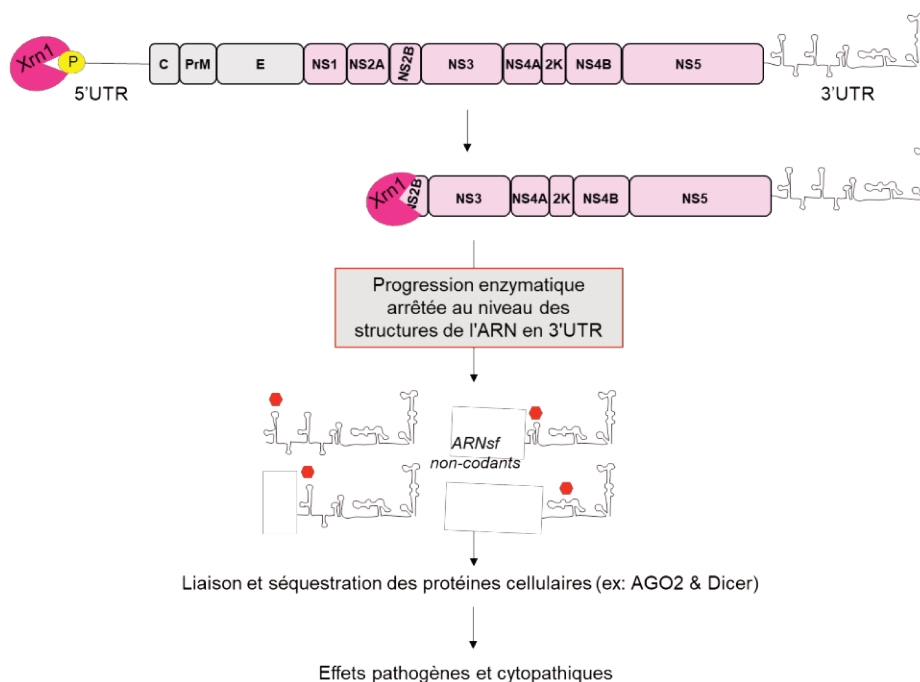
Abréviations: IFIT1, Interferon Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 1; EIF4E, Eukaryotic translation initiation factor 4E; me, méthylation. (*Adapté de: Sequestration by IFIT1 Impairs Translation of 2'O-unmethylated Capped RNA*)

Un second mécanisme utilisé par les *flavivirus* pour contourner la détection immunitaire innée consiste à séquestrer leurs intermédiaires de réplication (ARN double brin) dans des compartiments de réplication cytoplasmiques conservés au cours de l'évolution. Les vésicules à double membrane dérivées du RE protègent à la fois les intermédiaires de réplication et l'ARN viral répliqué de la détection des PRR jusqu'à ce qu'une synthèse suffisante soit produite<sup>55</sup>. Ce mécanisme a été observé au cours des premiers stades de l'infection par le DENV, le WNV, le JEV et le TBEV<sup>52,56,57</sup>. Il permet de retarder la production d'IFN et conduit à un relargage facilité des nouveaux virions. Par exemple, le DENV peut empêcher les PRR de reconnaître l'ARN double brin lors de la réplication en déformant les membranes du RE<sup>58</sup>.

Un autre mécanisme utilisé par les *flavivirus* est l'activation volontaire de l'autophagie. En temps normal, l'autophagie est un processus utilisé par les cellules pour dégrader les protéines et les organites endommagés afin de maintenir leur homéostasie. Cependant, certains virus comme le DENV, le CHIKV et le ZIKV<sup>11,59,60</sup>

ont mis en place des mécanismes pour pirater cette voie et l'utiliser pour leur propre compte. Cette activation leur permet de se localiser dans une zone isolée des PRR tout en gardant un contact avec l'ensemble du matériel cellulaire nécessaire à une réplication efficace à proximité <sup>61</sup>.

Dans les cellules de moustiques infectées, des travaux ont mis en évidence la production par la machinerie cellulaire de micro ARNs viraux (miARN). Ces miARN modulent les fonctions cellulaires en régulant négativement et spécifiquement des gènes cellulaires, favorisant ainsi la réplication du virus dans les cellules d'insectes. D'autres séquences particulières de l'ARN viral, les ARN de *flavivirus* sous-génomique (ARNsf) ont attiré l'attention des chercheurs. En effet, les ARNsf sont des ARN non codants hautement structurés qui proviennent de la dégradation incomplète du génome de l'ARN viral par une exoribonucléase cellulaire, la 5'-3' exoribonucléase-1 (Xrn1) de l'hôte (**figure 13**). Les ARNsf sont essentiels à la pathogénèse des *flavivirus* notamment dans le cycle de la réplication. Les ARNsf peuvent inhiber la réponse de l'IFN et détourner les défenses de l'hôte. C'est le cas pour WNV où *Schuessler et al* ont démontré que les ARNsf contribuent à l'évasion virale <sup>62</sup>.



**Figure 13. Modèle décrivant la formation et les fonctions de l'ARN sous génomique.**

Abréviations: Xrn1, 5'-3' exoribonucléase 1 ; ARNsf, ARN sous-génomique flaviviral ; Ago2, argonaute-2 ; UTR, région non traduite. (*Adapté de: Mechanism and structural diversity of exoribonuclease-resistant RNA structures in flaviviral RNAs et Flavivirus sRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery*)

Enfin, les *flavivirus* ont également mis en place la synthèse d'antagonistes protéiques ciblant les IFN de type I, c'est le cas pour le DENV, le WNV, le JEV et le TBEV (**figure 14**). Le JEV est capable de réprimer un miARN qui inhibe le suppresseur de la signalisation des cytokines 5 (SOCS-5), donc favorise son expression <sup>63</sup>. Les protéines NS2B/NS3 du DENV peuvent également hydrolyser la protéine STING (*Stimulator of Interferon Genes*), ce qui entraîne le blocage de la phosphorylation d'IRF3 <sup>56</sup>. Le DENV peut aussi inhiber des protéines STAT requises pour l'activation de la transcription des ISG. En effet, les protéines non structurales des DENV, WNV, YFV et ZIKV telles que NS2A, NS4A, NS4B, NS5 peuvent aussi diminuer l'activité de STAT1/STAT2 soit en dégradant directement STAT2 soit en bloquant sa phosphorylation ou celle des protéines JAK1 et TYK2 <sup>64,65</sup>. Récemment, l'activité inhibitrice de la protéine NS5 du WNV sur l'expression de l'IFNAR1 à la surface des cellules a également été montrée. Tous ces mécanismes mis en place ainsi que l'évolution des virus sont des facteurs contribuant à l'émergence des *flavivirus*.



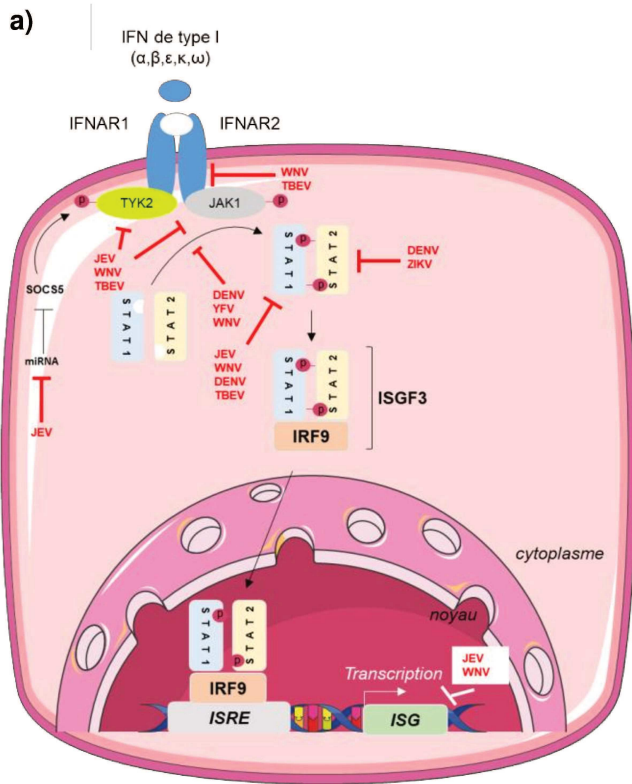


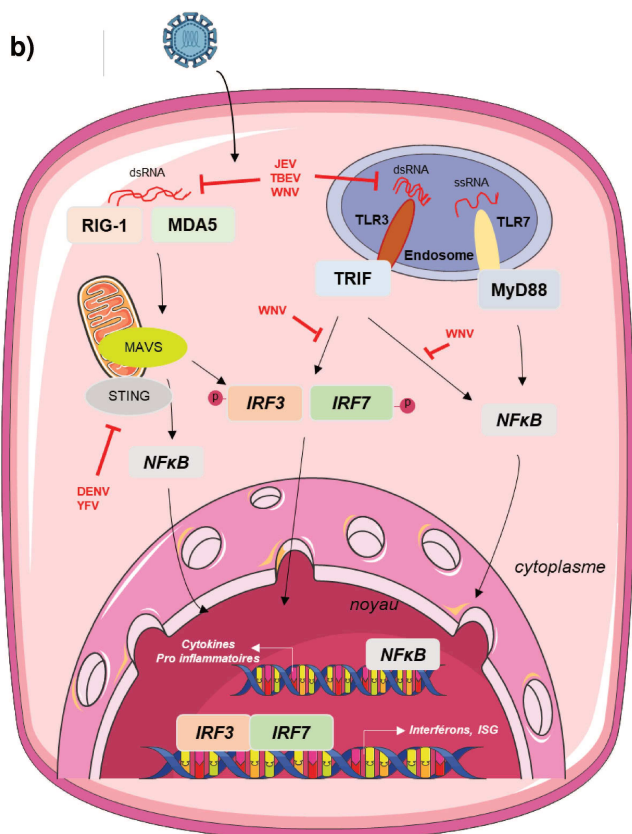
Figure 14. Stratégies d'évasion des *flavivirus*.

a) Il est démontré que les mécanismes d'évasion des *flavivirus* comprennent : le blocage de la phosphorylation de Tyk2 et Jak1, la réduction de l'expression du gène STAT2, l'inhibition de la signalisation STAT, la régulation à la baisse de l'IFNAR et l'altération des fonctions des ISG.

b) Il est démontré que les mécanismes d'évasion des *flavivirus* comprennent : un retard dans la reconnaissance de l'ARN viral par les PRR ; une atténuation de la signalisation de TLR.

Les signes stop rouge et blanc indiquent les stratégies utilisées par les *flavivirus* pour échapper à la réponse de l'immunité innée.

(Adapté de: review immune evasion strategies of flaviviruses, Images Servier Medical Art)



## II. Le virus Zika

### 1. Origine

Le ZIKV tient son nom d'une forêt appelée Zika dans l'Est de l'Afrique, en Ouganda, située à proximité de la capitale Kampala, où des chercheurs de l'université Rockefeller surveillaient la circulation d'YFV chez les singes (les macaques) en 1947<sup>66</sup>. Les singes ont été mis dans des cages sur des plateformes au sommet des arbres où ils ont été piqués par les moustiques *Aedes africanus* (*Ae. africanus*) et finalement infectés par l'YFV. Les chercheurs ont saigné les singes atteints de fièvre et ont isolé le virus dans leur sang. Au cours d'une expérience en 1947, ce n'est pas l'YFV qu'ils ont isolé mais un nouveau virus qu'ils ont appelé Zika. Un an plus tard, au même endroit, alors qu'ils examinaient des moustiques *Ae. africanus* qui avaient été recueillis, des chercheurs tentaient à nouveau d'isoler l'YFV mais ils ont trouvé le même virus découvert un an auparavant chez le singe : le ZIKV<sup>67</sup>. Il a été isolé plus tardivement chez l'Homme en 1954 au Nigeria<sup>68</sup>.

### 2. Phylogénie virale et variation génétique

Le ZIKV est antigéniquement et phylogénétiquement apparenté au virus Spondweni avec lequel il compose un clade restreint<sup>69</sup>. Des analyses phylogénétiques ont montré que le ZIKV est composé d'une lignée africaine et d'une lignée asiatique<sup>70-72</sup>. L'analyse phylogénétique des souches du ZIKV a permis d'identifier un certain nombre de substitutions d'aa. Les analyses se sont faites sur des souches virales comprenant à la fois les lignées pré-épidémiques africaines et asiatiques qui étaient pour la plupart des isolats de moustiques et des souches épidémiques trouvées chez l'Homme. La comparaison des lignées africaines et asiatiques du ZIKV a révélé 75 substitutions d'aa. Il est intéressant de noter que 24 changements d'aa ont été découverts dans les souches ZIKV de lignée asiatique post-épidémiques par rapport aux souches pré-épidémiques<sup>73</sup>. D'autres études phylogénétiques indiquent 89% d'identités entre le génotype ZIKV Afrique et le génotype ZIKV qui a circulé sur le continent américain. De plus, elles montrent aussi que la souche ayant circulé sur le continent américain est associée plus étroitement aux souches ZIKV Asie ayant circulées en Polynésie française lors de l'épidémie 2013-2014<sup>74</sup>. Les substitutions d'aa ont été identifiées dans tout le génome viral mais avec une concentration majeure au niveau des protéines E et prM. Ces sites étant importants pour l'attachement et

l'entrée du virus, ils peuvent jouer un rôle dans la virulence et la pathogénicité des souches endémiques. Pour le ZIKV, il a été montré qu'une seule substitution sérine-asparagine [Ser139→Asn139 (S139N)] dans sa polyprotéine virale a considérablement augmenté son infectivité dans les cellules progénitrices neurales humaines et murines et a conduit à une microcéphalie plus grave chez le fœtus de souris ainsi qu'à des taux de mortalité plus élevés chez les souris néonatales. L'analyse de l'évolution indique que la substitution du S139N est apparue avant l'épidémie de 2013 en Polynésie française et s'est maintenue de manière stable pendant la propagation ultérieure vers les Amériques <sup>75</sup>. Ces résultats mettent en évidence que les mutations acquises au cours de l'évolution des *flavivirus* peuvent modifier leur virulence et/ou leur tropisme <sup>76</sup>. De plus, des résultats d'analyses phylogéniques indiquent une variabilité dans le gène prM entre la lignée asiatique et africaine <sup>77,78</sup>. En effet, il existe des différences intrinsèques dans la pathogénicité et la virulence des souches ZIKV de lignées africaine et asiatique <sup>79</sup>. Pour le ZIKV, l'adaptation des vecteurs (moustiques) et la facilité de transmission du virus peuvent être liées à la perte du site de glycosylation N154 dans la protéine E <sup>80</sup>. La glycosylation (le glycane est attaché à l'azote du groupement amide d'une asparagine) est une modification post-traductionnelle courante qui a des effets importants sur la conformation et la fonction des protéines. Pour de nombreux *flavivirus*, la glycosylation au niveau de la protéine E a un impact sur l'aptitude virale, l'infectivité, la réplication et la virulence qui se traduit par des modifications de la neurovirulence et de la pathogénèse <sup>81</sup>.

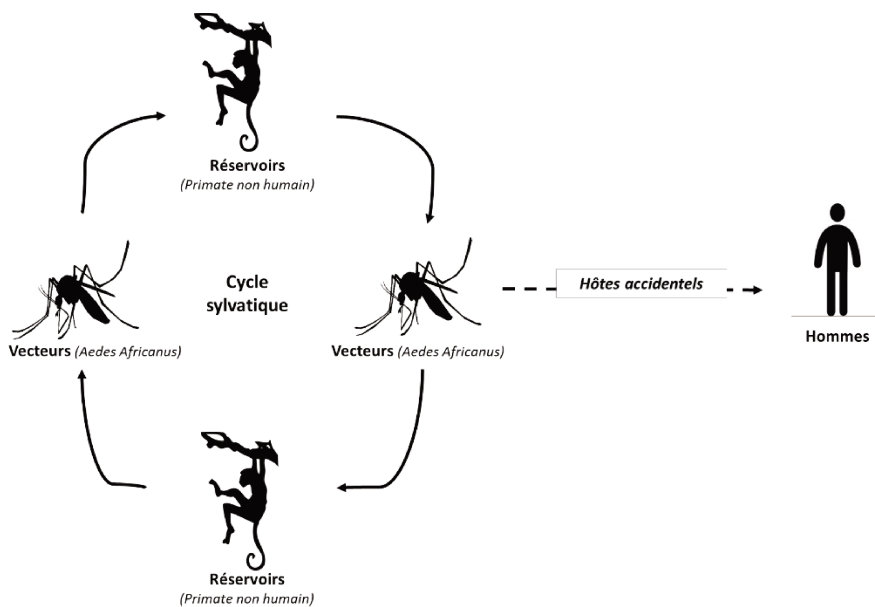
### **3. Cycle de transmission**

Il existe différents modes de transmission pour le ZIKV : transmission vectorielle, transmission de la mère à l'enfant, transmission sexuelle et transmission par d'autres fluides biologiques.

#### **a. Transmission vectorielle**

Il existe deux cycles de transmission pour le ZIKV : un cycle sylvatique (**figure 15**) et un cycle urbain (**figure 16**). Le cycle sylvatique fait intervenir des primates non humains (singes) comme réservoir et les moustiques du genre *Ae. africanus* comme vecteur <sup>82</sup>. En effet, lors d'une piqûre, le moustique se contamine en prélevant le virus dans le sang d'un primate non humain infecté. Le virus se multiplie ensuite dans le

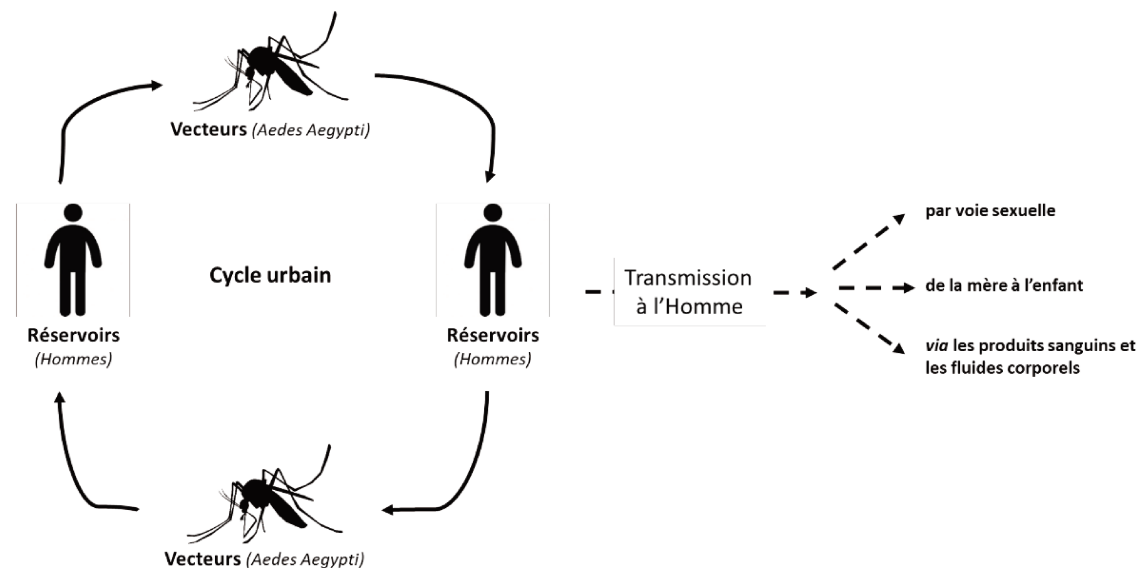
moustique qui pourra, à l'occasion d'une autre piqûre, transmettre le virus à un nouveau primate non humain ou accidentellement à une nouvelle personne. Au cours du cycle sylvatique l'Homme peut servir d'hôte occasionnel. Cependant, dans les régions où il n'y a pas de primates non humains, l'Homme sert probablement d'hôte primaire <sup>72,82</sup>



**Figure 15. Cycle de transmission du virus Zika, cycle sylvatique.**

**Cycle sylvatique impliquant des réservoirs primates non humains et un vecteur (moustiques principalement de type Aedes). L'Homme est un hôte accidentel.**

Le ZIKV se transmet également *via* un cycle urbain, c'est ce que nous observons principalement aujourd'hui. Ce cycle fait intervenir principalement les moustiques du genre *Ae. aegypti* comme vecteur et les primates humains comme réservoir. Le ZIKV peut également être transmis par voie sexuelle, de la mère à l'enfant ou bien *via* les produits sanguins et les fluides corporels <sup>82</sup>.



**Figure 16. Cycle de transmission du virus Zika, cycle urbain.**

**Cycle urbain impliquant des réservoirs primates humains et un vecteur (moustiques principalement de type *Aedes*). L'Homme peut transmettre à son tour le virus à l'Homme par transmission sexuelle, par transmission de la mère à l'enfant ou *via* les fluides corporels.**

### **b. Transmission par voie sexuelle**

Le ZIKV peut aussi être transmis par voie sexuelle. Cette transmission a été suspectée en 2008, lorsqu'un scientifique infecté au Sénégal a transmis le virus à sa femme à son retour aux États-Unis et en 2013 lorsque des particules virales infectieuses ont été détectées dans le sperme d'un patient de Polynésie française <sup>66,83</sup>. La transmission sexuelle du ZIKV a depuis été documentée lorsque des personnes vivant dans des zones non endémiques ont été infectées après des rapports sexuels avec des partenaires revenant de zones endémiques. La transmission sexuelle est possible à partir d'infections asymptomatiques et symptomatiques lors de rapports sexuels génitaux, oraux et anaux et par contact d'homme à homme, d'homme à femme et de femme à homme <sup>84</sup>. La transmission sexuelle peut avoir lieu au moins jusqu'à 44 jours après l'apparition des symptômes ; des particules virales infectieuses ont été isolées jusqu'à 69 jours après l'apparition des symptômes dans le sperme et jusqu'à 2 jours après l'apparition des symptômes au niveau de l'appareil génital féminin <sup>85,86</sup>. Toutes les études menées qui ont testé le sperme pendant 6 mois ont montré qu'après une infection aiguë, l'homme peut être porteur du virus (ARN du virus détecté) pendant ce laps de temps <sup>86</sup>. Cependant, le virus n'est infectieux que pendant quelques semaines et il a été supposé que la transmission ne peut avoir lieu que pendant le

premier mois après une infection aiguë <sup>87</sup>. Bien que l'effet de la transmission sexuelle dans les zones où le virus est endémique soit difficile à évaluer, il a été estimé que 1% des infections à ZIKV signalées en Europe et aux États-Unis ont été acquises par transmission sexuelle <sup>88</sup>.

### **c. Transmission de la mère à l'enfant**

La transmission périnatale du ZIKV a été signalée pour la première fois lors de l'épidémie de Polynésie française en 2013 <sup>89</sup>. En effet, dans l'étude de *Besnard et al*, les auteurs décrivent les caractéristiques cliniques de deux cas de mères présentant des symptômes de l'infection peu avant ou peu après leur accouchement mais également de l'un de leurs nouveau-nés. 4 jours après l'accouchement, une RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) sur les sérums des mères et des nouveau-nés a mis en évidence une infection à ZIKV ce qui suggère que l'infection des nourrissons s'est très probablement produite par transmission transplacentaire ou pendant l'accouchement <sup>89</sup>. La détection de l'ARN viral dans le liquide amniotique, le placenta, le tissu cérébral des fœtus et des nourrissons atteints de microcéphalie et les taux élevés de microcéphalie chez les enfants nés de mères atteintes d'une infection aiguë avérée par le ZIKV pendant la grossesse ont fourni des preuves solides liant les anomalies du SNC à l'infection maternelle <sup>90-93</sup>. Par ailleurs, des particules virales infectieuses du ZIKV ont aussi été détectées dans le lait maternel d'une femme infectée en Nouvelle Calédonie mais la transmission néonatale par l'allaitement n'a pas été décrite jusqu'à présent <sup>94,95</sup>.

### **d. Autres modes de transmission**

Comme le virus circule dans le sang pendant une infection aiguë, la transmission est possible *via* le sang et les produits du sang. En effet, un cas de transmission a été décrit par transfusion de plaquettes au Brésil en 2016 <sup>96</sup>. De plus, le potentiel d'infection par le ZIKV transmis par transfusion a été suspecté en Polynésie française après que l'ARN viral ait été détecté chez 2,8 % (42/1505) des donneurs de sang asymptomatiques en 2014 <sup>66</sup> et qu'il ait été confirmé à Porto Rico en 2016, 1,1 % des donneurs de sang ayant été identifiés comme virémiques <sup>97</sup>. En 2017, des donneurs de sang asymptomatiques à ARN positif pour le ZIKV ont été détectés en Floride et au Texas <sup>98,99</sup>. D'autres fluides corporels tels que la salive, les larmes ou les urines peuvent être incriminés mais cela reste très rare. Aux États-Unis, il a été décrit

un cas de transmission interhumaine entre un homme de 73 ans et son fils où la seule exposition retrouvée est un contact avec les larmes et la sueur de la personne infectée avec une charge virale très élevée <sup>100</sup>. Enfin, des particules infectieuses du ZIKV dans la salive et l'urine durant la phase aigüe chez des patients ont été isolés dans l'Etat de Rio de Janeiro au Brésil <sup>101-103</sup>.

#### **4. Vecteurs**

La transmission par les moustiques est le principal mécanisme de propagation du ZIKV. Le ZIKV est majoritairement transmis dans l'environnement urbain par les moustiques du genre *Aedes* (sous-genre *stegomyia*) qui transmettent également le DENV, le CHIKV et l'YFV <sup>66</sup>. *Ae. aegypti* est le principal vecteur de la transmission horizontale du ZIKV à l'Homme alors que *Ae. africanus* est le principal vecteur de la transmission du ZIKV aux primates non humains <sup>80,104</sup>. *Ae. aegypti* est principalement anthropophile, c'est-à-dire qu'il se nourrit majoritairement sur l'Homme <sup>105</sup>. Au cours des dernières décennies, *Ae. aegypti* a colonisé une grande partie des zones urbaines des pays tropicaux <sup>106</sup>. *Ae. albopictus*, le moustique tigre, un cousin d'*Ae. aegypti*, qui a une plus grande distribution dans les zones tempérées est un vecteur compétitif qui pourrait porter et transmettre le ZIKV <sup>107,108</sup>. En effet, un cas de transmission potentiellement par *Ae. albopictus* dans l'environnement a été observé il y a quelques mois à Hyères dans le sud de la France où des cas de transmission autochtone ou locale du ZIKV ont été très récemment documentés <sup>109</sup>. D'autre part, après 2 ans de collection, plusieurs isolats du ZIKV ont été obtenus à partir d'*Aedes* en Afrique (*Ae. africanus*) et en Malaisie (*Ae. aegypti*) impliquant ces espèces comme de probables vecteurs épidémiques ou enzootiques <sup>110,111</sup>. Dans la littérature, il a été décrit comme potentiel vecteurs pour le ZIKV: *Ae. africanus*, *Ae. apicoargenteus*, *Ae. dalzieli*, *Ae. furcifer*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. vittatus*, *Ae. gambiae*, *Ae. hirsutus*, *Ae. metallicus*, *Ae. opok*, *Ae. taylori*, *Ae. unilineatus*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. hensilii*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. fowleri* et *Ae. neoafricanus* <sup>67,111,120-126,112-119</sup>. Au début des épidémies associées à ce virus, il a été suggéré que d'autres espèces, comme les *Culex* ou les *Anopheles* (*An. uniformis*, *An. coustani*, *Cx. perfuscus*) <sup>113,127-129</sup> pouvaient servir de vecteur pour le virus mais les études menées depuis réfutent cette théorie. Enfin, les modèles prédictifs suggèrent que la distribution géographique d'*Ae. aegypti* continuera à s'étendre en raison de la croissance et des mouvements de population, de l'urbanisation et du changement climatique <sup>130</sup>.

## **5. Réservoir animal**

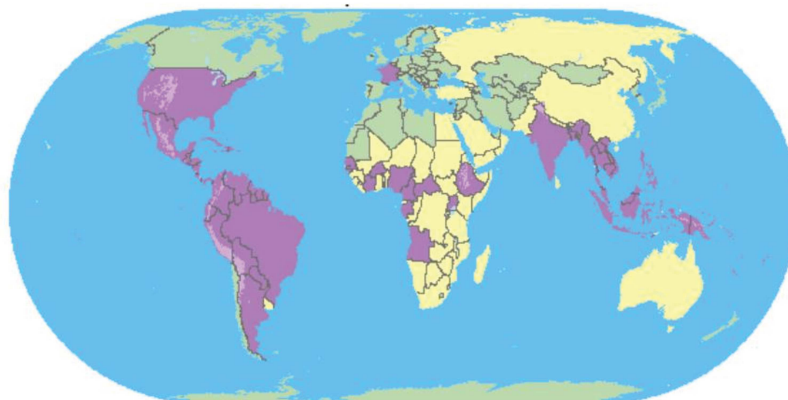
A l'heure actuelle, les primates humains et non humains (Singes rhésus : *Macaca mulatta*, Grivets : *Cercopithecus aethiops*, Singes à queue rouge : *Cercopithecus ascanius*, Colobe d'Abyssinie : *Colobus guereza*, Babouins : *Papio cynocephalus*, Mangabey : *Cercocebus*, Singes Mona : *Cercopithecus mona*, Orangs-outans : *Pongo*) sont les principaux réservoirs du ZIKV <sup>67,131-137</sup>. Des anticorps contre le ZIKV ont été détectés lors des études de sérosurveillance chez les chèvres, les rongeurs (*Meriones hurrianae* et *Tatera indica*), les moutons et les chauves-souris <sup>138</sup> ainsi que chez d'autres mammifères y compris les zèbres et les éléphants. Ils ont été suggérés comme hôtes vertébrés possibles du ZIKV en Afrique et en Asie <sup>67,133,137-140</sup>. Cependant, malgré ces données il n'y a pas d'association claire entre le ZIKV et une espèce animale spécifique qui pourrait servir de réservoir hôte <sup>66</sup>.

## **6. Epidémiologie : distribution géographique**

Le ZIKV a été découvert pour la première fois en 1947 chez le singe puis en 1948 chez des moustiques du genre *Ae. africanus* <sup>67</sup>. La première infection humaine a été signalée en 1954 au Nigeria <sup>68</sup>. Ensuite, une seconde infection humaine a été signalée en Ouganda en 1962 <sup>141</sup>. Par la suite, des données sérologiques et entomologiques ont indiqué des infections à ZIKV sur le continent africain : au Nigeria en 1971 et 1975 <sup>139</sup>, en république de Sierra Leone en 1972 <sup>142</sup>, au Gabon en 1975 <sup>143</sup>, en Ouganda en 1969 et 1970 <sup>133</sup>, en République Centrafricaine en 1979 <sup>144</sup>, au Sénégal de 1988 à 1991 <sup>145</sup> et en Côte d'Ivoire en 1999 <sup>146</sup>. Ainsi, la transmission silencieuse en l'absence de maladie grave et de grandes épidémies a permis à l'infection par le ZIKV de passer inaperçue tout en se répandant en Afrique et en Asie, avec moins de 20 infections humaines traitées en 60 ans <sup>66</sup>. Dans les années 1970, le virus s'est déplacé en Asie du sud-est où il a été identifié au Pakistan <sup>138</sup>, en Malaisie <sup>115</sup>, en Thaïlande et en Indonésie <sup>117</sup>. Le dernier changement remonte aux années 2000 quand le ZIKV est passé au-delà de l'Océan Pacifique. Il a atteint Yap en Micronésie en 2007 où 73% des résidents âgés de plus de 3 ans ont eu des preuves sérologiques récentes d'infection à ZIKV <sup>147</sup>. En 2013, il est arrivé en Polynésie française où il a été responsable d'une grande épidémie qui a touché environ la moitié de la population <sup>123</sup>. Probablement entre 2013 et 2015, le virus s'est dispersé et il est arrivé en Amérique Latine, où en 2015 et 2016, il a été responsable d'une épidémie massive avec un pic au Brésil avant d'atteindre l'Amérique Centrale, les Caraïbes et



les États-Unis alors que le ZIKV continuait à circuler dans les îles du Pacifique en 2016-2017 <sup>148</sup>. La transmission du ZIKV s'est également produite chez les voyageurs qui revenaient des régions où le virus circulait vers des pays non endémiques, notamment aux États-Unis, au Canada, au Japon, aux Maldives, au Vanuatu et en Europe occidentale <sup>149</sup>. Le ZIKV sur le continent américain a provoqué en 2016 une petite épidémie en Floride où 1107 cas ont été décrits dont 218 cas autochtones. Durant cette même période, 6 cas autochtones ont également été rapportés au Texas. En France métropolitaine, entre le 1<sup>er</sup> janvier et le 24 novembre 2016, 1 109 cas importés et 11 cas par transmission sexuelle ont été confirmés biologiquement <sup>150</sup>. En janvier 2017, presque tous les pays d'Amérique Latine et des Caraïbes ont signalé une circulation active du ZIKV <sup>66,123,147,148,151</sup> (**figure 17**). Les souches de virus qui ont émergé dans le Pacifique, les Amériques, l'Afrique (Cap-Vert) et l'Asie du Sud-Est (Singapour) étaient toutes issues de la lignée asiatique. Il existe de ce fait de nombreux isolats du ZIKV issus principalement de moustique ou d'Homme.



**Figure 17. Distribution du virus Zika et régions à risques.**

En violet foncé sont représentés les pays ou les territoires ayant déjà signalé des cas de ZIKV. En violet clair sont représentés les zones à faible probabilité d'infection par le ZIKV en raison de leur haute altitude (plus de 2 000 mètres) car les moustiques ne s'y développent pas. En jaune sont représentés les pays ou territoire avec la présence du moustique *Ae. aegypti* mais aucun cas de Zika signalé. En vert sont représentés les pays ou territoires où il n'y a pas *Ae. aegypti* qui propagent Zika.

(Source: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/zika-information>)

## **7. Manifestations cliniques chez l'Homme**

Le pourcentage d'infections asymptomatiques chez l'Homme pour le ZIKV est d'environ 50 à 80% <sup>152</sup>. Les symptômes se développent suite à une piqûre par un moustique infecté par le ZIKV avec une période d'incubation de 2 à 14 jours. Certaines personnes vont développer des symptômes légers tels qu'une fièvre et des symptômes pseudo-grippaux comme des douleurs articulaires, des conjonctivites, des céphalées et des douleurs myalgiques ou encore une éruption cutanée. Ces symptômes ne durent en moyenne que 4-5 jours puis disparaissent. Cependant, certaines personnes peuvent développer des complications plus graves notamment des complications neurologiques qui résultent de la réponse immunitaire post-infectieuse ou du neurotropisme viral direct <sup>153</sup>.

### **a. Complications chez l'adulte**

Une des complications suite à l'infection du ZIKV est le syndrome de Guillain-Barré (SGB) <sup>154</sup>. Ce syndrome est une paralysie potentiellement grave qui se définit par une faiblesse et un engourdissement partant des pieds et des jambes avant de remonter vers le haut du corps entraînant parfois des problèmes respiratoires, voire le décès du patient. L'incidence du SGB lors des épidémies du ZIKV varie selon les pays et a été jusqu'à 20 fois supérieure à la valeur de référence en Polynésie française et 10 fois supérieure à la valeur de référence au Venezuela <sup>66,155</sup>. Le syndrome de Miller-Fisher (un sous-ensemble du SGB caractérisé par l'ophtalmoplégie, l'ataxie et l'aréflexie), le sous-type de neuropathie motrice axonale aiguë du SGB et le sous type polyneuropathie inflammatoire démyélinisante aiguë ont été également observés en association avec le SGB lié au ZIKV <sup>154,155</sup>. La pathogénèse du SGB associée au ZIKV est encore inconnue : les mécanismes neuropathogènes directs, la réponse immunitaire hyper aiguë, la dérégulation immunitaire et le mimétisme moléculaire contre les antigènes nerveux sont autant d'hypothèses <sup>156</sup>. D'autre part, il existe d'autres complications plus rares liées à l'infection par le ZIKV comprenant l'encéphalite (inflammation de l'encéphale), la méningite (inflammation des méninges), la méningo-encéphalite (inflammation de l'encéphale et des méninges), la myélite (inflammation de la moelle épinière), la paresthésie (trouble du sens du toucher), la paralysie faciale, la photophobie, l'inflammation intraoculaire, l'iridocyclite hypertensive (inflammation de l'iris et du corps ciliaire) et des troubles auditifs <sup>157-161</sup>. Au total, 51 décès adultes associés à l'infection par le ZIKV ont été recensés dans

neuf pays (Etats-Unis, Porto Rico, Brésil, Suriname, Colombie, République Dominicaine, Guadeloupe, Martinique et Bolivie) <sup>162</sup>.

### **b. Complications chez les fœtus et les nouveau-nés**

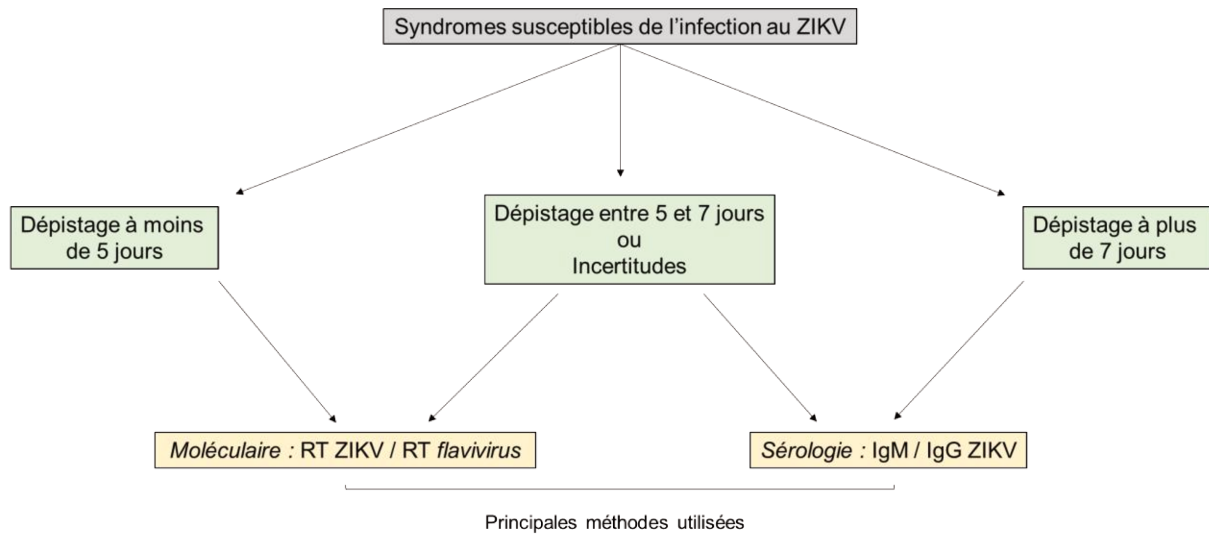
La microcéphalie se définit par une circonférence de la tête inférieure ou égale à 2 écarts-types en dessous de la moyenne pour le sexe et l'âge gestationnel à la naissance. Elle intervient chez des enfants nés de mères infectées. Les nourissons présentent une réduction du périmètre crânien qui est lié au développement retardé du cerveau après infection par le ZIKV des cellules souches neurales pendant les 6 à 10 premières semaines, c'est-à-dire le premier trimestre de grossesse <sup>163-165</sup>. D'autres anomalies ont été observées chez les fœtus et les nouveau-nés comme la ventriculomégalie (taille anormalement augmentée des ventricules cérébraux latéraux du fœtus), les calcifications subcorticales, la lissencéphalie, l'atrophie cérébrale, la gyration cérébrale fœtale anormale, le développement cortical anormal et les anomalies oculaires qui peuvent entraîner un retard mental grave et des handicaps moteurs importants ainsi que des comportements épileptiques, des déficiences visuelles et auditives <sup>166-172</sup>. Un ralentissement de la croissance de la tête a été également signalé chez des nourissons nés avec un périmètre crânien normal entraînant le développement d'une microcéphalie après la naissance <sup>173</sup>. Enfin, certains enfants présentent, durant leur développement, des problèmes neurologiques notamment cognitif <sup>174</sup>.

### **8. Diagnostic**

Le diagnostic biologique du ZIKV se fait avec des techniques virologiques directes si le patient est vu dans les premiers jours après l'apparition des symptômes (généralement jusqu'à 7 jours) ou si le patient vient au-delà des 7 jours, des techniques sérologiques sont utilisées (**figure 18**). Les techniques de virologies directes permettent la détection du virus ou des particules virales. La RT-PCR et l'isolement du virus ont été utilisés pour identifier respectivement l'ARN du ZIKV et le virus infectieux. La RT-PCR est le test le plus apprécié en raison de sa sensibilité et de sa spécificité élevée tandis que l'isolement du virus est la méthode de référence mais nécessite davantage d'installations de laboratoire pour la culture cellulaire <sup>71,83</sup>. La recherche du génome (ARN) du virus dans le sang et dans les urines peut être fait en général jusqu'à 5 jours dans le sang et jusqu'à 10 jours pour les urines <sup>102,175</sup>. En ce qui concerne la

RT-PCR spécifique au ZIKV, plusieurs amorces ciblant les gènes des protéines structurales et non structurales ont été mises au point <sup>71,176-178</sup>. Récemment, une RT-PCR ciblant l'ARN antisens du ZIKV a été développée pour évaluer la réplication du ZIKV <sup>179</sup>. De plus, pour identifier les échantillons dans lesquels des quantités résiduelles du génome de l'ARN du ZIKV pourraient être détectées, une méthode rapide et à haut débit a été mise en place en utilisant la technologie d'amplification à médiation par transcription <sup>180</sup>.

La sérologie repose sur la détection d'immunoglobuline M (IgM) et d'immunoglobuline G (IgG) spécifiques par ELISA qui détecte les anticorps IgM dès 4-5 jours et jusqu'à 12 semaines ou plus après l'apparition des symptômes pour les IgG. Les échantillons de sérum peuvent être examinés par un ELISA IgG et par un ELISA IgM avec l'antigène du ZIKV et d'autres flavivirus (comme par exemple du DENV, du WNV et du TBEV) dû à la réaction croisée des anticorps <sup>181</sup>. Récemment, un ELISA basé sur le domaine III de la protéine E du ZIKV a été mis au point <sup>182</sup>. Les résultats positifs ou non concluants du test ELISA pour les Ig doivent être confirmés par un test de séroneutralisation <sup>66</sup>. En fait, à ce jour, seule l'utilisation d'approches de séroneutralisation virale permettrait de conclure précisément quant à la spécificité anti-ZIKV des anticorps détectés <sup>183</sup>. La séroneutralisation est un type de réaction qui met en évidence la présence dans le sérum d'anticorps neutralisant un virus. Cette technique consiste en la mise en contact du sérum avec le virus recherché sur un tapis cellulaire. Si les anticorps sont présents dans le sérum il n'y a pas d'effet cytopathogène (ECP) observés par contre si les anticorps sont absents, un ECP sera présent. Cette technique permet de quantifier la quantité d'anticorps d'un virus donné mais également de caractériser les anticorps. Enfin, les antigènes du ZIKV peuvent être aussi détectés par immunohistochimie dans les tissus d'autopsie <sup>184</sup>. Grâce à cette technique, les antigènes du ZIKV ont été détectés dans le cerveau et les tissus placentaires de nouveau-nés infectés congénitalement et issus de fausses couches.



**Figure 18. Méthodes de diagnostic du virus Zika chez l'Homme.**

**Pour diagnostiquer la présence du ZIKV chez l'Homme il existe des tests moléculaires et/ou des tests de sérologie. Ces tests sont faits en fonction de la date de début des symptômes du patient.**

### III. Le virus Usutu

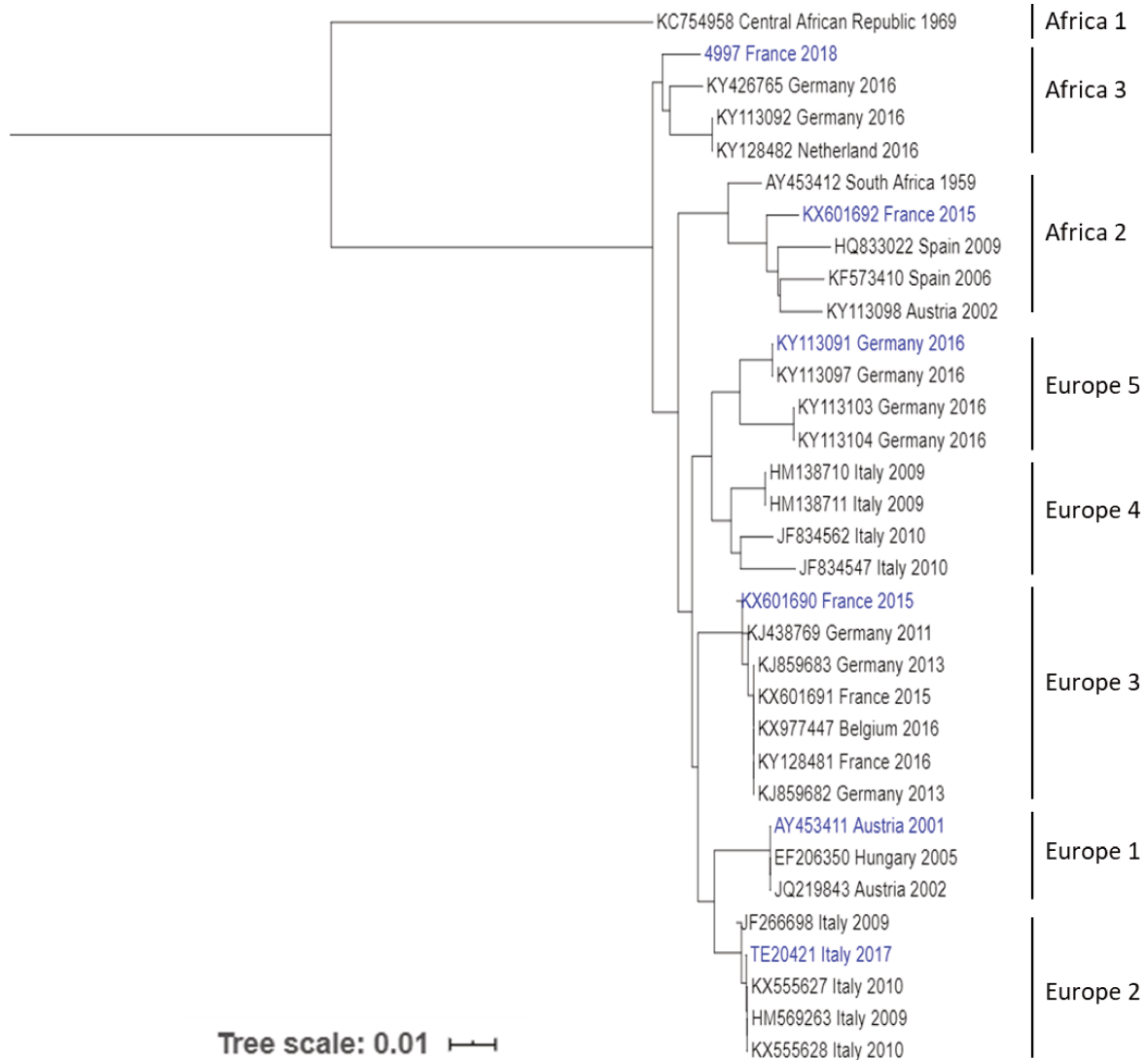
*Adapté de : Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, Baldet T, Foulongne V, Simonin Y (2019). Usutu virus: A new threat? Epidemiology and Infection 147, e232, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001213>*

#### **1. Origine**

L'USUV a été isolé pour la première fois en 1959 chez un moustique adulte femelle de l'espèce *Culex neavei* dans la région du Natal, en Afrique du Sud <sup>185</sup>. Son nom a été attribué d'après une rivière du Swaziland : Usutu <sup>186</sup>. C'est dans le cadre d'une étude sur la prévalence des arthropodes que *McIntosh* a isolé l'USUV pour la première fois. Il l'a ensuite amplifié par inoculation intracérébrale chez des souris <sup>185</sup>. Le 1<sup>er</sup> cas humain fut recensé en République Centrafricaine en 1981 <sup>187</sup>.

#### **2. Phylogénie virale et variation génétique**

L'USUV est membre du complexe antigénique de l'encéphalite japonaise composé aussi du MVEV et du WNV. En comparant l'USUV aux autres virus du complexe : le virus le plus proche phylogénétiquement à USUV est MVEV (nt : 73%, aa : 82%) suivi du JEV (nt : 71%, aa : 81%) et du WNV (nt : 68%, aa : 75%) <sup>188</sup>. Des études phylogénétiques réalisées sur la région du génome codant pour la protéine non structurale NS5 ont montré que les souches d'USUV isolées dans différentes régions du monde se répartissent en 8 lignées, avec deux lignées majeures basées sur des origines géographiques d'isolement : Afrique et Europe <sup>189</sup>. Les analyses génétiques démontrent que la lignée africaine est composée de 3 groupes distincts alors que la lignée européenne est composée de 5 lignées <sup>190</sup>. On observe ainsi les lignées Africa 1 <sup>191</sup>, Africa 2 <sup>188,192–195</sup>, Africa 3 <sup>190,192,195–198</sup>, Europe 1 <sup>188,189,196,199–201</sup>, Europe 2 <sup>196,202–204</sup>, Europe 3 <sup>195,196,198,205</sup>, Europe 4 <sup>199</sup> et Europe 5 <sup>190,206</sup> (**figure 19**).



**Figure 19. Arbre phylogénétique des souches du virus Usutu.**

Arbre phylogénétique basé sur le gène partiel NS5 et montrant le positionnement des isolats d'USUV utilisés dans l'article 3 (en bleu). Les séquences d'USUV sont marquées avec leur ID ou numéro d'accès GenBank respectif, précédé du pays et de l'année d'isolement. La barre d'échelle indique le nombre moyen de substitutions nucléotidiques par site. L'analyse a été effectuée par une analyse phylogénétique en ligne (<http://www.phylogeny.fr> ; Réseau National des Génomiques) et l'arbre a été enraciné avec une séquence USUV Africa 1 (numéro d'accèsion GenBank numéro KC754958).

L'identité des génomes parmi les virus isolés ont plus de 94 % de similitudes à l'exception de la souche CAR-1969 qui affiche une identité nucléotidique de 78.3% comparé aux autres souches. La comparaison des régions non traduites montre que le 5' UTR conserve une même taille et une même structure secondaire parmi les

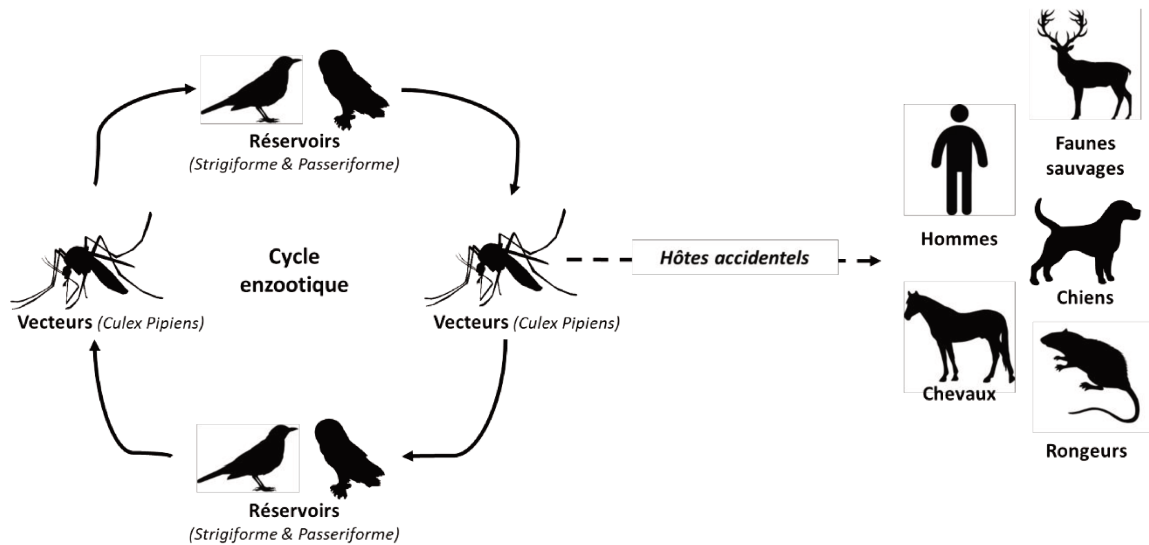
différentes lignées à l'exception d'Africa 1. En même temps, des mutations spécifiques nucléotidiques sont vues en 5' UTR entre les lignées africaines et européennes. Dans les régions 3' UTR, une hétérogénéité de taille très variable est observée entre les différentes lignées<sup>189,191,207</sup>. Une analyse comparative entre les génomes d'USUV révèle des mutations d'aa spécifiques reliées à des sources géographiques d'isolation et des hôtes. Les mutations spécifiques géographiques, principalement, toutes celles des lignées africaines sont trouvées dans les protéines de la capsid (a120v) et dans la protéine non structurale NS4B (M16I)<sup>189,191</sup>. De plus, des mutations spécifiques aux hôtes sont observées chez les oiseaux (protéine prM, Y120N) et chez les moustiques (protéine E, G195R). Chez les humains, des mutations d'aa uniques étaient trouvées dans la souche CAR-1981 (NS2A, S154L ; NS3, Y474H; NS5, H173Q), une souche d'USUV isolée d'un patient africain avec de la fièvre et une éruption cutanée<sup>189,191</sup> et dans la souche USUV Bologne/09, une souche isolée d'un patient avec une méningo-encéphalite en Italie. De plus, il a été émis l'hypothèse que des mutations spécifiques (S595G dans la protéine E et D3425E dans la protéine non structurale NS5) dans la souche de Bologne/09 seraient liées au tropisme altéré des cellules neurologiques humaines et à la capacité neuroinvasive de cette souche<sup>202</sup>. Pour finir, des mutations d'aa spécifiques de l'hôte dans les protéines de l'enveloppe (glycoprotéine) ont été trouvées dans une souche USUV isolée dans un donneur de sang sain en Allemagne<sup>208</sup>. Par exemple, pour l'USUV, des sites de N-glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr) aux positions 118 et 154 des aa ont été identifiés dans la protéine E<sup>191</sup>. Ces sites semblent être conservés dans toutes les souches d'USUV, cependant leur rôle dans le cycle de vie des *flavivirus* reste à être élucidé puisque des *flavivirus* déglycosylés peuvent conserver la même antigénicité<sup>191</sup>.

### **3. Cycle de transmission**

Le cycle naturel de transmission d'USUV est un cycle enzootique impliquant principalement les oiseaux passeriformes (exemples : merles, pies, ...) et strigiformes (exemple : chouettes laponnes) comme hôtes amplificateurs et les moustiques ornithophiles (*Culex*) comme vecteurs (**figure 20**). Des études ont démontré que de multiples oiseaux et espèces aviaires sont impliqués dans ce cycle, certains d'entre eux développant des symptômes associés à l'infection. Il a également été mis en évidence que plusieurs espèces de moustiques sont impliquées dans l'entretien du cycle viral au sein de l'avifaune. Les moustiques sont principalement responsables de



la transmission virale aux humains et aux chevaux qui sont considérés ensuite comme hôtes accidentels <sup>209–211</sup>. Actuellement, d'autres hôtes accidentels sont trouvés tels que les chiens, les rongeurs et certains animaux de la faune sauvage (*Cf. paragraphe réservoir animal*).



**Figure 20. Cycle de transmission du virus Usutu, cycle enzootique.**

**Cycle enzootique impliquant des réservoirs aviaires et un vecteur (moustiques principalement de type *Culex*). L'homme, le cheval, les chiens, les rongeurs et les animaux de la faune sauvage sont des hôtes accidentels sensibles et des culs-de-sac épidémiologiques.**

*(Adapté de: le virus Usutu : une menace fantôme)*

#### **4. Vecteurs**

L'USUV est principalement transmis par les moustiques du genre *Culex*. L'USUV a été découvert pour la première fois chez une femelle adulte *Culex neavei* en 1959 en Afrique du Sud <sup>185,186</sup>. Plus tardivement, l'USUV a été retrouvé chez plusieurs espèces de moustiques à travers le continent Africain, principalement dans les pays où des programmes de surveillance sont mis en œuvre tels que le Sénégal, la Côte d'Ivoire, le Nigéria, le Kenya, le Burkina Faso et l'Ouganda <sup>212</sup>. En 2014-2015, l'USUV a été détecté en Israël chez des moustiques de types *Culex*. En 2018, en Slovaquie, une surveillance de moustiques a montré que les moustiques étaient infectés par la lignée Europe 2 d'USUV (prévalence de 0,25%) <sup>213</sup>. Cette même année, une étude rétrospective a démontré la présence de différentes lignées d'USUV (Africa 2 et Africa 3) chez les moustiques *Culex pipiens* pour la première fois dans le sud-est

de la France, en Camargue <sup>192</sup>. L'USUV a aussi été détecté chez les moustiques du genre *Ae. albopictus* <sup>206</sup>. Des analyses de compétence vectorielle indiquent que les moustiques de ce genre ont une faible compétence pour l'USUV <sup>214</sup>. L'USUV a été également isolé chez les moustiques du genre : *Ae. caspius*, *Ae. japonicus*, *Ae. vexans*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles plumbeus*, *Ochlerotatus*, *Coquillettidia aurites*, *Coquillettidia richiardii*, *Culiseta annulata*, *Mansonia Africana*, *Culex perexiguus*, *Culex perfuscus*, *Culex univittatus*, *Culex modestus* <sup>186,215,224–233,216–223</sup> et *Culex quinquefasciatus* <sup>214,234</sup>. Récemment, une étude a mis en évidence qu'*Ae. japonicus* peut transmettre expérimentalement les ZIKV et USUV, de ce fait ils suggèrent de considérer ce moustique comme un vecteur potentiel de maladies arbovirales en Europe <sup>235</sup>. Le *Culex pipiens* est considéré comme le vecteur principal <sup>231–233</sup>. Ce dernier est un vecteur anthropophile impliqué dans l'émergence du virus en Europe <sup>236</sup>. Cependant, le *Culex neavei* est la seule espèce de moustique dont la compétence de vecteur pour l'USUV est connue, en effet, dans une étude cette espèce a été suggérée comme être impliquée dans la transmission sylvatique d'USUV en Afrique <sup>237</sup>.

## **5. Réservoir animal**

La présence d'USUV a été mise en évidence dans 143 espèces d'oiseaux provenant de 36 familles et de 19 ordres <sup>238</sup>. Différentes espèces migratrices telles que : *Falco tinnunculus*, *Acrocephalus scirpaceus*, *Sylvia curruca*, *Sylvia communis* et *Ficedula hypoleucas* seraient responsables de l'introduction d'USUV en Europe <sup>187</sup> alors que d'autres espèces vivant sur le territoire telles que : *Pica pica*, *Passer domesticus* et *Turdus merula* seraient responsables de sa propagation en Europe <sup>239</sup>. Une enquête sérologique menée en Autriche au cours des années 2000 a montré que le nombre d'oiseaux positifs à l'USUV augmentait chaque année et signalait la présence de sérologies positives chez les oiseaux de différents ordres *Strigiformes*, *Galliformes*, *Accipitriformes*, *Falconiformes*, *Piciformes*, *Columbiformes* et *Passeriformes*. Parmi les différentes espèces aviaires sensibles à l'infection par l'USUV, les merles noirs présentent le taux de mortalité le plus élevé <sup>240</sup>. Une étude rétrospective a révélé la présence de l'USUV en 1996 en Italie. Depuis, le virus a été trouvé chez des oiseaux résidents et sauvages en Autriche <sup>204</sup>, en Suisse <sup>241,246</sup>, en France <sup>242,243</sup>, en Allemagne <sup>205,238</sup>, en Belgique <sup>244,245</sup>, au Pays-Bas <sup>246</sup>, en Hongrie <sup>247</sup>, en République Tchèque <sup>196</sup>, au Mali <sup>248</sup> et à Madagascar <sup>248,249</sup>. Des études

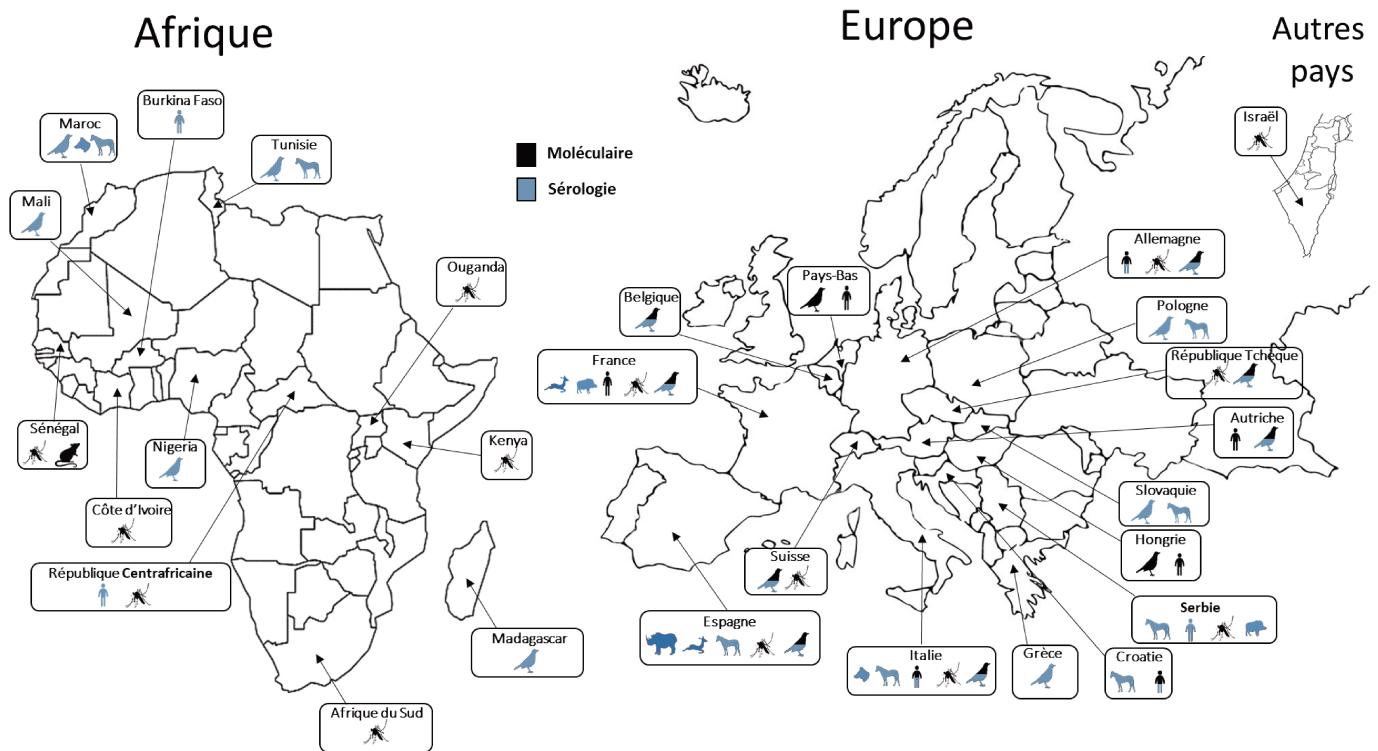
d'immunohistochimie et d'histopathologie mettent en évidence fréquemment une hépatomégalie et une splénomégalie chez les oiseaux infectés par l'USUV <sup>250</sup> ainsi que des lésions dans le cœur, le foie, les reins, la rate et le cerveau des oiseaux infectés <sup>201</sup>. Des troubles nerveux centraux ont également été rapportés avec comme symptômes principaux : une faiblesse, une prostration, une désorientation, une incoordination motrice et une perte de poids <sup>201</sup>. Les organes sont généralement congestionnés avec des foyers de nécrose, de gliose et des infiltrats inflammatoires surtout constitués de cellules lymphoïdes et d'histiocytes <sup>201</sup>. Des nodules gliaux et des neuronophagies ont également été observés dans le cerveau. La circulation d'USUV au sein d'une diversité d'oiseaux augmente probablement le risque de transmission vers des hôtes accidentels.

En effet, la circulation d'USUV a été rapportée suite à la détection d'anticorps spécifique du virus dans le sérum d'équidés en Italie <sup>210</sup>, en Serbie <sup>251</sup>, en Croatie <sup>252</sup>, en Slovaquie <sup>253</sup>, en Pologne <sup>254</sup>, au Maroc <sup>255</sup>, en Tunisie <sup>256</sup> et en Espagne <sup>257</sup>. Des tests sérologiques ont également montré la circulation d'USUV chez des chiens en Italie <sup>258</sup> et au Maroc <sup>255</sup> ainsi que chez des mammifères en Espagne <sup>259</sup>. La présence d'anticorps neutralisant spécifiques d'USUV a aussi été recensée chez les sangliers en Serbie <sup>260</sup> et en France <sup>198</sup>. De plus, des enquêtes sérologiques rétrospectives menées chez des ruminants sauvages collectés en Espagne <sup>261</sup> et en France <sup>198</sup> ont rapporté une prévalence d'anticorps spécifiques d'USUV. L'exposition naturelle à l'USUV a également été mise en évidence en Italie chez une espèce d'écureuil <sup>262</sup> ainsi que dans deux espèces de rongeurs (*Rattus rattus* et *Mastomys natalensis*) et une espèce de musaraigne (*Crocidura* sp.) au Sénégal <sup>263</sup>. Par ailleurs, des études en laboratoire sur des cochons d'inde, sur des rongeurs et sur des souris nouvellement nées et sevrées ont montré qu'ils étaient sensibles à une inoculation intracérébrale ou intrapéritonéale avec l'USUV <sup>264–266</sup>. L'infection de souriceaux par l'USUV donne lieu à des signes cliniques : désorientation, dépression, paraplégie, paralysie, coma et est associée à une mort neuronale dans le cerveau des animaux infectés ainsi qu'à une démyélinisation de la moelle épinière <sup>265</sup>. Les souris déficientes pour les récepteurs interférons de type I (*ifnar*<sup>-/-</sup>) étaient hautement susceptibles à l'infection d'USUV entraînant la mort des souris après 6 jours d'infection et la détection de l'ARN génomique viral dans leur cerveau <sup>267</sup>. Enfin, des études récentes utilisant des souris immunocompétentes âgées d'un mois ont mis en évidence que suite à l'infection

d'USUV presque toutes les souris survivent mais développent une infection neuroinvasive <sup>268</sup>.

## **6. Epidémiologie : distribution géographique**

Les analyses phylogénétiques suggèrent que des introductions successives d'USUV ont eu lieu en Europe le long des routes migratoires en provenance d'Afrique. Le virus a été introduit en Espagne à deux reprises dans les années 1950 et dans les années 1990, le long d'une route migratoire de l'Atlantique Est <sup>189</sup>. Une introduction unique en Europe centrale a eu lieu dans les années 1980 le long d'une route migratoire mer Noire/Méditerranée <sup>189,269</sup>. Ces découvertes suggèrent qu'USUV a été régulièrement introduit en Europe depuis 50 ans en provenance d'Afrique. La diversité génétique des lignées européennes est principalement déterminée par l'évolution *in situ*. Ainsi, l'adaptation de l'USUV à des populations de vecteurs et d'hôtes naïfs peut entraîner l'émergence de variantes locales du virus. Le scénario le plus probable pour les lignées européennes pourrait être un maintien enzootique (évolution *in situ*) similaire à celui observé pour le virus du Nil Occidental aux États-Unis. La lignée Europe 1 qui dérive d'un virus du Sénégal (Africa 2) et qui a atteint l'Espagne serait probablement à l'origine de la première épizootie en Europe centrale. Selon la même étude, les lignées Europe 2 et Europe 3 sont probablement originaires respectivement d'Autriche en 1993 et d'Italie en 2007. Suite à sa première identification en Afrique du Sud en 1959 <sup>185</sup>, l'USUV a été détecté dans d'autres pays d'Afrique tels qu'en République Centrafricaine <sup>187</sup>, au Sénégal <sup>114,187,270</sup>, en Côte d'Ivoire, au Nigeria, en Ouganda, au Burkina Faso, au Maroc, au Mali, au Kenya, à Madagascar et en Tunisie <sup>256</sup>. Il a ensuite été découvert en Europe et au Moyen-Orient, en Italie <sup>269</sup>, en Autriche <sup>204</sup>, en Serbie, en Suisse, en Espagne, en France, en Croatie, en Hongrie, en Pologne, en Slovaquie, en Grèce, en Allemagne, en Belgique, au Pays-Bas, en République Tchèque et en Israël <sup>206</sup> (**figure 21**). Diverses lignées d'USUV co-circulent en Europe <sup>205,271</sup>. En Allemagne, la circulation de cinq lignées d'USUV (Europe 2, Europe 3, Europe 5, Africa 2 et Africa 3) a été décrite <sup>221,238</sup> et en France, deux lignées (Africa 2 et Africa 3) ont été détectées chez des moustiques de la même région <sup>196</sup>.



**Figure 21. Distribution du virus Usutu dans le monde.**

**Pays concernés : Afrique du Sud, Allemagne, Autriche, Belgique, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Croatie, Espagne, France, Grèce, Hongrie, Israël, Italie, Kenya, Madagascar, Mali, Maroc, Nigeria, Ouganda, Pays-Bas, Pologne, République Centrafricaine, République Tchèque, Sénégal, Serbie, Slovaquie, Suisse et Tunisie. Les symboles indiquent les espèces dans lesquelles l'USUV a été détecté (hommes, oiseaux, moustiques, chevaux, chiens, sangliers, faunes sauvages, mammifères et rongeurs). La méthode d'identification (moléculaire ou sérologique) est indiquée pour chaque espèce.**

*(Adapté de: Usutu virus: A new threat?)*

## **7. Manifestations cliniques chez l'Homme**

On dénombre à ce jour 100 cas d'infection humaine par l'USUV rapportés dans la littérature (**table 2**). Il est actuellement encore impossible de dire si ces cas humains représentent la partie émergée de l'iceberg et si l'incidence des infections aiguës par l'USUV ne pourrait pas être plus importante. En effet, le 1<sup>er</sup> cas d'infection à USUV fut rapporté en République Centrafricaine en 1981 puis un second cas a été diagnostiqué au Burkina Faso en 2004 <sup>187</sup>. Pour ces deux cas africains, le tableau clinique était modéré avec un ictère fébrile associé à une éruption cutanée. En Italie, en 2009, deux cas de méningo-encéphalites associés à USUV ont été décrits chez des patients immunodéprimés. Il s'agissait d'une patiente présentant un lymphome B diffus à grandes cellules <sup>209</sup> et d'un patient transplanté hépatique <sup>211</sup>. Très rapidement après

cette première identification en Italie, la même équipe identifia 3 cas supplémentaires de méningo-encéphalites impliquant l'USUV entre 2008 et 2009 <sup>272</sup>. Toujours en Italie, une étude rétrospective a permis d'identifier sur la même période, 8 autres patients qui avaient tous présenté des tableaux variés de méningites et méningo-encéphalites ainsi que 2 cas asymptomatiques <sup>199</sup>. Six autres cas symptomatiques à type de méningites ou méningo-encéphalites ont été rapportés en Croatie <sup>273,274</sup>. En 2018, en Hongrie, un patient infecté par l'USUV a été identifié présentant une méningite aseptique <sup>275</sup>. Enfin en Italie, en 2018, sur 1 967 cas d'infection arbovirale autochtone 8 ont été identifiés comme étant associés à l'infection par l'USUV (un avec une maladie neuroinvasive, 6 avec de la fièvre et un donneur de sang virémique qui a développé une arthralgie et une myalgie) <sup>276</sup>. L'ensemble du spectre clinique de l'infection d'USUV nécessite d'être mieux décrit. Cela est par exemple illustré par la description récente en France, d'une infection aiguë par l'USUV associée à un probable tableau atypique de paralysie faciale *a frigore* <sup>194</sup>. En parallèle, des études sur des panels de sérums de donneurs de sang ont pu confirmer la détection régulière d'infections aiguës asymptomatiques à USUV. Ce fut le cas en Allemagne avec un donneur de sang asymptomatique positif pour l'USUV <sup>208</sup>, en Autriche avec 24 prélèvements de donneurs qui présentaient un signal USUV positif <sup>277</sup>, au Pays bas où 7 donneurs positifs à USUV ont été diagnostiqués <sup>278</sup> et également dans différentes régions d'Italie entre 2016 et 2018 où plusieurs donneurs de sang ont été testés positifs à USUV <sup>223,279,280</sup>. Si l'infection par l'USUV chez l'Homme peut donc être asymptomatique, certaines infections peuvent engendrer des complications neurologiques.

Pays	Année	Nombre	Echantillons	Clinique	Populations étudiées	Souches identifiées
RCA	1981	1	Sang	Fièvre éruptive	Cas clinique	Africa 3
Burkina Faso	2004	1	Sang	Fièvre et jaunice	Cas clinique	?
Italie	2009	1	LCR	Méningo-encéphalite	Cas clinique	Europe 1
	2009	1	Sang	Encéphalite	Cas clinique	Europe 2
	2008-2009	3/44	LCR	Méningo-encéphalite	Patient méningo-encéphalite	?
	2008/2011	8/306 + 2/609	LCR / Sang	Méningo-encéphalite / Sains	Patient méningo-encéphalite + divers sujets sains et malades	?
	2018	1/44	Sang	Sains	Donneur de sang	Europe 1
	2016/2018	25/73964	Sang	Sains	Donneur de sang	?
	2017/2018	9	Sang	Sains	Donneur de sang	Europe 2, Europe 3 et Europe 4
	2017/2018	8/1967	Sang / Urine	Maladies neuroinvasives / Fièvre / Arthralgie / Myalgie	Patients atteints d'une infection arbovirale suspectée	Europe 2
Croatie	2013	3/95	Sang	Méningo-encéphalite	Patient méningo-encéphalite	?
	2018	3/178	Sang / Urine	Maladies neuroinvasives	Cohorte neuroinvasive	Europe 2
Allemagne	2016	1	Sang	Sains	Donneur de sang	Europe 3
Pays Bas	2018	7/12040	Sang	Sains	Donneur de sang	Europe 3
France	2016	1/166	LCR	Paralysie faciale idiopathique	Patients avec infection et/ou signes neurologiques	Africa 2
Autriche	2017	6/12047	Sang	Sains	Donneur de sang	Europe 2
	2018	18/31598	Sang	Sains / Eruptions	Donneur de sang	Europe 2 et Africa 3
Hongrie	2018	1	Sang	Méningite aseptique	Donneur de sang	Europe 2

**Table 2. Description des cas humains du virus Usutu à travers le monde.**

**Tableau résumant les différentes infections d'USUV chez l'Homme décrites dans la littérature.**

*Abbréviations:* RCA, République Centrafricaine ; LCR, liquide céphalo-rachidien. (*Adapté de: USUV : a new threat ?*)

## **8. Diagnostic**

Le diagnostic d'une infection par l'USUV est compliqué chez l'Homme. Il est classiquement réalisé par la mise en évidence du génome viral dans le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou les urines des patients. Il peut éventuellement être déterminé par l'isolement du virus sur de la culture cellulaire ou encore par la détection d'anticorps spécifiques (IgM/IgG). A ce jour aucun test commercial de diagnostic n'est disponible. Les sérologies USUV sont effectuées par des tests ELISA ou par des approches d'immunofluorescence développées par certains laboratoires de référence à partir d'antigènes viraux ou de souches virales en culture. Ces tests manquent de spécificité et doivent être systématiquement contrôlés par des approches de neutralisation pour exclure les réactions croisées systématiques obtenues avec les anticorps dirigés contre les autres représentants des *flavivirus*, plus particulièrement le WNV. A ce jour, quasiment rien n'est connu sur la cinétique des anticorps anti-USUV et les interprétations sont généralement déduites des données acquises avec WNV.

Le diagnostic direct d'une infection par l'USUV peut être réalisé par culture cellulaire. De nombreuses cellules supportent la réplication virale et les plus utilisées restent les cellules d'insectes C6/36 ou les cellules Vero <sup>281</sup>. La culture virale reste réservée à des laboratoires spécialisés de référence et dans la plupart des études, la

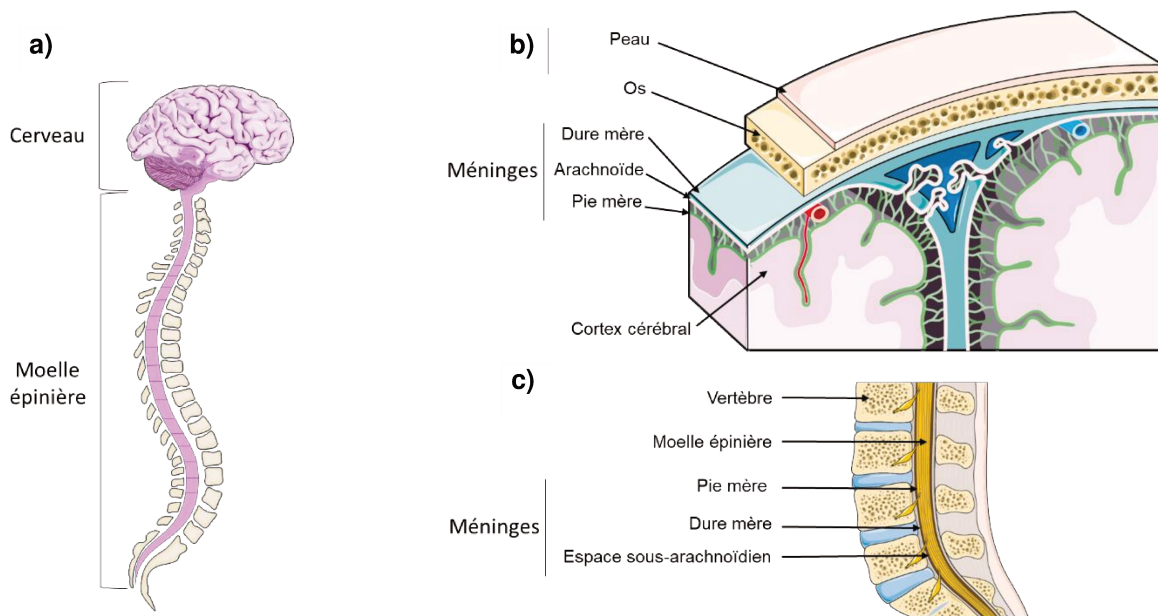
mise en évidence du virus passe par des approches moléculaires d'amplification de cibles génomiques virales. De plus, les techniques d'amplification de l'ARN de WNV utilisées lors de la qualification des dons de sang pour le risque WNV (type Cobas WNV, Roche) sont également capables de détecter les séquences d'USUV <sup>190,277</sup>. Toutefois, de nombreuses techniques de RT-PCR ont été décrites. Certaines approches PCR ont été développées pour être spécifiques des séquences d'USUV <sup>272,282</sup> ou être au contraire consensuelles de la plupart des *flavivirus* en ciblant une région conservée de 260 paires de bases du gène NS5 <sup>283-285</sup>. Pour ces dernières techniques, le typage du virus pouvant être réalisé dans un second temps par séquençage ou hybridation <sup>284</sup>. Cette approche « *pan flavivirus* » est certes un peu plus fastidieuse mais présente un double avantage. D'une part, elle ne cible pas spécifiquement l'agent initialement recherché ce qui peut être d'intérêt lors de surveillance combinée de pathogènes qui présentent des épidémiologies très proches, comme par exemple les USUV et WNV. D'autre part, le séquençage nécessaire pour l'identification de l'agent étiologique permet également une analyse phylogénétique des souches, en effet la région NS5, cible des PCR *pan flavivirus*, se révèle suffisamment discriminante pour la détermination des lignages viraux <sup>189,190</sup>.



## IV. Infection du système nerveux central

### 1. Description du système nerveux central

Le SNC est composé du cerveau et de la moelle épinière (**figure 22a**). Ces deux structures intègrent les informations provenant du système nerveux périphérique (SNP) et des organes sensoriels et envoient des signaux de sortie aux muscles squelettiques (dans le but d'un mouvement volontaire ou involontaire) et au système nerveux autonome qui régule les organes internes du corps <sup>286</sup>. La moelle épinière transporte les informations du SNP au cerveau et elle envoie également des informations motrices du cerveau aux systèmes moteurs somatiques et autonomes. Le cerveau à son tour, contrôle essentiellement toutes les fonctions corporelles (cognition de la parole, mouvements corporels, fonctionnement des organes) <sup>287</sup>. Le SNC est entouré et protégé par les méninges ainsi que par le LCR. Les méninges sont subdivisées en trois couches de l'extérieur vers l'intérieur : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère (**figure 22b,c**). La pie-mère est une structure constituée de tissu conjonctif vascularisé qui s'enveloppe autour de la moelle épinière et qui tapisse le parenchyme en suivant les sillons, les scissures et les circonvolutions du cortex cérébral. L'arachnoïde est une membrane avasculaire qui se trouve au-dessus de la pie-mère et au-dessous de la dure-mère. L'espace entre la pie-mère et l'arachnoïde est nommé espace sous-arachnoïdien qui contient le LCR qui amortit les chocs lors des mouvements et qui joue un rôle important dans la régulation de la pression intracrânienne. Le LCR permet également des échanges nutritifs et métaboliques avec le tissu nerveux ainsi que l'évacuation « des déchets » et des molécules provenant du cerveau. Enfin, la dure-mère est un tissu plus dur qui est attaché au crâne et à la couche arachnoïdienne.



**Figure 22. Système nerveux central.**

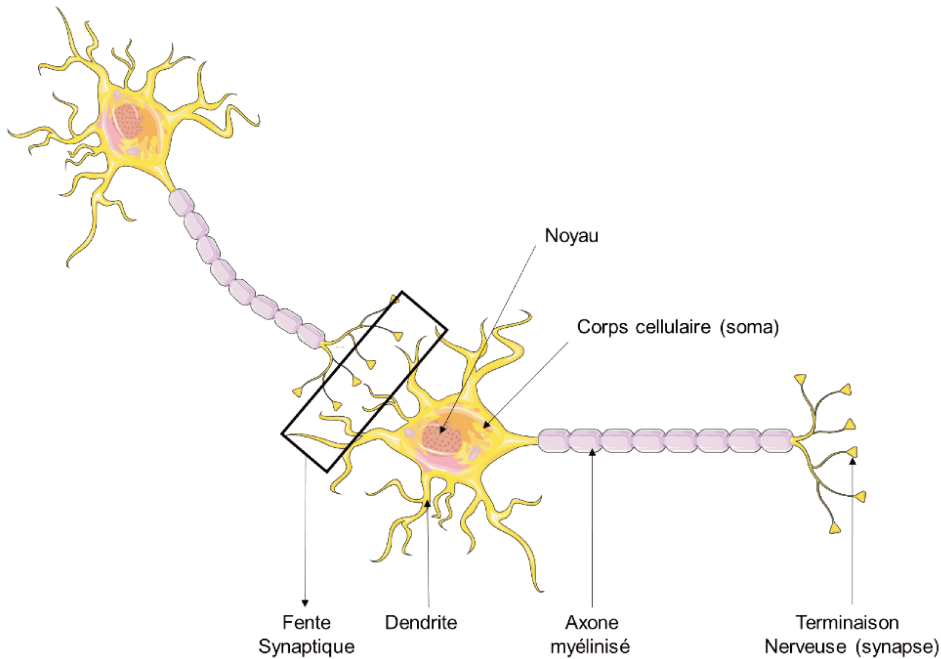
**a) Le SNC est constitué du cerveau et de la moelle épinière.**

**b) Les méninges au niveau cérébral et c) au niveau de la moelle épinière constituées de la dure-mère, de l'arachnoïde et de la pie-mère protègent le SNC.**

*(Source: Images Servier Medical Art)*

La moelle épinière et le cerveau sont en partie constitués de cellules nerveuses appelées neurones (**figure 23**). Les neurones sont composés d'un corps cellulaire (soma), de dendrites qui correspondent à de courtes extensions membranaires impliquées principalement dans la réception des signaux provenant d'autres neurones et d'un axone qui correspond à une unique protrusion membranaire qui peut être divisé en plusieurs branches et terminaisons (**figure 23**). Les axones des neurones peuvent être recouverts par une gaine de myéline qui correspond à l'enroulement de couches phospholipidiques concentriques de manière discontinue sur l'ensemble de l'axone. La myéline est un revêtement isolant permettant d'améliorer la vitesse de transmission du signal nerveux (potentiel d'action) <sup>288</sup>. Les neurones communiquent avec d'autres neurones par une structure spécialisée appelée synapse. Cette structure est composée de deux sous domaines : la pré-synapse qui est l'axone terminal et la post-synapse qui est une région membranaire spécialisée d'une dendrite ou d'un organe cible. Les deux compartiments sont séparés par une fente synaptique (**figure 23**). La communication neuronale est médiée par des signaux électriques et des composés chimiques appelés neurotransmetteurs. Les ions se déplacent dans des canaux situés à travers la membrane plasmique neuronale pour générer des signaux électriques. Les neurotransmetteurs sont libérés de la pré-synapse à la fente synaptique et se lient

ensuite à leurs récepteurs localisés à la post-synapse. Les synapses se produisent principalement entre les axones et les dendrites mais peuvent aussi être générées entre axone/soma, axone/axone, axone/organe cible ou dendrite-dendrite <sup>289</sup>.

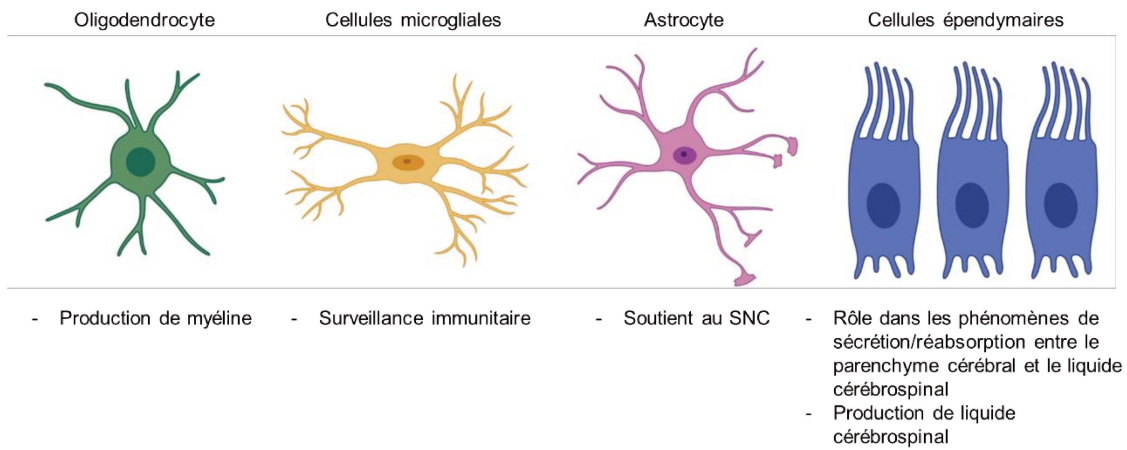


**Figure 23. Les neurones.**

**Les neurones sont constitués de dendrites, d'un corps cellulaire, d'un axone et de terminaisons synaptiques. Les neurones forment des synapses afin de communiquer entre eux.**

*(Source: Images Servier Medical Art)*

L'autre grand groupe de cellules du SNC est celui des névroglies, également appelées glies (**figure 24**). Il existe plusieurs types de cellules. Les oligodendrocytes produisent la myéline qui recouvre les fibres nerveuses du SNC, les cellules microgliales participent à la défense du tissu cérébral grâce à leurs fonctions immunitaires, les cellules épendymaires assurent la circulation du LCR dans les ventricules cérébraux et les astrocytes soutiennent le SNC en fournissant un environnement homéostatique ionique pour la signalisation neuronale, le développement des synapses, le stockage du glycogène et le maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE) <sup>290</sup>.

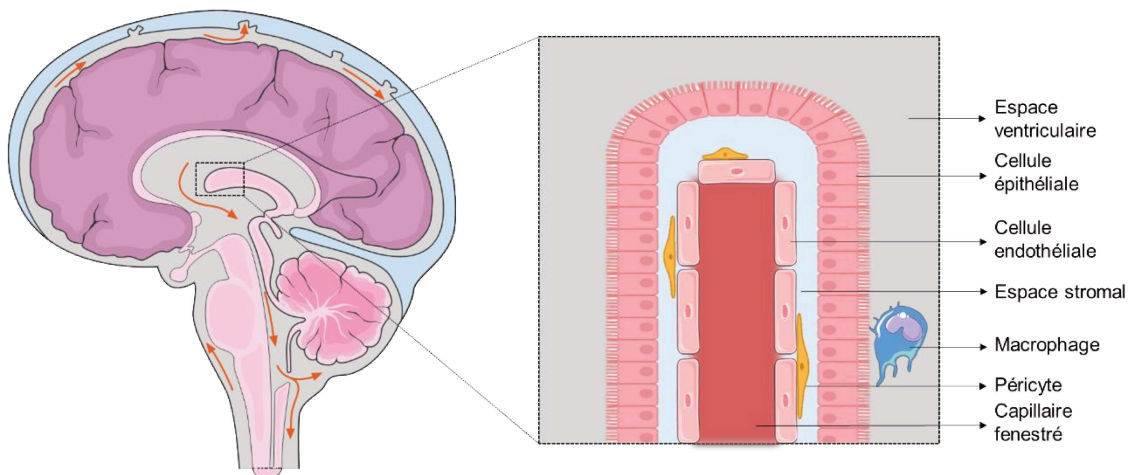


**Figure 24. La névroglie.**

La névroglie est un tissu de soutien situé à l'intérieur de l'encéphale et de la moelle épinière. Quatre types de cellules la constituent : les cellules épendymaires, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales.

(Source: Images Biorender)

La BHE est constituée de cellules endothéliales, de pericytes, d'astrocytes et de neurones <sup>291</sup>. Elle a différents rôles au sein du SNC dont la protection du cerveau. En effet, le SNC est souvent considéré comme un organe immunitaire privilégié, en raison de sa séparation du flux sanguin par diverses barrières, notamment la BHE et la barrière hémato-cérébrale du LCR (**figure 25**).



**Figure 25. La barrière hémato-cérébrale du liquide céphalo-rachidien.**

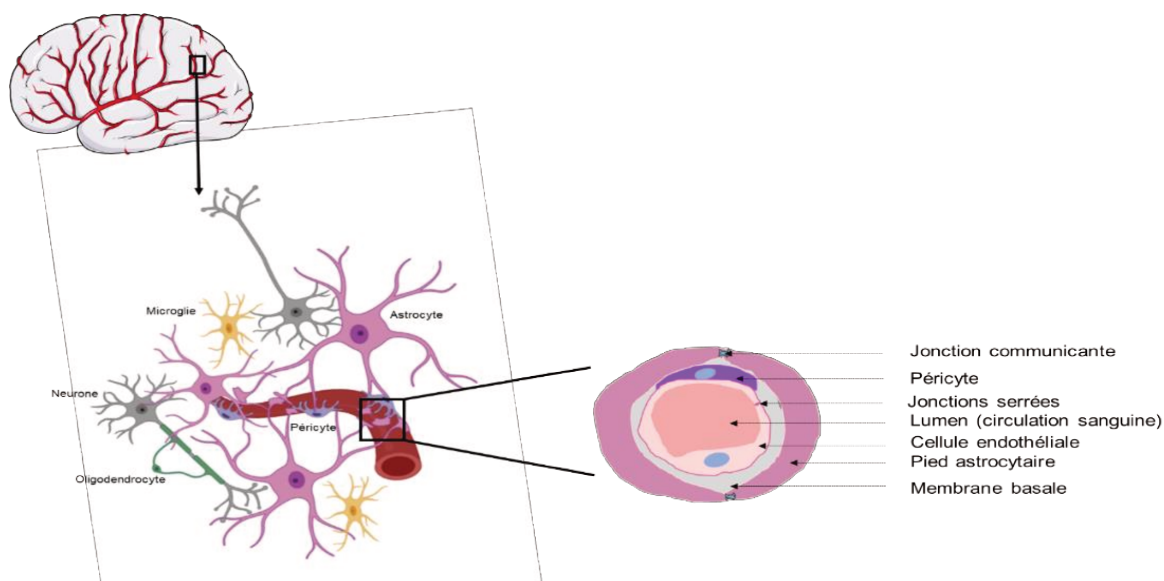
Le plexus choroïde est organisé en une couche externe de cellules épithéliales entourant des capillaires fenestrés et d'autres types de cellules stromales.

Abréviation: LCR, liquide céphalo-rachidien. (Adapté de: *Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers*, Images Biorender)

## 2. Barrière hémato-encéphalique

### a. Barrière hémato-encéphalique : caractéristiques

La barrière sang-SNC est composée d'une barrière endothéliale et d'une barrière gliale secondaire qui restreint l'entrée des pathogènes et des cellules immunitaires circulantes dans le SNC. On la nomme : l'unité neurovasculaire (NVU) (figure 26).



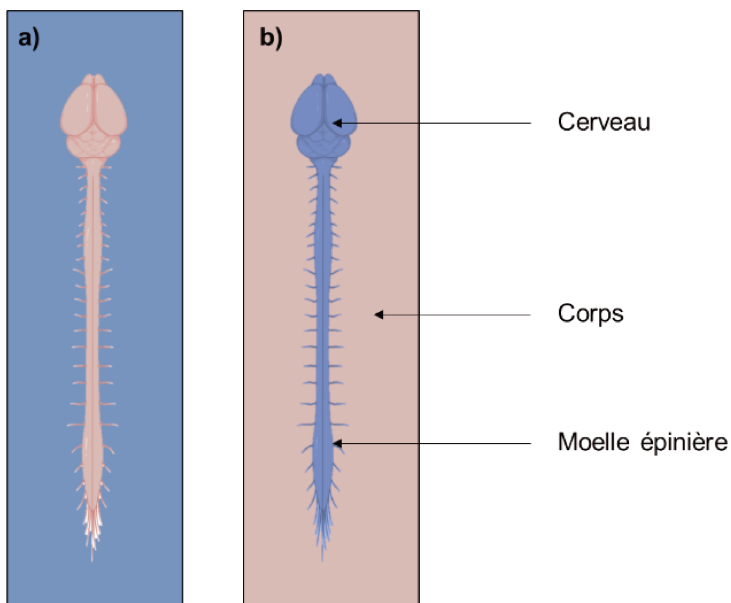
**Figure 26. L'unité neurovasculaire.**

**Les péricytes cérébraux sont encastrés dans la membrane basale et enveloppent les cellules endothéliales qui tapissent les capillaires cérébraux. Avec les astrocytes, les microglies/macrophages périvasculaires, les oligodendrocytes et les neurones, ces cellules forment l'unité neurovasculaire.**

*(Adapté de: Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain, Images Biorender)*

Elle est formée de cellules constituant la BHE ainsi que de la membrane basale, des oligodendrocytes et des microglies <sup>292</sup>. La NVU joue un rôle important dans : le maintien des fonctions cérébrales, la régulation du flux sanguin cérébral et le maintien de la BHE. Les premières études qui ont mené au concept de la BHE ont été réalisées par *Ehrlich* au début du 19<sup>ème</sup> siècle. *Ehrlich* observait que de nombreux colorants injectés par voie intraveineuse coloraient les tissus de pratiquement tout le corps mais pas le cerveau <sup>293</sup> (figure 27a). *Lewandowsky* a ensuite montré que le réactif du bleu de Prusse ne passait pas du sang au cerveau et a formulé le concept

de BHE <sup>294</sup>. Les expériences de *Goldmann* en 1913 sur le bleu de trypan ont démontré de façon très nette l'existence de la BHE. En effet, lors d'injection du bleu dans le LCR, le bleu avait coloré tout le cerveau mais n'avait pas diffusé vers le système périphérique <sup>295</sup> (**figure 27b**). Ces résultats ont donc mis en évidence l'existence d'une barrière entre le cerveau et le sang qui limitait la diffusion entre les deux compartiments.



**Figure 27. Illustration des premières expériences sur la barrière hémato-encéphalique par Ehrlich et Goldmann.**

**Ces premières expériences ont démontré la compartimentation entre le système nerveux central (cerveau et moelle épinière) et les organes périphériques. a) Le bleu de trypan est administré par voie périphérique. Le colorant ne pénètre dans aucun organe du système nerveux central. b) Le bleu de trypan est injecté dans le cerveau. Le cerveau et la moelle épinière ont été colorés alors que les organes périphériques ne l'ont pas été.**

*(Adapté de: Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint, Images Biorender)*

Le terme de BHE est apparu au cours du 20<sup>ème</sup> siècle et sa localisation au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux a été établie lorsque les jonctions serrées ont été observées entre les cellules endothéliales de ces capillaires <sup>296</sup>. La BHE est une barrière sélective formée principalement par les cellules endothéliales qui sont reliées entre elles par des jonctions serrées et qui tapissent les vaisseaux cérébraux du côté du flux sanguin <sup>297-299</sup>. D'autres cellules participent à la formation et au maintien des propriétés structurales et métaboliques de la BHE, telles que les astrocytes, les pericytes et les neurones <sup>291</sup>. La communication entre toutes ces cellules permet d'ajuster les apports en molécules et en nutriments en fonction des besoins du SNC <sup>292</sup>. Par ailleurs, l'interaction entre les pericytes et les autres types de cellules de la NVU est complexe mais permet un contrôle précis de la perméabilité de

la BHE et du flux sanguin cérébral. Ce sont des cellules régulatrices importantes pour le maintien de l'homéostasie et de l'hémostasie de la BHE <sup>300</sup>. Les péricytes et les astrocytes sont importants pour la préservation des jonctions serrées de la cellule endothéliale grâce à la régulation de protéines comme l'occludine, la claudine et la zonula occludens (ZO)-1 <sup>301-303</sup>. Les astrocytes et les péricytes peuvent interagir pour modifier la perméabilité de la BHE, par exemple avec la liaison de l'apolipoprotéine sécrétée par les astrocytes au récepteur de LRP1 (la protéine 1 liée aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité) sur les péricytes <sup>304</sup>. Ils modulent également le flux sanguin cérébral par la sécrétion de la prostaglandine E2 par les astrocytes qui se lie sur les péricytes aux récepteurs 4 de la prostaglandine E2 <sup>305</sup>. Les neurones peuvent interagir avec les péricytes par la libération de neurotransmetteurs pour induire la relaxation (glutamate) ou la contraction (noradrénaline) des péricytes modifiant ainsi le tonus vasculaire <sup>306,307</sup>. Il est également possible que les péricytes puissent influencer la fonction neuronale par la libération de facteurs neurotrophiques <sup>308</sup>. Ces observations suggèrent l'importance de la communication des cellules de la BHE dans la physiologie du cerveau.

### **b. Barrière hémato-encéphalique : rôles**

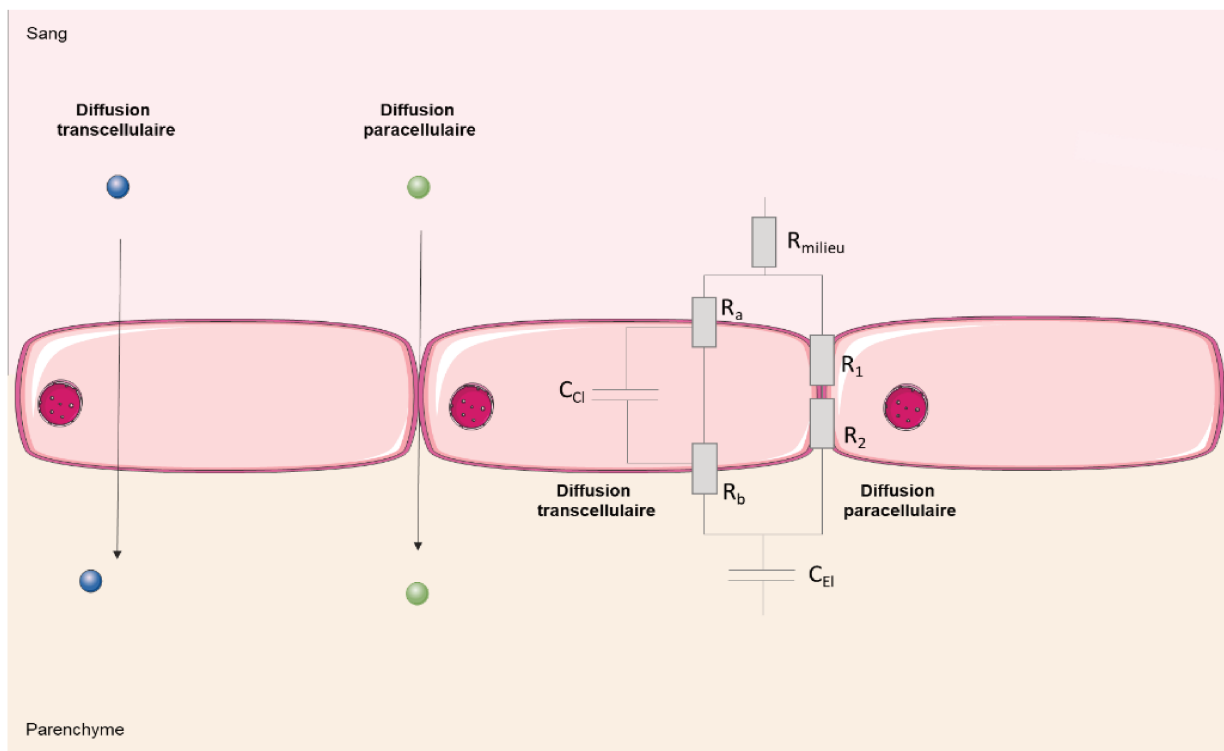
- La BHE fournit au cerveau les nutriments essentiels et sert de médiateur pour l'écoulement de nombreux déchets.
- La BHE protège le cerveau contre les fluctuations de la composition ionique qui peuvent se produire après un repas ou un exercice, ce qui perturberait la signalisation synaptique et axonale.
- Elle protège le cerveau de l'accès de molécules toxiques, hormones ou agents pathogènes.
- Elle restreint les mouvements ioniques et des fluides entre le sang et le cerveau, permettant aux transporteurs d'ions et des canaux spécifiques de réguler le trafic ionique pour produire un fluide interstitiel cérébral qui fournit un milieu optimal pour la fonction neuronale. Le fluide interstitiel cérébral est de composition similaire au plasma sanguin mais a une teneur en protéines et des concentrations en potassium et calcium plus faibles et des niveaux de magnésium plus élevés.
- Cette barrière permet de séparer les neurotransmetteurs et les agents neuroactifs qui agissent au niveau central (dans le SNC) et périphérique (dans les tissus et le sang périphériques), de sorte que des agents similaires puissent être utilisés dans

les deux systèmes sans "crosstalk". En raison de sa grande surface (~20 m<sup>2</sup> par 1,3 kg de cerveau) et de la courte distance de diffusion entre les neurones et les capillaires, l'endothélium joue un rôle prédominant dans la régulation du microenvironnement cérébral.

### **c. Barrière hémato-encéphalique : phénotype**

Les complexes de jonctions intercellulaires entre les cellules endothéliales comprennent les jonctions adhérentes et les jonctions serrées<sup>309</sup>. L'association des protéines adhérentes et serrées entre elles ainsi qu'avec l'actine du cytosquelette permet la formation de complexes jonctionnels. Ces complexes sont une caractéristique essentielle de la BHE et réduisent considérablement l'infiltration des solutés polaires par les voies de diffusion paracellulaire entre les cellules endothéliales, du plasma sanguin au liquide extracellulaire du cerveau et vice versa<sup>299</sup>. Ces jonctions limitent considérablement le mouvement de petits ions tels que le sodium et le chlore, de sorte que la résistance électrique trans-endothéliale (TEER) qui est généralement de 2 à 20 Ohm.cm<sup>2</sup> dans les capillaires périphériques peut être supérieure à 1 000 Ohm.cm<sup>2</sup> dans l'endothélium du cerveau<sup>310</sup> (**figure 28**).





**Figure 28. Principe de la résistance trans-endothéliale (TEER).**

Le calcul du TEER fait intervenir la loi d'Ohm pour déterminer la résistance à partir du courant et de la tension passant à travers la couche de la cellule. Le modèle simplifié du circuit électrique résultant pour la mesure du TEER contient des résistances électriques pour les voies transcellulaire et paracellulaire en parallèle. Ci-dessus, un modèle de circuit équivalent d'une monocouche cellulaire consistant en une voie transcellulaire ( $R_a + R_b$ ) et une voie paracellulaire ( $R_1 + R_2$ ) pour le courant traversant la membrane. La résistance équivalente ( $R_{total}$ ) combinant les deux voies de courant est donnée par la combinaison de la résistance par la voie transcellulaire ( $R_{tc}$ ) et la voie paracellulaire ( $R_{pc}$ ) comme :  $1/R_{total} = 1/R_{tc} + 1/R_{pc}$ .

Abréviations: CEI, capacité des électrodes ; CCl, capacité de la couche de la cellule ; Rmilieu, résistance ohmique du milieu ;  $R_a$  : résistance apicale ;  $R_b$  : Résistance basolatéral ; TEER, résistance trans-endothéliale. (*Adapté de: Transepithelial/endothelial Electrical Resistance (TEER) theory and applications for microfluidic body-on-a-chip devices, Images Servier Medical Art*)

### **i. Jonctions serrées**

Les complexes de jonctions intercellulaires interviennent également dans la polarisation des cellules endothéliales (apical/basolateral). Les jonctions serrées sont plus complexes dans l'endothélium du cerveau. La mise en place et le maintien des complexes jonctionnels fait intervenir l'actine. Parmi les molécules identifiées comme apportant une contribution importante à la structure des jonctions serrées, nous trouvons les protéines transmembranaires et cytoplasmiques<sup>311</sup> (**figure 29**).

L'occludine est une protéine transmembranaire de 60-65 kilodaltons (kDa) avec un domaine carboxy-terminal qui est capable de se lier à la protéine ZO-1. La localisation des occludines dépend de leurs degrés de phosphorylation. En effet, les

formes les moins phosphorylées seront placées au niveau du cytoplasme, de la membrane basolatérale et des jonctions serrées alors que les formes les plus phosphorylées se localiseront seulement au niveau des jonctions serrées <sup>312</sup>. La fonction principale de l'occludine semble être la régulation des jonctions serrées.

Les claudines sont des protéines transmembranaires de 20 à 27 kDa qui forment une famille de 24 membres <sup>311</sup>. Les claudines interagissent avec différentes protéines cytoplasmiques par leur extrémité carboxy-terminale. Dans la BHE, on retrouve l'expression des protéines claudine 1, claudine 3, claudine 12 et majoritairement claudine 5 <sup>309,313</sup>. Les claudines 1 et 5 semblent contribuer au TEER élevé. Les claudines ont la capacité de former des dimères avec les homologues des claudines voisines ce qui rend l'adhésion des cellules plus forte <sup>314</sup>.

Les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM-A, JAM-B et JAM-C) sont des immunoglobulines d'environ 40 kDa. De part et d'autre des membranes de deux cellules voisines, elles peuvent former des interactions homo- ou hétérodimériques entre elles <sup>309</sup>. Ces protéines sont présentes dans les cellules endothéliales du cerveau et sont impliquées dans l'acquisition de la polarité cellulaire, dans la formation et le maintien des jonctions serrées <sup>315</sup>. Les JAM peuvent former des complexes de jonctions intercellulaires en se liant aux protéines occludine, ZO-1 et cinguline.

Les protéines ZO sont des protéines cytoplasmiques qui interagissent avec certaines protéines transmembranaires telles que l'occludine, les claudines et les JAM. Ce sont des guanylate kinases associées à la membrane. ZO-1 est une protéine d'environ 220 kDa qui est très importante pour maintenir une perméabilité basse <sup>316</sup>. L'efficacité des jonctions serrées semble être régulée par les protéines d'échafaudage intracellulaires qui relient les molécules de jonction *via* la cinguline à l'actine intracellulaire et au cytosquelette <sup>309,317</sup>. La cinguline est un dipeptide de 40 kDa qui joue un rôle dans la transduction de la force mécanique générée par la contraction de la myosine et de l'actine à laquelle elle est connectée. Ce rôle va influencer la perméabilité de l'endothélium au niveau paracellulaire <sup>318</sup>. Les protéines transmembranaires sont reliées du côté cytoplasmique à un ensemble complexe de protéines membranaires périphériques qui forment de grands complexes protéiques, les plaques cytoplasmiques. Dans les plaques se trouvent des protéines d'adaptation avec de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine dont ZO-1, ZO-2 et ZO-3; *CASK (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin (CaM)-activated serine-threonine kinase)*; *MAGI-1, MAGI-2 et MAGI-3 (membrane associated guanylate kinase with inverted domain structure)*;

PAR3 et PAR6 (le complexe protéique de polarité) et MUPP1 (*multi-PDZ domain protein 1*)<sup>309,314</sup>. Les jonctions serrées ont une fonction importante non seulement pour limiter la perméabilité paracellulaire (fonction de barrière) mais aussi pour séparer les domaines apical et basolatéral de la membrane cellulaire afin que l'endothélium puisse prendre les propriétés polarisées (apico-basolateral). L'interaction cellule-cellule dans la zone de jonction est stabilisée par des jonctions adhérentes.

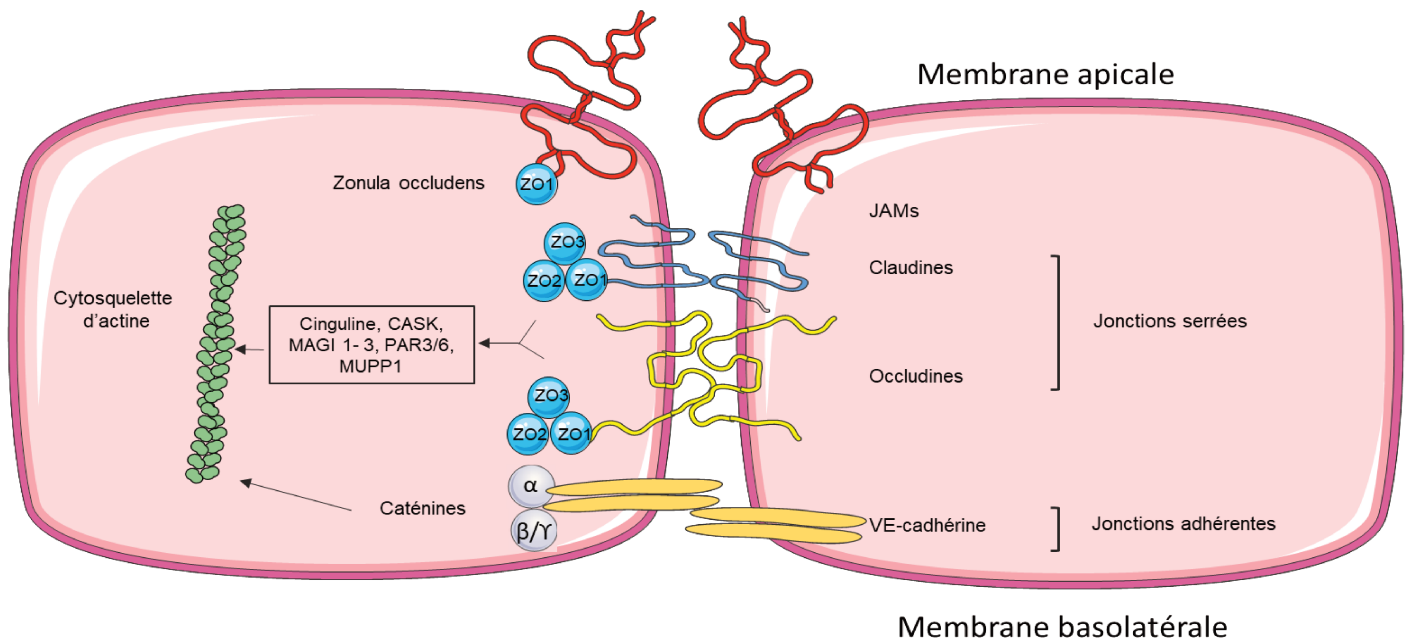
## **ii. Jonctions adhérentes**

Les jonctions adhérentes jouent un rôle dans l'initiation et la stabilisation de l'interaction cellule-cellule, dans l'organisation du cytosquelette de l'actine et elles interviennent dans la régulation de la signalisation intercellulaire mais aussi dans l'initiation de la polarisation cellulaire<sup>319</sup>. Au sein des jonctions adhérentes, nous retrouvons les protéines de caténines et les cadhérines (**figure 29**).

Les caténines (85 kDa) sont retrouvées sous différentes formes : alpha, bêta, gamma et delta. Au sein de la BHE, les caténines alpha, bêta et gamma relient les jonctions adhérentes à l'actine. Ces protéines permettent aussi le lien entre les jonctions serrées et les jonctions adhérentes<sup>309</sup>.

Les cadhérines sont des glycoprotéines de 120 à 140 kDa qui sont présentes à la surface des cellules. Les cadhérines *via* leur extrémité carboxy-terminale cytoplasmique se lient aux caténines afin de stabiliser les jonctions<sup>320</sup>. Au sein de la BHE, les cellules endothéliales expriment la cadhérine-5 aussi appelée *vascular endothelial* (VE) – cadhérine<sup>321</sup>.

Les altérations de la concentration de calcium intracellulaire et extracellulaire peuvent moduler l'assemblage des jonctions serrées<sup>322</sup> et modifier la résistance électrique. De plus, de nombreux types de cellules associés aux vaisseaux du cerveau y compris les microglies et les astrocytes et les terminaisons nerveuses adjacentes à la lame basale libèrent des agents vasoactifs et des cytokines qui peuvent modifier l'assemblage des jonctions serrées et la perméabilité de la barrière endothéliale<sup>323,324</sup>.



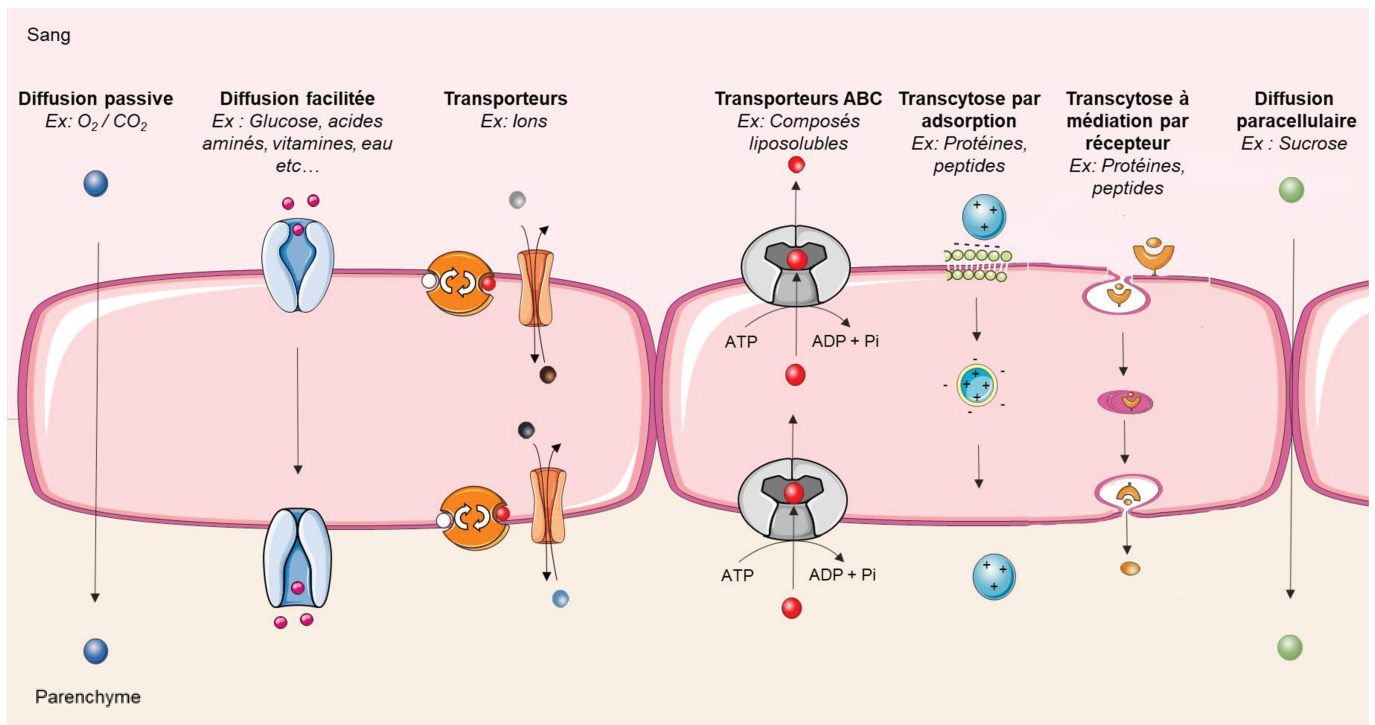
**Figure 29. Jonctions serrées et adhérentes au sein des cellules endothéliales.**

(Adapté de: *Structure and function of the blood-brain barrier*, Images Servier Medical Art)

#### **d. Processus de transport à travers la barrière hémato-encéphalique**

La régulation des échanges sang-cerveau se fait à travers le cytoplasme des cellules endothéliales qui expriment à leur face abluminale (cerveau) ou luminale (plasmatique)<sup>325,326</sup> des récepteurs et des transporteurs (**figure 30**). Si la majorité des molécules doit emprunter des protéines de transport ou des mécanismes de transport vésiculaire, quelques une peuvent passer librement à travers la BHE (transport passif). En effet, un large éventail de molécules liposolubles peut diffuser à travers la BHE et pénétrer passivement dans le cerveau<sup>327</sup>. Les solutés peuvent diffuser passivement à travers la membrane cellulaire et traverser l'endothélium sans consommation d'énergie. Le transport se fait selon un gradient électrochimique. Le transport de l'eau et/ou de solutés tels que le glycérol ou l'urée au niveau de la BHE est facilité par les aquaporines (AQP)<sup>328</sup> alors que les transports des ions se fait *via* des canaux ioniques situés au niveau des membranes luminales et abluminales tels que l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , le co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ , l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ <sup>329</sup> et la pompe sodium-potassium (ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )<sup>330</sup>. De plus, les solutés de gros poids moléculaire tels que les protéines et les peptides peuvent pénétrer dans le SNC en restant intacts en utilisant des mécanismes endocytotiques tels que la transcytose à médiation par récepteur ou la transcytose à médiation adsorptive<sup>331-333</sup>. Enfin, des pompes d'efflux utilisant l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) telles que la

Pgp (P-glycoprotéine), les protéines de la famille des MRP (*multidrug resistance-associated proteins*) ou BCRP (*breast cancer resistant protein*) sont exprimées par les cellules endothéliales et empêchent certaines substances d'atteindre le SNC ou facilitent leur élimination cérébrale <sup>334,335</sup>.



**Figure 30. Voies de transport à travers la barrière hémato-encéphalique.**

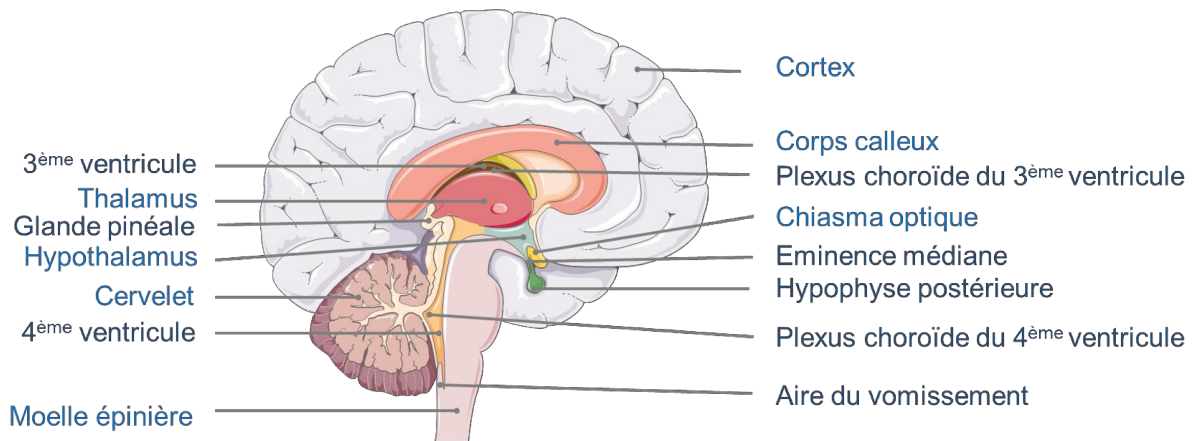
(Adapté de: *Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases*, Images Servier Medical Art)

## **e. Composants cellulaires et acellulaires de la barrière hémato-encéphalique**

### **i. Cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales tapissent les vaisseaux sanguins. Le diamètre de larges artères et des veines peut être constitué d'une douzaine de cellules endothéliales alors que les plus petits capillaires sont formés d'une simple cellule endothéliale se repliant sur elle-même pour former le lumen du vaisseau <sup>336,337</sup>. Les cellules endothéliales microvasculaires du SNC sont des cellules extrêmement fines qui sont 39% moins épaisses que les cellules endothéliales musculaires avec une distance de moins d'un quart de micron séparant le luminal de la surface parenchymateuse <sup>338</sup>. Les cellules endothéliales cérébrales ont des propriétés uniques

par rapport aux cellules endothéliales d'autres tissus qui leur permettent de réguler étroitement le mouvement des ions, des molécules et des cellules entre le sang et le cerveau. Les cellules endothéliales arborent des propriétés physiques et métaboliques essentielles au rôle de « gardiennes du SNC » de la BHE. Les cellules endothéliales du SNC sont maintenues ensemble par des jonctions serrées et adhérentes qui limitent considérablement le flux paracellulaire des solutés <sup>296,339-342</sup>. Les cellules endothéliales du SNC présentent des taux de transcytose extrêmement faibles par rapport aux cellules endothéliales périphériques, ce qui limite considérablement le mouvement transcellulaire des solutés à médiation vésiculaire <sup>338</sup>. Cette barrière endothéliale serrée crée une cellule polarisée avec des compartiments de membrane luminale et abluminale distincts, de sorte que le mouvement entre le sang et le cerveau peut être étroitement contrôlé grâce à des propriétés de transport cellulaire régulé <sup>325,343</sup>. Les cellules endothéliales du SNC expriment également un niveau extrêmement faible de molécules d'adhérence cellulaire (CAM), en comparaison avec les cellules endothéliales d'autres tissus limitant considérablement la quantité de cellules immunitaires qui entrent dans le SNC <sup>336,344</sup>. La combinaison des propriétés de barrière physique, des propriétés de barrière moléculaire ainsi que des transporteurs spécifiques permet aux cellules endothéliales de réguler étroitement l'homéostasie du SNC. Toutefois, certaines zones du cerveau sont plus vulnérables en raison de leurs jonctions intercellulaires inter-endothéliales lâches comme au niveau du plexus choroïde, au niveau des troisième et quatrième ventricules y compris l'organe subfornical, l'aire postrema (aire du vomissement), l'organe vasculaire de la lame terminale, la glande pinéale, l'éminence médiane de l'hypothalamus et la neurohypophyse <sup>345</sup> (**figure 31**). Les capillaires de ces organes circumventriculaires sont des vaisseaux continus fenestrés avec une perméabilité élevée aux solutés <sup>345</sup>. Cette grande perméabilité est importante pour les fonctions de ces noyaux qui détectent les concentrations de solutés dans le sang ou sécrètent des molécules dans le sang.



**Figure 31. Zones vulnérables de la barrière hémato-encéphalique.**

**Coupe sagittale du cerveau. En bleu foncé : zones plus vulnérables au passage des molécules/des virus (3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ventricule y compris l'organe subfornical, l'organe vasculaire de la lame terminale, l'hypophyse postérieure, plexus choroïde du 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ventricule, la glande pinéale, l'aire de vomissement et l'éminence médiane).**

*(Source: Images Servier Medical Art)*

### **Transport des cellules immunitaires du sang au système nerveux central**

Dans le SNC sain, le niveau de surveillance immunitaire est relativement faible, avec seulement la présence de quelques globules blancs tels que les neutrophiles et les lymphocytes. Pendant le développement embryonnaire, les cellules de la lignée monocyttaire dérivées de la moelle osseuse pénètrent dans le cerveau et deviennent des microglies résidentes immunologiquement compétentes<sup>346</sup>. Cependant, en raison de l'interaction cellule immunitaire-BHE strictement régulée, le SNC agit comme un site immunitaire privilégié et l'infiltration des neutrophiles dans le cerveau est faible par rapport aux autres tissus. Dans des conditions physiologiques de la BHE, les cellules immunitaires sont capables de pénétrer dans le cerveau par un processus de diapédèse directement à travers le cytoplasme des cellules endothéliales et non par une voie paracellulaire impliquant un réarrangement et une ouverture des jonctions serrées<sup>347,348</sup>. Ce mécanisme permet à ces cellules de traverser la BHE sans perturbation des jonctions serrées. Les leucocytes tels que les monocytes et les macrophages peuvent être recrutés dans le SNC dans des conditions pathologiques et jouent des rôles complémentaires à ceux des microglies résidentes<sup>349</sup> (**figure 32**).

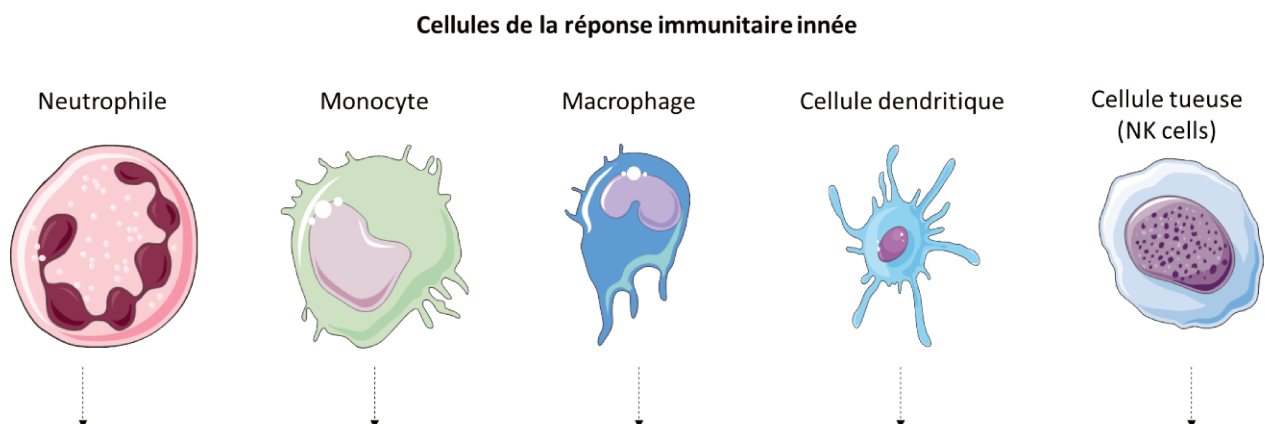
- Les macrophages ont comme principal rôle la phagocytose, mais ils jouent également un rôle essentiel dans la défense non spécifique (immunité innée) et aident

à initier des mécanismes de défense spécifiques (immunité adaptative) en recrutant d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes. Ils contribuent aussi aux réponses pro et anti-inflammatoire et peuvent diminuer ou augmenter les réactions immunitaires par la libération de cytokines.

- Les monocytes ont différents rôles, ils sont impliqués dans la phagocytose, dans la présentation d'antigène, la prolifération et la stimulation des cellules T et dans l'angiogenèse. Les monocytes peuvent avoir un comportement pro-inflammatoire et sécréter des cytokines inflammatoires en réponse à une infection <sup>350</sup>.

- Les cellules tueuses (NK cells) sont très importantes pour la sécrétion de différentes cytokines et chimiokines et pour la coopération au sein de l'immunité innée avec les neutrophiles et les macrophages. Leur principale fonction est la cytolyse ou la lyse des cellules infectées <sup>351</sup>.

- Les neutrophiles ont comme principal rôle la phagocytose. Au cours de la phase aiguë de l'inflammation, en particulier à la suite d'une infection virale, les neutrophiles sont l'un des premiers type cellulaire à migrer vers le site de l'inflammation <sup>352</sup>. Les neutrophiles subissent un processus appelé chimiotaxie qui leur permet de migrer vers des sites d'infection ou d'inflammation.



**Figure 32. Rôles des principales cellules du système immunitaire inné.**

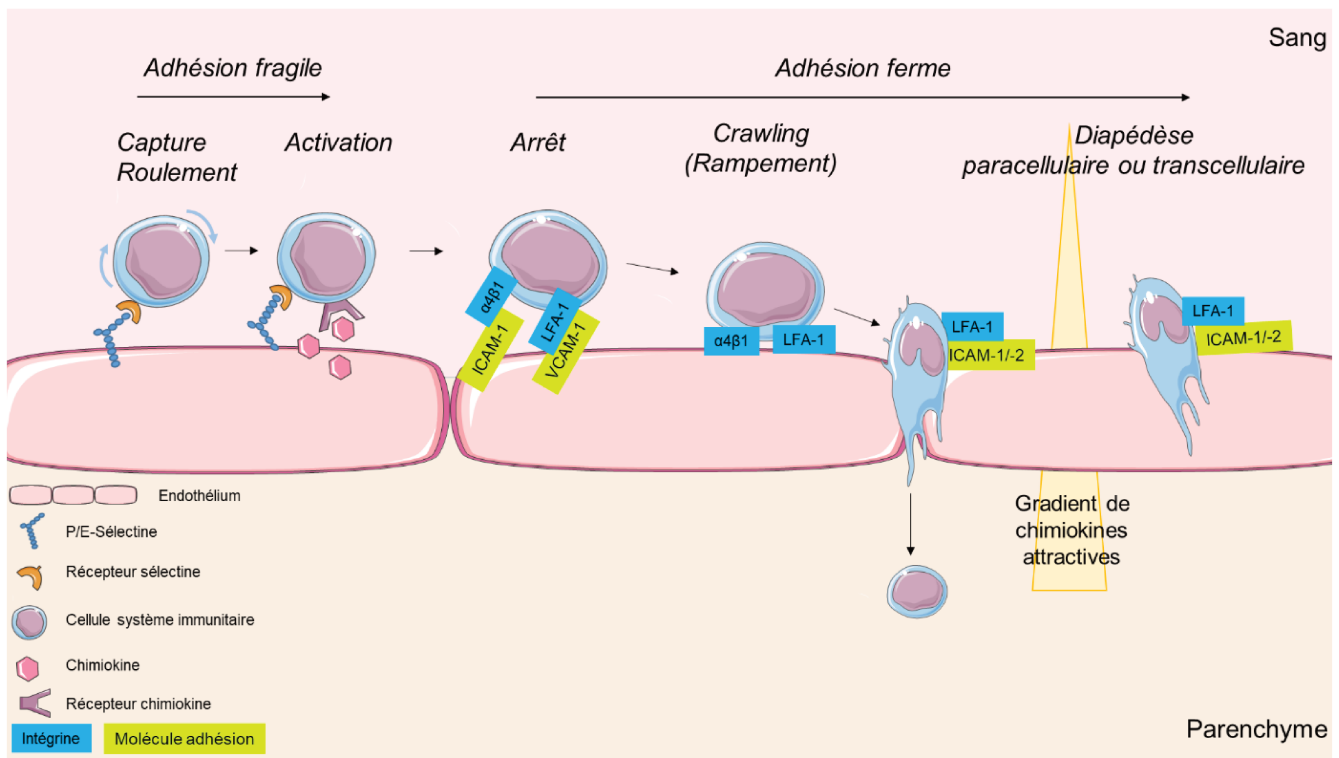
**Les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules tueuses sont capables de passer la barrière endothéliale et d'engendrer une réponse antivirale suite à une infection virale.**

*(Source: Images Servier Medical Art)*

En effet, les neutrophiles et les cellules mononuclées en circulation sont attirés par les sites d'inflammation de la BHE, pénètrent la barrière et entourent les petits vaisseaux, en particulier les veinules. L'entrée d'un leucocyte du sang dans un tissu



est un processus en plusieurs étapes qui comprend l'adhésion par roulement, l'adhésion ferme et l'extravasation (**figure 33**). Premièrement, il y a un contact transitoire du leucocyte en circulation avec l'endothélium vasculaire, ce contact est induit par les molécules d'adhésion de la famille des sélectines (E-selectine, P-selectine). Ce contact ralentit la vitesse de circulation du leucocyte dans le sang. Suite à l'attachement initial, les leucocytes roulent le long de la paroi vasculaire avec une vitesse considérablement réduite. Les leucocytes qui roulent vont détecter des facteurs chimiotactiques de la famille des chimiokines qui sont présentés à la surface endothéliale ce qui entraîne l'activation fonctionnelle des intégrines à la surface des leucocytes. L'activation des intégrines entraîne l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium vasculaire en se liant aux récepteurs d'adhésion cellulaire tels qu'ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) et VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*). Enfin après l'adhésion, les leucocytes vont migrer à travers la paroi des capillaires ou par le biais de jonctions inter-endothéliales pour atteindre le SNC <sup>336</sup>. L'expression de ces molécules d'adhérence est beaucoup plus faible dans les cellules endothéliales du SNC que dans les cellules endothéliales périphériques mais elle est élevée lors de maladies neuro-inflammatoires telles que les accidents vasculaires cérébraux et la sclérose en plaques <sup>344,353,354</sup>. Dans les états pathologiques inflammatoires impliquant la BHE, les jonctions serrées entre les cellules endothéliales peuvent être ouvertes sous l'action de cytokines et d'autres agents, ce qui permet aux cellules immunitaires d'entrer dans le parenchyme cérébral par des voies à la fois transcellulaire et paracellulaire <sup>355,356</sup>.



**Figure 33. Mécanismes moléculaires impliqués dans la migration des cellules immunitaires à travers la barrière endothéliale.**

L'infiltration des cellules immunitaires au sein du SNC est un processus étape par étape impliquant un roulement, une adhésion ferme et une transmigration du leucocyte dans le système circulatoire vers le site de l'inflammation.

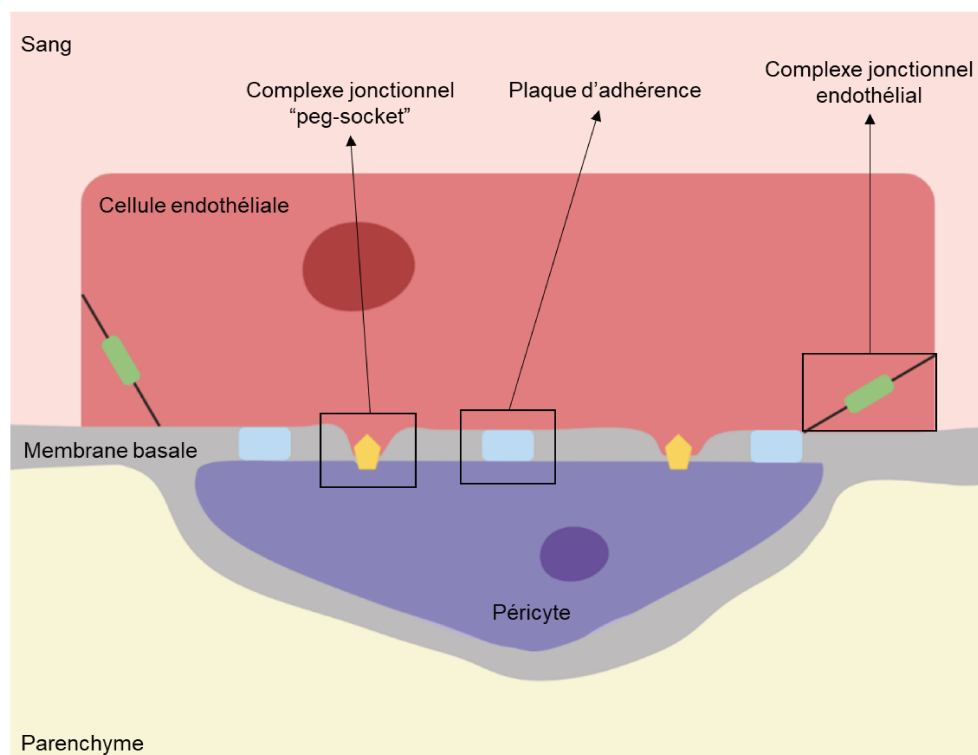
*Abréviations:* LFA-1, Lymphocyte function-associated antigen 1 ; ICAM-1/2, Intercellular adhesion molecule 1/2 ; VCAM-1, Vascular cell adhesion molecule-1 ;  $\alpha 4\beta 1$ , integrin  $\alpha 4\beta 1$ . (*Adapté de:* Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers, Images Servier Medical Art)

## ii. Pericytes

Les péricytes (et les cellules musculaires lisses) sont des cellules murales qui se trouvent sur la surface abluminale des tubes microvasculaires et des grands vaisseaux. Les péricytes jouent un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse, le dépôt de la matrice extracellulaire, la régulation de l'infiltration des cellules immunitaires et la régulation du flux sanguin en réponse à l'activité neuronale <sup>357</sup>. Ils apportent un soutien structurel et une capacité vasodynamique à la microvasculature.

Morphologiquement, les péricytes présentent un corps cellulaire ovale avec un grand nombre de projections qui enveloppent les cellules endothéliales le long de la surface abluminale <sup>358</sup>. L'identifiant moléculaire le plus largement accepté des péricytes du SNC est la réactivité positive à la fois au PDGFR- $\beta$  (*platelet-derived growth factor receptor- $\beta$* ) et au NG2 (*Neuron-glia antigen 2*) <sup>357</sup>. Bien que ces cellules tapissent le tube endothélial à la surface abluminale, la plupart du corps cellulaire et des extensions ne touchent pas l'endothélium mais sont séparés par la membrane

basale dans laquelle elles sont intégrées <sup>359</sup>. Les péricytes communiquent avec les cellules endothéliales par contact physique direct et par les voies de signalisation paracrine. Les jonctions communicantes fournissent des connexions directes entre le cytoplasme des péricytes et les cellules endothéliales et elles permettent l'échange d'ions et de petites molécules. Des plaques d'adhérence ancrent les péricytes aux cellules endothéliales, tandis que des contacts par « peg-and-socket » permettent aux cellules de pénétrer par des discontinuités dans la membrane basale du vaisseau et de se toucher <sup>360</sup> (**figure 34**).



**Figure 34. Interaction des péricytes et des cellules endothéliales au niveau des vaisseaux sanguins.**

**Les péricytes entourant les cellules endothéliales partagent la membrane basale avec les cellules endothéliales. Un contact direct péricyte-cellule endothéliale est établi par l'intermédiaire de complexes de jonction situés à des endroits où la membrane basale est absente.**

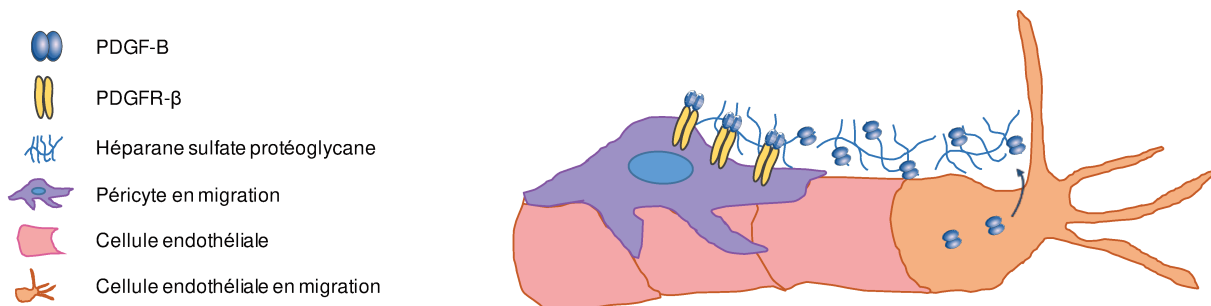
*(Adapté de: Endothelial/Pericyte Interactions, Images Biorender)*

Il a été démontré que les péricytes du SNC ont des propriétés uniques par rapport aux péricytes d'autres tissus. Les péricytes du SNC sont dérivés de la crête neurale, contrairement aux péricytes de nombreux tissus périphériques qui sont dérivés du mésoderme <sup>361</sup>. De plus, les vaisseaux du SNC ont la plus forte couverture

des péricytes du SNC de tous les tissus avec un rapport cellules endothéliales / péricytes estimé entre 1:1 et 3:1 alors que le muscle a un rapport de 100:1. Par ailleurs, la distance qui sépare ces deux types cellulaires est de 20 nanomètres, ce qui permet aux péricytes de communiquer étroitement avec les cellules endothéliales afin d'aider à déterminer et à maintenir les caractéristiques locales des vaisseaux <sup>303,362,363</sup>. Les péricytes prolongent de longues extensions cellulaires le long de la surface abluminale de l'endothélium qui peuvent souvent s'étendre sur plusieurs corps de cellules endothéliales.

Dans le cerveau, les péricytes peuvent se détendre ou se contracter activement pour modifier le flux sanguin cérébral en réponse à des changements localisés de l'activité neuronale <sup>305,307,364,365</sup>. Ces cellules contiennent des protéines contractiles notamment l'alpha-actine musculaire lisse ( $\alpha$ -SMA), la tropomyosine et la myosine, et ont la capacité de se contracter pour contrôler le diamètre du capillaire <sup>306,307,360,366</sup>. Les complexes de jonction « peg-and-socket » et les plaques d'adhérence favorisent la transmission des forces mécaniques contractiles des péricytes à l'endothélium ce qui peut aider à contrôler le flux sanguin à travers le réseau capillaire <sup>306</sup> (**figure 34**). Les complexes contiennent de la N-cadhérine, des CAM, des jonctions adhérentes à base de caténines et des molécules de matrice extracellulaire comme la fibronectine <sup>367</sup>.

Les péricytes expriment également un certain nombre de récepteurs pour les médiateurs chimiques tels que les catécholamines <sup>368</sup>, l'angiotensine II <sup>369</sup>, les peptides intestinaux vasoactifs <sup>370</sup>, l'endothéline-1 <sup>371</sup> et la vasopressine <sup>372</sup> indiquant que les péricytes peuvent également être impliqués dans l'autorégulation cérébrale. Un certain nombre d'observations expérimentales soutiennent le concept selon lequel les péricytes régulent l'angiogenèse et peuvent jouer un rôle dans la différenciation de la BHE <sup>373,374</sup>. La cellule endothéliale utilise des facteurs de croissance tels que l'angiopoïétine 1, le facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes-BB (PDGF-BB) pour diriger les péricytes vers de nouveaux vaisseaux afin de stabiliser la paroi vasculaire <sup>375</sup> (**figure 35**).



**Figure 35. La voie de signalisation PDGF-B/PDGFR- $\beta$  lors de l'angiogénèse.**

**La voie de signalisation PDGF-B/PDGFR- $\beta$  est nécessaire pour le recrutement des péricytes pendant l'angiogénèse. Le PDGF-B est synthétisé et sécrété par les cellules de pointe migratrices à la pointe des pousses angiogéniques. Les péricytes qui expriment le PDGFR- $\beta$  dépendent du PDGF-B dérivé de l'endothélium pour la prolifération et la migration.**

Abréviations: PDGF-BB, Facteur de croissance dérivé des plaquettes-BB ; PDGFR- $\beta$ , Récepteur bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes. (*Adapté de: Endothelial/Pericyte Interactions*)

Les péricytes sécrètent également des facteurs favorisant l'angiogénèse tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et la NOTCH3 (*neurogenic locus notch homolog 3*) pour activer les processus angiogéniques dans le SNC adulte<sup>375</sup>. Les péricytes peuvent moduler et maintenir la BHE par la libération de facteurs de signalisation pour déterminer le nombre de jonctions serrées des cellules endothéliales et diriger la polarisation des pieds terminaux des astrocytes<sup>358</sup>. Une réduction du nombre de péricytes peut entraîner une perte des jonctions serrées entre les cellules endothéliales, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité de la BHE<sup>376</sup>. De plus, les péricytes peuvent contrôler le mouvement des substances entre le flux sanguin et le parenchyme cérébral, y compris la clairance vasculaire des espèces toxiques hors du cerveau<sup>304</sup>. Des études sur des souris mutantes dans la voie de signalisation Platelet-Derived Growth Factor- $\beta$  (PDGF- $\beta$ ) / Platelet-Derived Growth Factor Receptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) ont identifié un rôle important pour les péricytes dans la régulation de la formation et de la fonction de la BHE<sup>358,377</sup>. Les modèles de souris mutantes incluant des souris déficientes pour *Pdgfb* et *Pdgfrb* totalement dépourvues de péricytes dans le SNC meurent à la naissance d'hémorragie. Les souris avec une perte partielle de péricytes (souris déficiente en *Pdgfb* ou en allèles hypomorphes de *Pdgfrb*) sont viables à la naissance et sont donc utilisées pour analyser la BHE à l'âge adulte<sup>358</sup>. Des analyses de la BHE chez des souris sans *Pdgfrb* durant l'embryogénèse révèle une perte de la BHE, démontrant que les péricytes sont

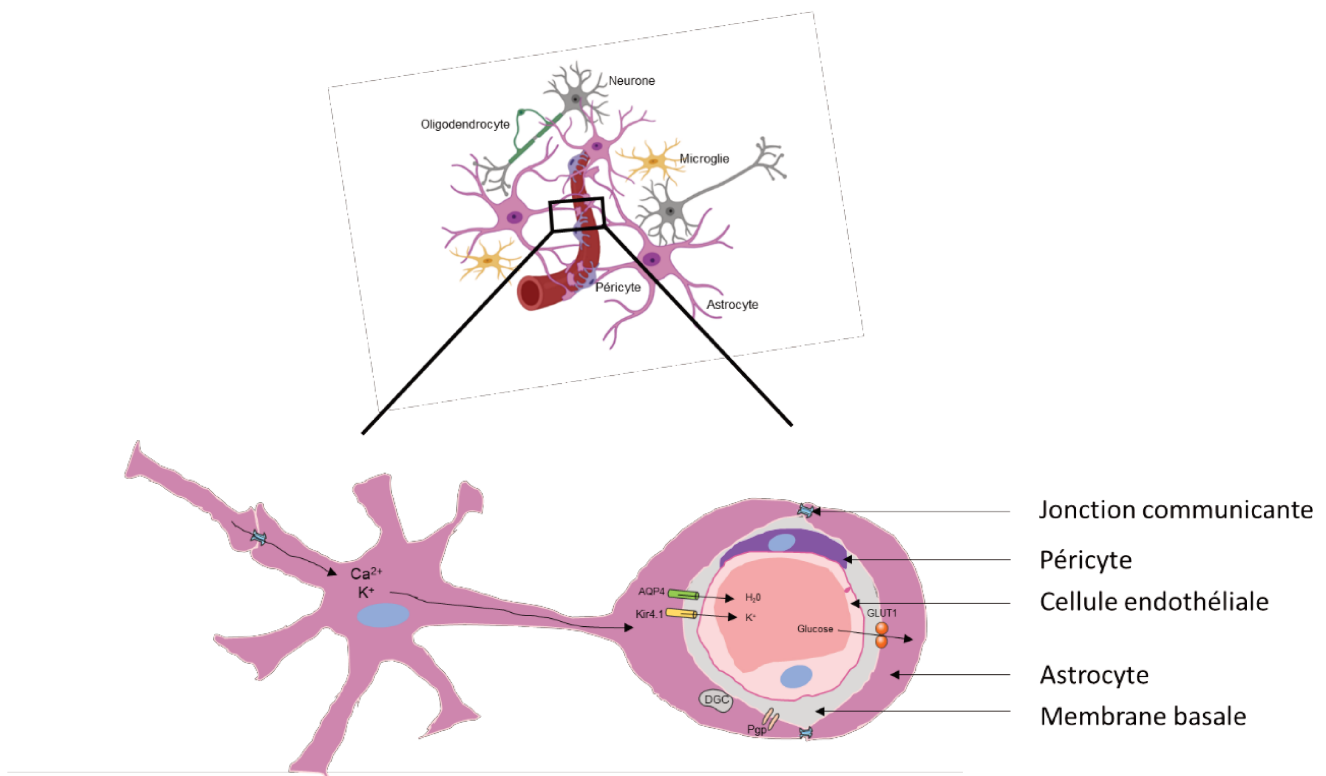
nécessaires pour réguler la formation de celle-ci. En particulier, l'absence de péricytes entraîne une augmentation du taux de transcytose, une augmentation du diamètre des capillaires et une augmentation de l'expression des CAM entraînant une infiltration immunitaire dans le SNC <sup>358,377</sup>. Il est important de noter que la perte de péricytes et la formation de micro-anévrysmes chez les souris déficientes en PDGF- $\beta$  ont été observées. Cela suggère que les péricytes jouent un rôle clé dans la stabilité structurelle de la paroi du vaisseau. L'utilisation ultérieure de souris présentant des allèles hypomorphes *Pdgfrb* qui ont un nombre variable de péricytes dans le SNC a montré que le nombre total est important pour la perméabilité relative des vaisseaux <sup>358,377</sup>. De plus, les travaux effectués sur des souris adultes présentant moins de péricytes ont permis d'identifier que les péricytes sont nécessaires à l'âge adulte pour réguler l'homéostasie de la BHE <sup>358</sup>.

Les péricytes présentent aussi une activité phagocytaire et peuvent être impliqués dans les fonctions neuroimmunes <sup>373</sup>. En effet, les péricytes sont considérés comme des "macrophages cérébraux". Pour certains auteurs, ils représentent avec la microglie la première ligne de défense du SNC en raison de leurs propriétés de présentation des antigènes <sup>378-380</sup>. Par ailleurs, les péricytes sont aussi capables de produire des chimiokines attractives et de favoriser le recrutement et l'extravasation des cellules immunitaires dans le cerveau <sup>381</sup>. Des recherches récentes ont montré que les péricytes lorsqu'ils sont stimulés par le lipopolysaccharide ou le tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), sécrètent de grandes quantités de molécules pro-inflammatoires, de molécules anti-inflammatoires, de cytokines et de chimiokines telles que l'interleukine (IL)-1 $\beta$ , l'IL6, le TNF- $\alpha$ , les espèces réactives de l'oxygène, l'oxyde nitrique et les métalloprotéases matricielles (MMP) qui contribuent au détachement des péricytes et potentiellement à la perturbation de la BHE <sup>382,383</sup>.

### ***iii. Astrocytes***

Les astrocytes constituent la glie avec les oligodendrocytes et la microglie <sup>384</sup>. Ils représentent la majorité des cellules du SNC. Morphologiquement, les astrocytes sont caractérisés par une forme en étoile avec de multiples prolongements et ramifications <sup>384,385</sup> et deviennent activés à la suite par exemple de lésions cérébrales et de maladies dégénératives <sup>386,387</sup>. Les astrocytes sont caractérisés par l'expression des filaments intermédiaires comme la vimentine et par des protéines acides fibrillaires gliales (GFAP) qui sont régulées à la hausse suite à des atteintes du SNC dans un

processus appelé astrogliose <sup>385,388</sup>. Les astrocytes ont diverses fonctions. Ils sont impliqués dans le support et la protection du SNC, ainsi que dans le maintien de la BHE. Ils participent également à la neurotransmission, à la défense immunitaire et ont un rôle dans la réparation et la cicatrisation du cerveau après une lésion <sup>389</sup>. Les prolongements astrocytaires terminaux appelés pieds astrocytaires sont en contact avec les cellules endothéliales et les péricytes <sup>324</sup>. Les pieds astrocytaires enveloppent presque entièrement les capillaires cérébraux et contiennent un ensemble de protéines dont le dystroglycane, la dystrophine et l'AQP 4. Le complexe dystroglycane - dystrophine est important pour relier le cytosquelette des pieds astrocytaires à la membrane basale en liant l'agrine <sup>390</sup>. Cette liaison coordonne l'AQP 4 en réseaux orthogonaux de particules, ce qui est essentiel pour réguler l'homéostasie de l'eau dans le SNC. Les pieds astrocytaires enveloppent les synapses neuronales permettant la modulation de l'activité neuronale et du flux sanguin cérébral suite à une élévation des niveaux intracellulaires de calcium dans les pieds terminaux <sup>391</sup>. Il est important de noter que les pieds astrocytaires expriment des molécules spécialisées telles que les canaux potassiques Kir<sub>4.1</sub> et l'AQP 4 qui régulent les concentrations ioniques de la BHE et des transporteurs de protéines tels que le transporteur de glucose 1 et la Pgp, ce qui suggère l'importance des pieds terminaux dans la polarisation des astrocytes <sup>324,341</sup> (**figure 36**).



**Figure 36. Astrocytes et barrière hémato-encéphalique.**

Abréviations: AQP4, canal d'eau aquaporine 4 ; DGC, complexe dystrophine-dystroglycane ; GLUT1, transporteur de glucose 1 ; Pgp, glycoprotéine P. (*Adapté de: Astrocytes: Emerging stars in leukodystrophy pathogenesis, Images Biorender*)

Les astrocytes fournissent un lien cellulaire entre les circuits neuronaux et les vaisseaux sanguins. Ce couplage neurovasculaire permet aux astrocytes de relayer des signaux qui régulent le flux sanguin en réponse à l'activité neuronale<sup>392,393</sup>. Cela inclut la régulation de la contraction/dilatation des cellules musculaires lisses vasculaires entourant les artérioles ainsi que des péricytes entourant les capillaires. De plus, les astrocytes communiquent entre eux par des jonctions communicantes formant un syncytium fonctionnel avec des réponses bien coordonnées<sup>394,395</sup>. À cet égard, il a été suggéré que les mécanismes astrocytiques qui régulent la vasodilatation et la vasoconstriction sont transmis par ces jonctions communicantes inter-astrogliales<sup>395</sup>.

Parmi leurs nombreuses fonctions, les astrocytes sont essentiels à de nombreux processus métaboliques dans le cerveau tels que l'attraction des cellules par la libération de chimiokines, le stockage de potassium, la libération de gliotransmetteurs, la libération de glutamate par la signalisation du calcium, le contrôle du pH du cerveau, la métabolisation de la dopamine et d'autres substrats par les monoamine-oxydases, l'absorption du glutamate et de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique par des transporteurs spécifiques et la production de composés antioxydants comme le



glutathion et d'enzymes comme les superoxydes dismutases <sup>385,388,396,397</sup>. Les astrocytes ont également été identifiés comme d'importants médiateurs de la formation et du fonctionnement de la BHE. En effet, les astrocytes ont la capacité d'engendrer des propriétés de barrière dans les vaisseaux sanguins autres que ceux du SNC dans les études de transplantation <sup>398</sup> ainsi qu'à induire des propriétés de barrière dans les cellules endothéliales cultivées dans des modèles de co-culture *in vitro* <sup>324</sup>. L'identification des facteurs sécrétés par les astrocytes qui régulent la fonction de la BHE suggère que les astrocytes matures modulent et maintiennent la barrière une fois qu'elle est formée. Par ailleurs, les astrocytes sont aussi importants pour le développement et le maintien des caractéristiques de la BHE grâce à la libération de facteurs de croissance comme le VEGF <sup>395,399</sup>. Ces facteurs de croissance sont importants pour la formation de jonctions serrées, la mise en place des systèmes enzymatiques et la polarisation des transporteurs <sup>399</sup>. Au cours du développement, le VEGF est nécessaire à la formation, au remodelage et à la survie des vaisseaux sanguins embryonnaires <sup>400</sup>. Cependant, à l'âge adulte, le VEGF diminue la stabilité de la BHE pendant les conditions inflammatoires <sup>401</sup>. L'angiopoïétine-1 participe au processus complexe de différenciation de la BHE en favorisant l'angiogenèse et en induisant une diminution de la perméabilité endothéliale en fonction du temps. Cela se produit par la régulation à la hausse de l'expression des protéines jonctionnelles <sup>402</sup>. Les astrocytes produisent également l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II et agit sur les récepteurs de l'angiotensine de type 1 exprimés par les cellules endothéliales de la BHE. L'angiotensine II induit un resserrement des vaisseaux et dans le SNC l'activation de l'angiotensine de type 1 restreint la perméabilité de la BHE et stabilise la fonction des protéines de jonction. Les souris déficientes en angiotensinogène ont une expression aberrante de l'occludine au niveau de la BHE ce qui suggère que l'angiotensine II sécrétée par les astrocytes favorise la formation des jonctions serrées <sup>403</sup>.

Enfin, après une infection virale par exemple, les astrocytes réagissent aux signaux des PRR en exprimant les composantes du complément, les IFN, l'IL-1 $\beta$ , l'IL6 et les chimiokines <sup>404</sup>. Bien que ces réponses puissent augmenter la clairance des pathogènes, elles peuvent également affecter négativement la fonction neuronale et la survie par des altérations de l'homéostasie des astrocytes. Par exemple, l'altération de l'absorption du glutamate contribue à la perte synaptique, à l'altération de la

neurogenèse et à la neurotoxicité ce qui entraîne de mauvais résultats cliniques après une neuroinflammation <sup>405,406</sup>.

#### **iv. Neurones**

Les neurones sont des cellules excitables et sécrétrices qui possèdent deux types de prolongements : les dendrites et les axones. Les dendrites recueillent l'information et l'amènent jusqu'au corps cellulaire. Une fois arrivé au corps cellulaire, c'est l'axone qui prend le relais et qui achemine l'information vers d'autres neurones avec qui il a fait une connexion (une synapse). Les neurones sont responsables de l'émission et de la propagation du message nerveux. En effet, ils ont pour principal rôle de faire circuler les informations entre l'environnement et l'organisme.

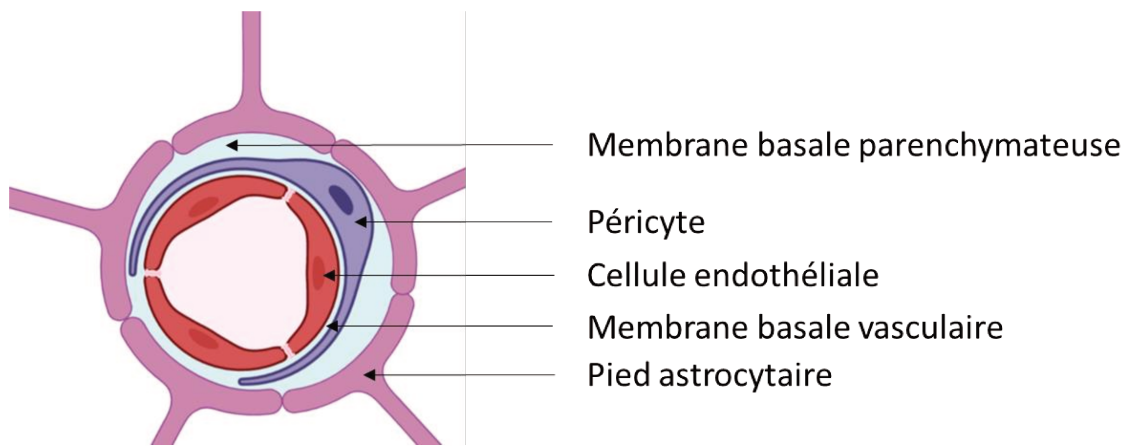
Dans le cerveau, les neurones restent à proximité des capillaires, ils sont rarement à plus de 8 à 20 micromètres d'un capillaire du cerveau <sup>407</sup>. Il a été estimé que presque chaque neurone possède son propre capillaire <sup>408</sup>. La proximité des cellules endothéliales avec les neurones leur permet de réagir au niveau local en constante évolution, notamment en ce qui concerne l'équilibre ionique. Les neurones jouent un rôle dans la régulation du flux sanguin et de la perméabilité microvasculaire, ils interagissent avec la matrice extracellulaire et peuvent libérer des facteurs pour stimuler l'angiogenèse <sup>409</sup>. Suite à une atteinte vasculaire, les signaux des neurones et des astrocytes peuvent recruter des microglies qui sécrètent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires. Ces données soutiennent un rôle synergique pour la régulation d'autres types de cellules par les neurones et mettent en évidence la façon dont ces cellules communiquent entre elles. En effet, le circuit neuronal est relié aux vaisseaux sanguins par des canaux d'eau présents dans les astrocytes. Une fois que la NVU est pleinement établie et que la BHE est mature, les neurones n'ont pas ou peu de contact direct avec les cellules endothéliales du cerveau. Cependant, les péricytes et les astrocytes envoient des signaux directs aux neurones pour moduler la force synaptique et transmettent également des signaux des neurones au système vasculaire ce qui entraîne une dilatation artériolaire et une augmentation du flux sanguin local influençant ainsi la physiologie de la BHE <sup>410</sup>.

Les neurones peuvent aussi aider à resserrer les cellules endothéliales du cerveau en culture *in vitro* en favorisant la synthèse et la localisation des protéines de jonction <sup>411</sup>. En effet, *Weidenfeller et al*, ont mis en évidence que les neurones pouvaient participer à l'induction du phénotype de BHE. Ils ont montré qu'une co-

culture de cellules endothéliales avec des progéniteurs neuronaux permettaient une diminution de la perméabilité paracellulaire et une augmentation de la résistance trans-endothéliale <sup>412</sup>. Enfin, les neurones sont la principale cible d'une variété de virus dans le SNC comme les JEV et WNV. Étant donné leur sensibilité à ces virus, les neurones sont susceptibles d'être les premiers à réagir en déclenchant la signalisation immunitaire <sup>413,414</sup>.

#### v. **Membrane basale**

Le tube vasculaire est entouré de deux membranes basales, la membrane basale vasculaire interne et la membrane basale parenchymateuse externe, également appelée glia limitans <sup>415-417</sup> (**figure 37**). La membrane basale vasculaire est une matrice extracellulaire sécrétée par les cellules endothéliales et les péricytes tandis que la membrane basale parenchymateuse est principalement sécrétée par les pieds astrocytaires qui s'étendent vers le système vasculaire. La membrane basale des capillaires cérébraux est composée principalement de collagène de type IV, de laminines et de nidogènes formant un réseau extracellulaire de 30 à 40 nanomètres d'épaisseur <sup>418</sup>. Les membranes basales vasculaire et parenchymateuse ont une composition différente, par exemple, la première est constituée des laminines  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  alors que la seconde contient les laminines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  <sup>417</sup>. Ces membranes basales servent de support aux cellules endothéliales. Elles fournissent un point d'ancrage pour de nombreux processus de signalisation au niveau du système vasculaire mais constituent également une barrière supplémentaire pour les molécules qui veulent accéder au tissu nerveux. De plus, au niveau des cellules endothéliales il a été montré *in vitro* que les composants de la membrane basale modulaient l'expression des protéines des jonctions serrées <sup>419</sup>. La perturbation de ces membranes basales par les MMP est une composante importante du dysfonctionnement/rupture de la BHE et de l'infiltration des leucocytes observée dans de nombreux troubles neurologiques engendrés notamment par certains virus émergents <sup>420</sup>.



**Figure 37. Membranes basales de la barrière hémato-encéphalique.**

**Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux n'interagissent pas directement avec les autres cellules de la BHE. En effet, les cellules sont entourées de lames basales. La membrane basale vasculaire est située entre les cellules endothéliales et les péricytes alors que la membrane basale parenchymateuse est présente entre les péricytes et les pieds astrocytaires.**

*(Adapté de: Basement membrane and blood–brain barrier Stroke and Vascular, Images Biorender)*

### **3. Différents mécanismes d'accès au système nerveux central**

Bien que l'accès des agents pathogènes au parenchyme cérébral soit généralement limité par des barrières physiologiques et immunologiques, certains pathogènes peuvent franchir ces barrières. De ce fait, selon le mode d'entrée des virus, de leur tropisme cellulaire et de leur mécanisme d'infection, ils déclenchent une large gamme de symptômes neuronaux qui peuvent dans certains cas entraîner des troubles cognitifs graves <sup>420-422</sup>. Une fois dans le cerveau, une altération de l'homéostasie neuronale déclenchée par la réplication virale et/ou un microenvironnement inflammatoire à long terme peut avoir des effets dramatiques et entraîner des troubles cognitifs <sup>420</sup>. Par exemple, environ 50% des patients infectés par le VIH souffrent de troubles neurologiques légers à graves dans un syndrome appelé "troubles neurocognitifs associés au VIH" (HIV-associated neurocognitive disorders ou HAND) <sup>423</sup>. Les patients infectés par le VIH souffrant de HAND présentent toute une série de déficits cognitifs comme des troubles de la mémoire et de l'attention, des déficiences motrices et sensorielles, des changements d'humeur et de comportement et dans certains cas extrêmes, une démence associée au VIH (HIV associated dementia, HAD) <sup>423</sup>. Dans ce contexte, l'infection du système nerveux par le VIH peut également être liée à l'étiologie de certains troubles cérébraux tels que la sclérose latérale amyotrophique <sup>424</sup> ou la maladie d'Alzheimer <sup>425</sup>. On trouve un autre

exemple parmi les membres de la famille des *Herpesviridae*, comme le cytomégalovirus, qui peut être associé à des troubles du développement neurologique, ainsi que le virus herpès simplex 1 (HSV-1) qui induit une infection latente dans le cerveau et peut dans certains cas, déclencher une encéphalite lorsqu'il est réactivé. Il a notamment été constaté que ces deux virus induisaient des troubles cognitifs importants dans la population générale <sup>426</sup> et il a été proposé qu'ils soient également impliqués dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer <sup>427,428</sup>. D'autres virus tels que les entérovirus (exemple l'échovirus-30) peuvent provoquer des méningites ou des encéphalites <sup>429</sup>. Enfin, le virus de la rougeole particulièrement chez l'enfant, peut entraîner une pathologie neuronale progressive telle que la panencéphalite sclérosante subaigüe, causée par des complications associées, qui peut entraîner des troubles du comportement, un déclin cognitif et des convulsions <sup>430</sup>.

Toutefois, l'accès au cerveau, organe immunologiquement et structurellement « isolé » nécessite pour ces agents infectieux des interactions complexes avec les barrières physiques et des mécanismes intracellulaires régulant les échanges SNC-périphérie. Cela peut se faire directement par des effets dû aux pathogènes ou indirectement par des mécanismes associés à l'inflammation. Par conséquent, les virus neurotropes ont été sélectionnés tout au long de l'évolution pour leur capacité à accéder au SNC ou en fonction de leur cycle de réplication et de leurs effets cellulaires <sup>431,432</sup>. Il existe différents mécanismes d'entrée du virus dans le SNC. L'accès au cerveau peut se faire par le transport axonal et/ou par le passage direct ou indirect à travers les barrières cérébrales <sup>431-433</sup>.

### **a. Infection du système nerveux central *via* la barrière hémato-encéphalique**

#### **i. Infection par transcytose**

Après une infection systémique, certains virus atteignent la BHE par voie hématogène et peuvent traverser la barrière endothéliale afin d'atteindre le SNC sans induire d'effet cytopathogène (ECP) remarquable et sans se répliquer dans les cellules <sup>434</sup> (**figure 38a**). De plus, certains virus peuvent atteindre le SNC en passant la barrière endothéliale à travers les jonctions serrées perturbées en raison des niveaux élevés de virémie et d'inflammation <sup>435</sup> (**figure 38b**).

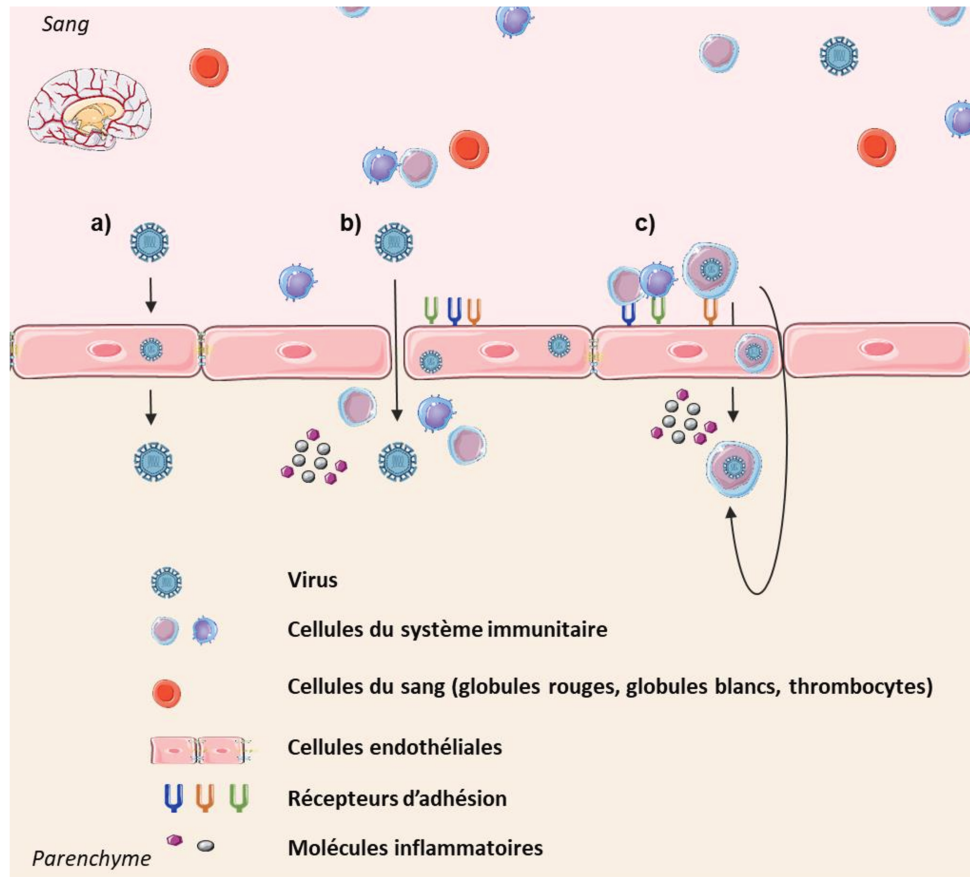
## **ii. Infection des cellules endothéliales**

Dans certaines infections, les virus présents dans le système circulatoire peuvent infecter les cellules endothéliales de la BHE et se répliquer au sein de celles-ci (**figure 38a**). La réplication du virus dans les cellules endothéliales peut n'entraîner aucun ECP significatif dans les cellules et permettre la libération des particules virales dans le SNC à travers les membranes basolatérales <sup>436,437</sup>. Dans d'autres cas, l'infection directe des cellules endothéliales peut entraîner une perturbation de l'intégrité de la BHE ou la mort des cellules permettant ainsi l'invasion du virus au niveau du SNC (**figure 38b**). Cette infection s'accompagne parfois d'une migration incontrôlée des cellules immunitaires dans le cerveau. De plus, l'inflammation systémique due à l'activation des cellules immunitaires lors de l'infection peut être associée à la libération de médiateurs inflammatoires qui est généralement la cause des troubles neurologiques. Certains virus comme le *Human T-Lymphotropic Virus-1* (HTLV-1) peuvent perturber l'intégrité de la BHE en affectant les protéines des jonctions serrées <sup>438</sup>.

## **iii. Infection par le mécanisme de cheval de Troie**

Certains virus peuvent accéder au SNC sans infecter les cellules endothéliales de la BHE ou épithéliales de la barrière sang-LCR. En effet, plusieurs virus sont capables d'infecter les cellules immunitaires circulantes dans le sang et peuvent infiltrer de cette façon le SNC (**figure 38c**). Ce mécanisme est appelé « cheval de Troie », du fait que les virus cachés dans les cellules du système immunitaire sont capables de traverser la BHE <sup>439</sup>. La stratégie du cheval de Troie a été proposée pour de nombreux virus dans diverses études d'infection *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins par exemple <sup>440-443</sup>. Plusieurs types de cellules immunitaires peuvent être infectés et traverser la BHE comme les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques <sup>440,444-447</sup>. Par exemple, le VIH peut accéder au SNC par ce mécanisme après infection de monocytes ou de macrophages <sup>448</sup>. Dans des conditions physiologiques, l'infiltration des cellules immunitaires est limitée au sein de la BHE. L'infiltration des lymphocytes dans le SNC se fait par un processus de liaison à l'endothélium cérébral, de « roulement » le long de la paroi de l'endothélium, d'adhésion et de transmigration à travers la barrière endothéliale. L'activation des cellules endothéliales cérébrales avec une expression accrue des

récepteurs d'adhésion et une sécrétion accrue des chimiokines est également impliquée dans l'attraction des cellules immunitaires infectées vers le cerveau <sup>436,449</sup>.



**Figure 38. Infection du système nerveux central à travers la barrière hémato-encéphalique.**

(Source: Images Servier Medical Art)

### **b. Infection du système nerveux central via le plexus choroïde**

Plusieurs virus traversent la barrière sang-LCR pour pénétrer dans le SNC. Le plexus choroïde répond à cette infection par la production de chimiokines et de cytokines ainsi que par des altérations de la fonction barrière du sang-LCR. Au cours d'une maladie infectieuse du SNC, les cellules immunitaires de l'hôte pénètrent dans le SNC contribuant finalement aux dommages cellulaires causés par la maladie. Le virus coxsackie B3, par exemple, passe la barrière sang-LCR en infectant directement les cellules myéloïdes qui sont hautement susceptibles à l'infection <sup>450</sup>. L'échovirus-30 peut quant à lui infecter directement les cellules épithéliales du plexus choroïde et répliquer au sein de celles-ci <sup>451</sup>. Des études ont montré que le plexus choroïde pouvait être infecté par le VIH chez l'Homme et ces résultats sont conformes à l'hypothèse

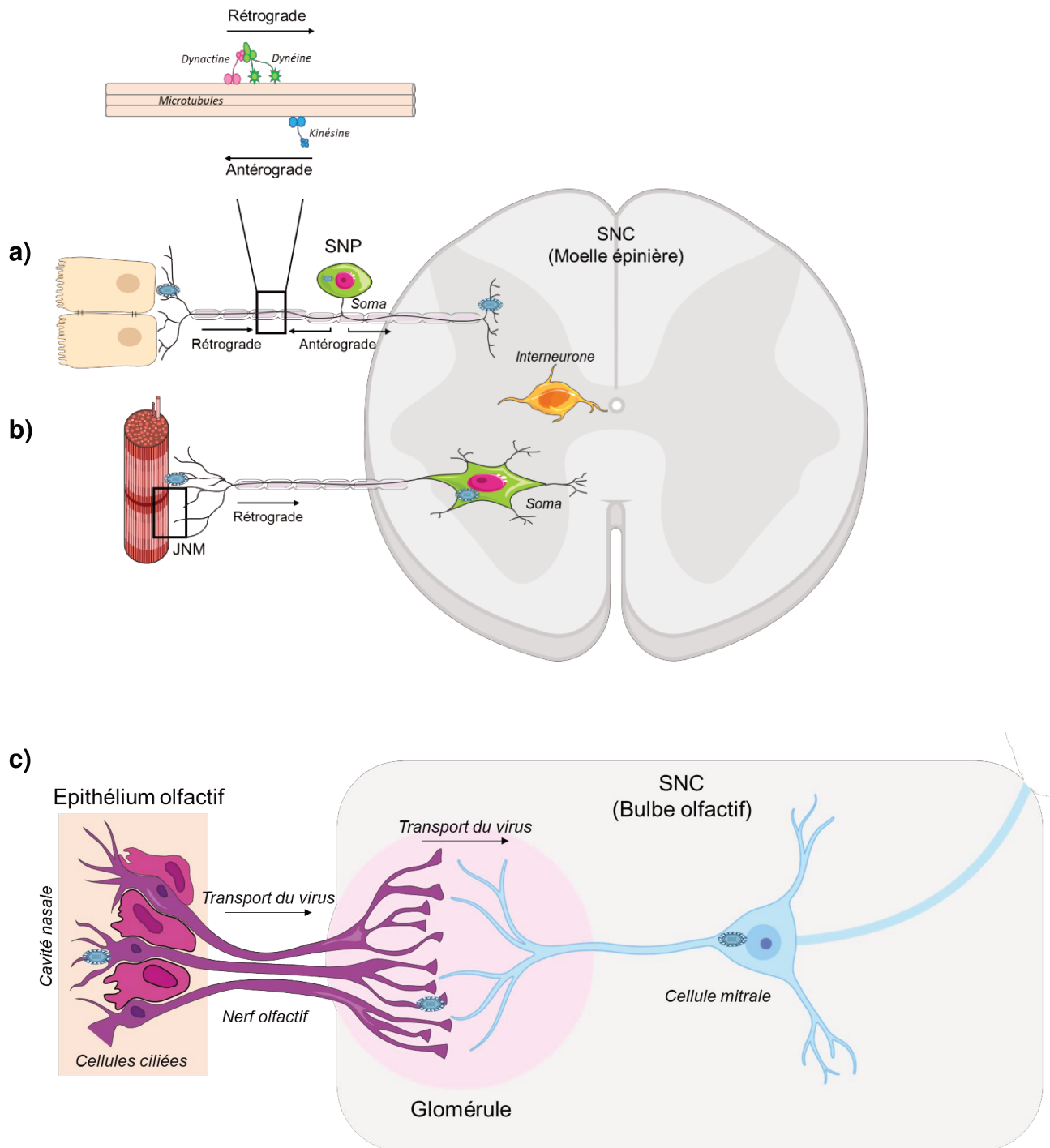
selon laquelle le plexus choroïde serait un réservoir d'infection par le VIH dans le SNC  
452,453 .

### **c. Infection du système nerveux central via le transport axonal**

Certains virus peuvent également entrer directement au niveau des différentes terminaisons nerveuses : les terminaisons nerveuses sensorielles, les jonctions neuromusculaires (JNM) mais aussi les terminaisons des neurones au niveau des épithéliums olfactifs (**figure 39**). Par exemple des virus peuvent pénétrer dans le SNP en se liant à des récepteurs situés sur les extrémités axonales des neurones sensoriels et autonomes qui transmettent respectivement des informations sensorielles et viscérales (**figure 39a**). En effet, les récepteurs de nombreux agents pathogènes semblent être concentrés au niveau des synapses. Les synapses sont des régions à forte dynamique membranaire en raison de l'exo-endocytose des vésicules synaptiques qui se produit lors de la stimulation. La plupart des alpha-herpèsvirus utilisent cette voie pour pénétrer dans le SNP et pour établir une infection persistante tout au long de la vie <sup>454</sup>. Les particules virales d'alpha-herpèsvirus pénètrent dans les terminaisons nerveuses sensorielles suite à la reconnaissance d'un de leur récepteur tel que les récepteurs nectine-1 ou nectine-2 par fusion membranaire. La fusion avec la membrane plasmique est indépendante du pH et les particules virales d'alpha-herpèsvirus pénètrent "nus" dans le cytoplasme. Dans l'axoplasme, les protéines tégumentaires (le tégument est une structure qui occupe l'espace entre la nucléocapside et l'enveloppe et contient de nombreuses protéines codées par le virus, appelées protéines tégumentaires) exposées peuvent recruter des protéines adaptatrices et des moteurs qui seront transportés le long des microtubules vers le corps de la cellule neuronale (le soma) par transport rétrograde <sup>455</sup>. La propagation de ces virus au SNC nécessite un transport axonal antérograde du soma vers la moelle épinière. Les moteurs moléculaires jouent un rôle majeur dans le transport axonal en déplaçant les cargaisons le long des voies cytosquelettiques de manière dépendante de l'ATP. Trois classes différentes de moteurs cellulaires sont connues : les dynéines et les kinésines cytoplasmiques qui se déplacent sur les microtubules et les myosines qui progressent le long des filaments d'actine <sup>456,457</sup>. La dynéine s'associe avec la dynactine (qui intervient dans la liaison des cargos sur la dynéine) et plusieurs protéines afin d'assurer le transport rétrograde (transport des synapses vers le corps cellulaire) alors que les kinésines sont impliquées dans le transport antérograde



(transport du soma vers des terminaisons nerveuses). Les protéines associées au cytosquelette sont des acteurs clés dans la régulation du transport motorisé. D'autres virus, comme le virus de la rage (RABV), entrent dans le SNC par l'intermédiaire de JNM (**figure 39b**). Les JNM sont des synapses spécialisées entre les muscles et les motoneurones qui facilitent et contrôlent le mouvement des muscles. La plupart des motoneurones ont leur corps cellulaire dans la moelle épinière. Le RABV entre dans les axones des motoneurones au niveau des JNM directement après une morsure d'un animal infecté <sup>458</sup>. Son entrée aux JNM est due à la présence de récepteurs RABV tels que les molécules d'adhésion des cellules neurales (NCAM) et les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine <sup>458</sup>. La fusion avec la membrane plasmique pour le RABV est dépendante du pH (pH <6,4) et permet la libération du virus dans le cytoplasme. La propagation transneuronale se produit exclusivement entre les neurones synaptiques connectés et l'infection se déplace de façon unidirectionnelle des neurones post-synaptiques (JNM) aux neurones pré-synaptiques (SNC). Le virus infecte la cellule pré-synaptique par bourgeonnement de la membrane de la cellule avec en particulier la glycoprotéine RABV-G en surface qui facilite l'entrée dans la nouvelle cellule hôte <sup>459,460</sup>. Le virion se lie au récepteur p75NTR (p75 Nerve Growth Factor receptor) et est ainsi internalisé dans un endosome puis transporté le long de l'axone jusqu'au corps cellulaire, lieu de sa réplication <sup>460</sup>. Enfin, il est aussi possible que les virus tels que le CHIKV, infectent les neurones et l'épithélium olfactif afin d'envahir le SNC <sup>461</sup> (**figure 39c**). Le nerf olfactif qui appartient au SNP innerve l'épithélium olfactif et se termine par le bulbe olfactif dans le SNC. Cependant, l'épithélium olfactif est bien protégé de la plupart des infections par le mucus et par la présence de plusieurs PRR (comme les TLR, les RLR et les NLR) <sup>462</sup>. Les coronavirus humains (HCoV) peuvent entrer dans le SNC par le bulbe olfactif. En effet, l'ablation de cette partie du cerveau limite ses capacités neurotropes chez la souris. La capacité des HCoV à atteindre le SNC après l'infection nasale a été décrite chez la souris, en particulier pour le HCoV-OC43 <sup>463</sup>. De plus, ces études ont été confortées avec la détection du HCoV-OC43 dans des échantillons nasopharyngés d'un enfant <sup>464</sup>.



**Figure 39. Infection du système nerveux central par transport axonal.**

Certains virus peuvent également atteindre le SNC en passant par a) les terminaisons nerveuses sensorielles et autonomes, b) par le biais des jonctions neuromusculaires ou c) par les terminaisons des neurones au niveau des épithéliums olfactifs. Les microtubules représentés en a) sont des polymères de  $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline qui participent au transport intracellulaire.

Abréviations: JNM, jonction neuromusculaire ; SNC, système nerveux central ; SNP, système nerveux périphérique. (*Adapté de: Virus Infections in the Nervous System, Images Biorender et Servier Medical Art*)

## V. Infection du système nerveux central par les *flavivirus*

La plupart des infections flavivirales chez l'Homme sont asymptomatiques mais parfois les infections peuvent induire des maladies graves, notamment neuroinvasives <sup>465</sup> c'est le cas par exemple avec le WNV <sup>466–469</sup>, avec le DENV <sup>470–474</sup>, avec l'YFV <sup>475,476</sup>, avec le JEV <sup>465,477–480</sup> ou encore avec le TBEV <sup>481–483</sup>. Les infections arbovirales étant le plus souvent considérées comme aigües, les symptômes neurologiques, à l'exception des troubles du développement neurologique ont été largement observés sur une courte période. Les infections du SNC peuvent provoquer des maladies telles que la méningite, l'encéphalite, la méningo-encéphalite, la myélite et la paralysie aigüe <sup>484</sup>. Les épidémies du ZIKV et les syndromes congénitaux associés suggèrent cependant que les infections arbovirales peuvent avoir des effets durables sur le système nerveux. Pour étudier au laboratoire l'accès au SNC par les virus l'utilisation de petits modèles animaux est une alternative pour contourner les complications techniques des études humaines et pour refléter au mieux la complexité du SNC contrairement aux modèles cellulaires simples. A l'exception des quelques études portant sur des échantillons humains ou sur des primates non humains, la plupart des résultats *in vivo* ont été obtenus avec des modèles expérimentaux limités. En effet, les souris sauvages adultes sont résistantes aux infections d'un grand nombre de *flavivirus*. Pour remédier à ce problème, les souris déficientes au récepteur à l'interféron de type I (*ifnar*<sup>-/-</sup>) peuvent être un modèle pertinent puisque la réponse de l'IFN dans les cellules humaines est normalement contrée par ces virus, notamment *via* la dégradation de STAT2. Dans cette lignée murine (A129, IFNAR KO) rétrocroisée sur un fond génétique C57BL/6, l'expression du récepteur à l'IFN de type I est abolie <sup>485</sup>. Le récepteur IFN de type I joue un rôle important dans l'immunité antivirale innée et son absence diminue fortement sa réponse. Ce type de souris a déjà largement été utilisé pour étudier le rôle de la réponse IFN dans les maladies virales <sup>486</sup>. D'autres lignées de souris transgéniques existent pour étudier les infections virales comme les souris AG129 qui ont une perte des récepteurs IFN de type I et II ou des souris qui ont une déficience des récepteurs IFN de type I et III. Certaines équipes utilisent aussi des souriceaux, âgés d'environ une semaine, sensibles à l'infection virale puisqu'ils n'ont pas encore développé une réponse fonctionnelle à l'IFN <sup>264</sup>.

## 1. Virus du Nil Occidental (WNV)

La voie d'entrée préférentielle du WNV dans le SNC n'est pas clairement définie. Chez la souris, des travaux montrent que le WNV peut accéder au SNC par la circulation sanguine, en infectant les terminaisons nerveuses sensorielles mais aussi les neurones olfactifs, ou en traversant la BHE mais pas en utilisant le transport *via* les JNM <sup>487</sup>. Cependant, le rôle de la perturbation de la BHE pour la neuroinvasion du WNV est controversé.

En effet, des études *in vitro* mettent en évidence d'une part que les particules de type viral (VLP) du WNV sont capables de traverser les *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) de la face apicale à la face basolatérale <sup>488</sup> et d'autre part que le WNV peut également infecter directement les *human brain microvascular endothelial cells* (HBMEC) <sup>489</sup>. De plus, d'autres études concluent que le WNV est capable de traverser la BHE sans en altérer l'intégrité mais entraînant une expression accrue des CAM telles que VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine <sup>436</sup>. En parallèle, des protéines virales ont été détectées dans les lymphocytes T des cerveaux de souris infectées par le WNV <sup>443</sup>. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'infection des cellules endothéliales pourrait faciliter la migration des leucocytes au parenchyme et que l'infiltration des cellules T pourrait être une source de virus entrant dans le SNC à la suite d'une infection systémique <sup>443</sup>. Le WNV peut également pénétrer dans le SNC en infectant les monocytes, les cellules dendritiques ou les macrophages <sup>440,490</sup>.

Ensuite des études *in vivo* et *in vitro* montrent que l'infection par le WNV induit la dégradation des protéines des jonctions serrées et adhérentes <sup>491</sup>, ce qui entraîne la perturbation de la BHE (en particulier en présence de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL6 et des MMP) <sup>492-494</sup> ainsi que l'infiltration des leucocytes dans le cerveau <sup>494</sup>. Des études complémentaires affirment que le WNV peut également infecter les astrocytes et les cellules neuronales <sup>489,493,495</sup> et que l'activation des astrocytes semble participer à la rupture de la BHE observée lors de l'infection. Néanmoins, il est important de noter que malgré une virémie élevée aucune perméabilité détectable de la BHE n'a été observée aux premiers stades de l'infection chez la souris. Une rupture nette de la BHE n'est détectée qu'à des moments tardifs lorsque le titre viral du cerveau est déjà élevé <sup>496</sup>.

Enfin, des études ont signalé que la transduction du signal par les récepteurs IFN de type I et/ou III est importante pour le maintien de l'intégrité de la BHE et pour

le contrôle de la neuroinvasion du WNV<sup>497,498</sup>. De plus, les souris déficientes en TLR3 sont protégées contre la dégradation de la BHE, l'invasion virale, l'infiltration des leucocytes et la létalité ce qui indique que l'inflammation systémique est déterminante pour la dissémination du virus<sup>493,499</sup>.

## **2. Virus de la Dengue (DENV)**

Jusqu'à présent, la voie d'entrée la plus probable du DENV dans le SNC est la voie hématogène<sup>500</sup>. La BHE joue donc un rôle important en favorisant la neuroinvasion et le neurotropisme du virus.

Le DENV est capable d'infecter *in vitro*, les HUVEC<sup>501</sup> et les HBMEC<sup>502</sup>. Cette infection entraîne la libération élevée de particules virales infectieuses, une expression augmentée de l'ICAM-1, une sécrétion élevée de cytokines et de chimiokines inflammatoires ainsi que la mort cellulaire<sup>502</sup>. La découverte de la mort cellulaire corrèle avec les observations faites par *Limonta et al* où des cellules endothéliales apoptotiques ont été détectées dans le cerveau de patients cubains morts suite à l'infection du DENV<sup>503</sup>. Le DENV peut également infecter des cellules endothéliales cérébrales primaires de souris (MBEC) cultivées soit seules soit avec des astrocytes primaires. L'infection des MBEC modifie la structure et la fonction de la BHE en modifiant la perméabilité de l'endothélium et la localisation des protéines de jonctions serrées telles que ZO-1 et claudine 1 et permet le passage paracellulaire des VLP<sup>504</sup>. L'infection des MBEC a également induit l'expression de VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1 ainsi que d'E-selectine. L'activation des cellules endothéliales due à l'infection a été également signalée sur la base de la sécrétion de VCAM-1 et de ICAM-1 solubles<sup>505</sup>. Il a également été démontré *in vitro* que la lignée cellulaire de microglie murine (BV2)<sup>506</sup> et les neurones BALB/c ou humains<sup>507</sup> sont sensibles à l'infection par le DENV. L'infection des microglies entraîne une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires ainsi que des MMP<sup>506</sup>. Par ailleurs, des modèles animaux d'infection par le DENV ont montré une infection neuronale et des lésions des tissus nerveux<sup>508</sup>. En effet, le DENV injecté par voie intraveineuse chez des souris BALB/c âgées de 2 mois atteint le SNC et induit une altération des cellules neurogliales, la mort cellulaire, une désorganisation de la matière blanche et une infiltration de leucocytes entraînant une perturbation de la BHE<sup>509</sup>. De plus, chez les souris les antigènes du DENV ont été détectés dans les cellules endothéliales et dans les microglies. Le phénotype activé des cellules infectées, l'astrocytose et l'infiltration de leucocytes proches des

foyers hémorragiques ont également été mis en évidence <sup>500</sup>. Ces résultats suggèrent que l'interaction virus-BHE pourrait être pertinente pour la neuropathogénèse du DENV.

Une avancée majeure dans l'étude de la neuropathogénèse du DENV est venue des conclusions selon lesquelles les souris déficientes en récepteurs IFN de type I et/ou III sont sensibles à l'infection et développent une virémie élevée, une paralysie et la mort <sup>510</sup>. La signalisation de l'IFN  $\gamma$  est essentielle pour protéger le SNC contre l'invasion virale grâce à une réponse à médiation cellulaire T CD8<sup>+</sup> <sup>511</sup>. Enfin, la dissémination du DENV a également été obtenue dans un modèle d'infection chez les primates non humains avec une facilitation de l'infection par les anticorps (*Antibody-dependant enhancement, ADE*) <sup>512</sup>. Des Ouisitis (*Callithrix penicillata*) ont été infectés par le sérotype 3 du DENV par voie sous-cutanée, puis traités avec des anticorps anti-sérotype 2 du DENV pour imiter l'ADE. Après plusieurs inoculations, l'antigène du virus et l'activation des microglies (changements de morphologie) ont été détectés dans le cerveau ainsi que des signes d'inflammation (immunomarquage intense de TNF- $\alpha$ ) <sup>512</sup>.

### **3. Virus de la Fièvre jaune (YFV)**

Les mécanismes exacts par lequel l'YFV accède au cerveau et si l'YFV est capable de perturber la BHE restent incertains. En effet, les souris adultes sont résistantes à l'inoculation systémique du YFV et des lésions cérébrales n'ont été détectées que lors de l'inoculation de doses élevées de virus. C'est pourquoi, les études neurologiques ont principalement été réalisées par inoculation intracérébrale de souches neuro-adaptées en laboratoire <sup>513</sup>. Sur la base de ces modèles, il a été suggéré que l'YFV accède au SNC par voie hématogène <sup>514</sup>. Des études sur des souris déficientes en récepteur IFN de type I et/ou de type III ont été réalisées <sup>515,516</sup>. Ces études démontrent que les souris *ifnar*<sup>-/-</sup> présentent une virémie accrue et une charge virale élevée dans les organes systémiques ainsi que dans le cerveau comparées aux souris contrôles <sup>515</sup>. Les souris déficientes en IFNAR et IFNLR (*ifnar*<sup>-/-</sup> / *ifnlr*<sup>-/-</sup>) quant à elles, succombent à l'infection <sup>516</sup>. Ces souris ont présenté une infection systémique accrue et une augmentation progressive de la charge virale dans le cerveau, associée à des signes de perturbation de la BHE. Dans les deux modèles de souris, la perméabilité de la BHE n'était visible qu'à 5 jours post infection (dpi) alors que le virus était déjà détecté à 3 dpi ; il est donc difficile de déterminer si la perturbation de la BHE était nécessaire à l'invasion du virus. Enfin, il est important de noter que la signalisation

d'IFN de type III est très importante pour préserver l'intégrité de la BHE et contrôler l'invasion virale dans le cerveau <sup>516</sup>.

#### **4. Virus de l'Encéphalite japonaise (JEV)**

La neuroinfection du JEV est caractérisée par une perturbation de la BHE et une inflammation étendue dans le cerveau <sup>479,480</sup>. Cependant, la voie d'entrée du JEV dans le SNC et les mécanismes associés à la réponse inflammatoire ne sont pas complètement élucidés.

Des études *in vitro* mettent en évidence que le JEV peut infecter directement les HBMEC sans affecter leur viabilité mais entraîne une augmentation de la perméabilité de la monocouche endothéliale en diminuant l'expression et en altérant la localisation des protéines des jonctions serrées et adhérentes <sup>517,518</sup>. L'infection d'un modèle de BHE humaine contenant des HBMEC et des astrocytes démontre que les deux types cellulaires peuvent être infectés par le JEV et que l'interaction de ces deux types cellulaires est nécessaire pour induire la perturbation de la BHE causée par une sécrétion accrue de cytokines inflammatoires <sup>519</sup>. En effet, le JEV est capable d'infecter un grand nombre de cellules présentes dans le cerveau comme les astrocytes, les péricytes et les microglies <sup>520</sup>. L'infection *in vitro* de ces cellules par le JEV induit la libération de médiateurs solubles tels que MMP, IL6, VEGF, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  qui participent à la dégradation des protéines de jonctions serrées ainsi qu'à la perturbation de la perméabilité de la BHE <sup>520,521</sup>. Les astrocytes infectés par le JEV mènent aussi à une augmentation de la production de CXCL10 qui module la migration des cellules immunitaires dans le SNC <sup>522</sup>.

Des études *in vivo* chez les primates et chez les souris mettent en évidence que l'infection par le JEV entraîne la perturbation de la BHE, l'infiltration des leucocytes et une activation des astrocytes et de la microglie <sup>480,523,524</sup>. Ces études montrent que l'infection directe des cellules endothéliales n'est pas responsable à elle seule de la dégradation de la BHE. C'est la réponse inflammatoire associée, déclenchée après la dissémination du virus dans le SNC qui favoriserait la perméabilité de la BHE et les syndromes neurologiques qui en découlent. En effet, les souris infectées par le JEV ont présenté un ARN viral dans le cerveau à partir de 2 dpi alors qu'une perturbation significative de la BHE n'a été observée qu'à partir de 4 dpi <sup>524</sup>.

## **5. Virus de l'Encéphalite à tiques (TBEV)**

La pathogénèse du TBEV chez l'Homme n'est pas complètement déterminée, mais des modèles d'infection *in vivo* et *in vitro* ont permis de dévoiler certains aspects de l'infection. Tout d'abord, une fois que le TBEV a atteint le SNC, les neurones sont considérés comme la principale cible de la réplication du virus. *In vitro*, le TBEV se réplique, se déssimine et induit un ECP dans les neurones humains primaires et dans les lignées cellulaires neuronales humaines<sup>525,526</sup>. Les astrocytes sont également sensibles à la réplication du TBEV. En effet, l'infection du TBEV dans les astrocytes primaires humains et de rats induisent une libération de particules virales productives et persistantes sans aucune cytotoxicité pendant au moins 14 jours<sup>527</sup>. Cette infection entraîne l'activation des astrocytes, l'augmentation de l'expression des cytokines et de chimiokines inflammatoires et une production accrue de MMP<sup>528</sup>. Cependant, l'infection du TBEV induit l'expression de l'IFN de type I dans les astrocytes ce qui peut limiter la dissémination du virus<sup>529</sup>. Néanmoins, les voies par lesquelles le TBEV atteint les astrocytes et les neurones n'ont pas été déterminées. Il a été démontré récemment que le TBEV se réplique dans les HBMEC et transmigre à travers la BHE *in vitro* sans affecter l'expression ou la localisation des protéines de jonctions serrées ni l'expression des CAM<sup>530</sup>. L'analyse cinétique de la dissémination du virus et de l'intégrité de la BHE *in vivo* dans des modèles murins indiquent que les particules virales infectieuses sont détectées dans le cerveau des souris infectées 7 jours post infection et que la perturbation de la BHE est détectée 10 jours post infection. À 10 dpi, les symptômes cliniques étaient les plus évidents et les souris ont commencé à mourir<sup>531</sup>. Prises ensemble, ces données indiquent que l'infection des cellules endothéliales par le TBEV n'a pas d'effet sur l'intégrité de la BHE. L'impact sur l'intégrité de la BHE est peut-être plutôt une conséquence de l'infection cérébrale (par médiation cytokinique)<sup>531</sup>. En effet, de fortes doses de TNF- $\alpha$  peuvent perturber la BHE et des niveaux élevés de TNF- $\alpha$  ont été observés chez des patients atteints d'encéphalite à tiques durant la première semaine d'hospitalisation<sup>532</sup>. Enfin, le TBEV peut également atteindre le SNC après une infection intranasale<sup>533</sup>.

## **6. Virus Zika (ZIKV)**

Des particules virales et de l'ARN viral ont été détectés dans le cerveau de souris inoculées par différentes voies<sup>534,535</sup>, dans des organoïdes cérébraux infectés *in vitro*<sup>536</sup> et dans le LCR de singes rhésus infectés<sup>537</sup>. Cependant, les mécanismes



associés à l'invasion cérébrale ne sont pas encore clairs. Des études *in vitro* indiquent que les cellules endothéliales de la BHE sont permissives à la réplication de différentes souches du ZIKV et que le virus peut traverser la barrière endothéliale sans perturber la perméabilité et en gardant intact les jonctions serrées et adhérentes<sup>437,538-540</sup>. Les souches africaines et asiatiques du ZIKV sont capables d'infecter directement les HBMEC cultivées dans un transwell, de s'y répliquer et de libérer des particules virales du côté basolatéral. Les particules virales libérées peuvent infecter d'autres cellules cultivées à part du filtre. De plus, le ZIKV infecte et traverse les cellules endothéliales cérébrales (i-BMEC) dérivées de cellules souches pluripotentes sans compromettre l'intégrité de la BHE<sup>540</sup>. Des résultats récents viennent compléter ces données, en effet *in vitro*, les HBMEC infectées avec 3 souches du ZIKV présentent une modulation de leurs protéines de jonctions serrées. Le niveau d'expression de ZO-1 a été significativement régulé à la hausse par l'une des souches tandis que les niveaux d'occludine et de claudine 5 ont été significativement régulés à la baisse dans les HBMEC infectées par les trois souches virales étudiées sans perturber la perméabilité des HBMEC<sup>541</sup>. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le ZIKV peut traverser la BHE par la voie de réplication dépendant de l'endocytose et de l'exocytose, par transcytose ou par le mécanisme de cheval de Troie. En effet, lors d'une infection par le ZIKV, il y a une sécrétion de facteurs inflammatoires qui peut contribuer au recrutement de leucocytes. D'autant plus, que dans un modèle de co-culture (HBMEC (sur le transwell) et astrocytes (dans le puit)), des monocytes infectés par le ZIKV ont été ajoutés du côté apical (cellules endothéliales) et les auteurs ont observé que les astrocytes situés du côté basolatéral étaient infectés ce qui suggèrent que les monocytes infectés ont traversé la BHE et libéré du virus infectieux<sup>538</sup>. Plus récemment il a été démontré que les monocytes infectés avec le ZIKV (isolés du sang de patients infectés de Colombie et du Panama) présentent une expression plus élevée de CAM et une plus grande capacité à se fixer sur la paroi des vaisseaux et à migrer à travers les endothéliums. Ce phénotype est associé à une meilleure dissémination virale vers les cellules du SNC<sup>542</sup>. D'ailleurs, les cellules du SNC telles que les cellules progénitrices neurales humaines (NSG), les astrocytes, les neurones, les cellules microgliales et les cellules de la crête neurale sont sensibles à l'infection du ZIKV. L'infection par le ZIKV dans les cellules de la crête neurale, dans une lignée cellulaire neuronale et dans les cellules microgliales entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires qui vont engendrer respectivement des problèmes pour

la neurogénèse et pour la neuropathogénèse virale dans le SNC en développement ou mature <sup>543-545</sup>. Afin de déterminer le tropisme des lignées du ZIKV une étude a comparé une souche asiatique (H/PF/2013) à une souche africaine (ArB41644). Les auteurs ont montré que les deux lignées ciblaient efficacement les NSG et les astrocytes et que la neurovirulence et les neuropathologies sont susceptibles d'être associées à la souche africaine car elle infecte et se réplique plus efficacement que la souche asiatique <sup>546</sup>. L'infection de deux lignées africaines ZIKV MR766 et ZIKVAF-976 ainsi que deux lignées asiatiques ZIKVAS-FP13 et ZIKVAS-Sur16 dans les NSG confortent ces résultats, comme précédemment, les souches africaines infectent, se répliquent et provoquent plus de mort cellulaire que les lignées asiatiques <sup>547</sup>. De plus, dans les cellules endothéliales de la BHE, la souche asiatique n'induit pas d'ECP ni de mort cellulaire alors que la lignée africaine est associée à un ECP <sup>437</sup>.

*In vivo* chez les souris *ifnar<sup>-/-</sup>*, la présence d'ARN viral est détecté 2 jours après une infection systémique avec aucune sévère perturbation de l'intégrité de la BHE <sup>437</sup>. A des temps plus tardifs (5 dpi) quelques perturbations de la BHE sont observées. L'immunomarquage de la protéine de l'enveloppe du ZIKV révèle leur présence au niveau des vaisseaux sanguins et dans les cellules du plexus choroïde des zones subventriculaires. Étant donné que le recrutement des leucocytes dans le cerveau semble être déterminant pour la lésion neuronale et la létalité induite par le ZIKV <sup>548</sup>, nous pouvons supposer que la perturbation ultérieure de la BHE a peut-être été déclenchée par la réponse inflammatoire qui a suivi la réplication du virus. L'infection par la souche africaine (ZIKVMR766) mais pas par la souche asiatique (ZIKVPE243) entraîne la mort des souris <sup>549</sup>. Les preuves de la dégradation de la BHE, notamment les fuites d'IgG endogènes dans le cerveau et les lésions microhémorragiques ont été détectées qu'en cas d'infection par la souche africaine. *In vivo*, 3 souches du ZIKV ont été injectées par voie intraveineuse à des souris sauvages de type C57BL/6J. Suivant la souche utilisée, à 2 dpi les souris présentent ou non une perturbation de l'intégrité de la BHE avec dans certains cas une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées ou adhérentes telles que la claudine 5. Leurs résultats suggèrent que le ZIKV pénètre dans le parenchyme cérébral tôt après l'infection avec des altérations simultanées de l'expression des protéines des jonctions serrées et une perturbation de la perméabilité de la BHE de manière dépendante de la souche <sup>541</sup>. En parallèle, il a également été mis en évidence que chez la souris le ZIKV traverse la barrière sang-LCR en perturbant la couche épithéliale du plexus choroïde afin d'atteindre le SNC <sup>550</sup>.

De plus, l'infection par le ZIKV pendant la période embryonnaire a aussi un impact sur la fonction vasculaire, en particulier la BHE <sup>551</sup>. L'inoculation de souris au jour embryonnaire 14,5 perturbe le développement neurovasculaire de la souris entraînant une microcéphalie postnatale et des lésions cérébrales. L'analyse des cerveaux à la période postnatale indique une augmentation significative de la densité et du diamètre des vaisseaux dans le cortex cérébral avec des signes de fuite de la BHE. De plus, le cerveau présentait une activation microgliale importante, une astrogliose et des niveaux élevés d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  <sup>551</sup>. Une réponse immunitaire excessive peut également nuire au développement neurovasculaire entraînant une augmentation de la perméabilité de la BHE et des lésions cérébrales. Enfin, un modèle de primate non humain, le macaque rhésus d'origine indienne a été utilisé afin de mieux comprendre les caractéristiques de la neuropathie induite par le ZIKV chez l'adulte. Ils ont observé que le virus provoque une neuroinflammation aiguë et chronique prévalente ainsi qu'une perturbation de la BHE chez les animaux adultes. L'infection entraîne une augmentation significative, ciblée et durable de la chimiokine CXCL12 dans SNC. CXCL12 joue un rôle aussi bien dans la régulation du trafic des lymphocytes à travers la BHE vers le SNC que dans la réparation du tissu nerveux endommagé <sup>552</sup>.

### **7. Virus Usutu (USUV)**

L'ARN d'USUV a été détecté par RT-PCR dans le LCR de patients souffrant de méningo-encéphalite, suggérant que le virus peut établir une infection dans le cerveau <sup>272</sup>. A l'heure actuelle, il y a peu d'études *in vivo* et *in vitro* s'intéressant à la pathogénèse d'USUV.

*In vitro*, il a été mis en évidence que l'USUV peut infecter des astrocytes primaires en culture. De plus, des études plus complètes ont confirmé ces résultats et ont en plus mis en évidence que l'USUV peut établir une infection productive et induire l'apoptose dans un large éventail de cellules du SNC comme dans les neurones, les astrocytes, les cellules microgliales et les cellules souches neurales <sup>553</sup>. Il a également été montré qu'USUV peut infecter et se répliquer dans les cellules souches neurales pluripotentes induites qui représentent les cellules progénitrices neurales dans le cerveau du fœtus en développement et dans le cerveau adulte <sup>554</sup>. Ces résultats suggèrent qu'USUV peut potentiellement causer des atteintes neurologiques.

*In vivo*, l'infection par l'USUV de souris allaitantes âgées d'une semaine a entraîné des paraplégies et des paralysies. Ces infections sont associées avec

l'apoptose et la démyélination des cellules gliales et neuronales <sup>265</sup>. Une étude a mis en évidence que les souris swiss adultes n'étaient pas sensibles au USUV, par contre l'infection par l'USUV induit une forte mortalité dans les souris allaitantes ou dans les souris AG129 <sup>264,265,555</sup>. Par ailleurs, une étude récente de 2020 utilisant des souris sauvages 129/Sv âgées de 5 semaines met en évidence que ces souris ont une sensibilité variable à l'infection d'USUV selon la voie d'injection <sup>268</sup>. En effet, les auteurs ont utilisé différents modes d'infections : une infection cutanée par injection intradermique (i.d.) qui imite probablement mieux l'infection naturelle chez l'Homme par des agents pathogènes transmis par les moustiques, l'inoculation intranasale (i.n.) pour évaluer le potentiel de transmission par aérosol de nombreux arbovirus ou encore l'inoculation périphérique (par exemple, sous-cutanée ou i.p.) qui reflète à la fois la neurovirulence et la neuroinvasivité du virus. Les souris ont été infectées avec deux lignées : la lignée Europe 3 et la lignée Africa 3. Ils ont montré que presque toutes les souris ont survécu aux infections d'USUV mais ont développé une infection neuroinvasive et une réponse anticorps détectable. L'injection i.d. de la souche USUV Europe 3 a provoqué une grave maladie neurologique chez une seule souris (désorientation, œil gauche à moitié fermé, paralysie du corps postérieur). Chez cette souris aucune lésion importante cérébrale n'est apparue mais son cerveau présentait une mort neuronale étendue et de forts signaux de l'antigène USUV. Dans la moelle épinière des résultats similaires sont apparus mais avec moins de mort neuronale. Par ailleurs, la voie i.n. s'est avérée la plus efficace en terme d'induction de la réponse anticorps et de persistance virale dans le cerveau des souris infectées par les deux souches d'USUV, mais elle n'a pas permis de déclencher une maladie clinique dans ces conditions <sup>268</sup>. Ces résultats ne mettent pas en évidence comment l'USUV atteint le cerveau mais suggère de continuer ces recherches afin d'approfondir les connaissances sur la transmission directe de l'USUV et sur le processus spatio-temporel de la neuroinvasion et de la neurovirulence des souches d'USUV suivant les différentes voies d'accès.

## Objectifs et hypothèses de travail de la thèse

Les virus Zika (ZIKV) et Usutu (USUV) sont deux *flavivirus* émergents originaires d'Afrique qui circulent désormais en France, majoritairement dans les territoires d'outre-mer pour le ZIKV et en métropole pour l'USUV. L'infection de ces virus chez l'Homme, peut mener à plusieurs symptômes neurologiques dont l'encéphalite et la méningo-encéphalite ce qui suggère que ces virus peuvent atteindre le système nerveux central (SNC) mature. Plusieurs études réalisées *in vivo et in vitro* chez les souris et dans des lignées humaines cellulaires cérébrales transformées ou immortalisées mettent en évidence que ces deux virus infectent un large panel de cellules (comme les astrocytes, les neurones et les microglies) et altèrent l'homéostasie cellulaire. Une des questions clé, reste cependant de caractériser les mécanismes régissant l'accès au SNC.

Depuis 2017, pour le ZIKV, quelques études ont utilisé des cellules endothéliales humaines primaires (BEC) en monoculture ou des modèles de barrière hémato-encéphalique (BHE) dérivés de cellules souches pluripotentes induites afin d'étudier l'accès au SNC de ce virus. Néanmoins, l'utilisation de ces modèles cellulaires est limitée car ils ne récapitulent pas les caractéristiques propres de la BHE trouvées *in vivo*. En effet, les lignées cellulaires immortalisées sont évidemment loin de récapituler les phénotypes physiologiques de la BHE, en particulier parce qu'elles ne présentent pas une faible perméabilité aux petites molécules. Les BEC primaires humaines peuvent également perdre leurs caractéristiques à la suite de passages et la résistance électrique trans-endothéliale de ces modèles est généralement faible. De plus, peu d'études *in vivo* ont été effectuées. De ce fait, **le premier objectif** de ma thèse était de déterminer si l'infection par le ZIKV pouvait moduler l'homéostasie de la BHE et d'indiquer si les cellules qui la composent peuvent être, elles aussi, permissives au virus et potentiellement jouer un rôle dans la perturbation de l'homéostasie de la BHE. Pour étudier cela, nous nous sommes intéressés à deux lignées du ZIKV (une lignée africaine et une lignée asiatique) en utilisant un modèle plus complexe de BHE *in vitro* en co-culture avec des péricytes ou en tri-culture avec des péricytes et des astrocytes ainsi qu'un modèle murin. Sachant que dans la littérature il a été décrit que l'infection du ZIKV n'a potentiellement pas d'effets délétères majeurs sur l'endothélium

cérébral, nous avons émis l'hypothèse que cette infection peut néanmoins induire des changements dans la fonctionnalité de la BHE et perturber l'homéostasie du SNC.

Pour l'USUV, encore très peu de choses sont connues. La récente propagation de ce virus à un grand nombre de pays européens et chez l'Homme mérite une caractérisation du tropisme et de la virulence de ses différentes lignées circulantes. Ainsi, **le second objectif** de ma thèse était de caractériser la neuropathogénèse d'USUV, dans des modèles murins (souris *ifnar*<sup>-/-</sup> adulte et chez des souris swiss âgées d'une semaine) dans le but de déterminer le tropisme cellulaire et tissulaire du virus au sein des différents organes ainsi que de caractériser la réponse immunitaire, inflammatoire et antivirale dans les organes du SNC. Enfin, **le troisième objectif** de mon doctorat était de comparer *in vivo* et *in vitro* (dans différents modèles cellulaires de l'unité neurovasculaire), la virulence des six principales lignées circulantes en Europe d'USUV afin de déterminer leur potentiel neurotropique. Nous avons émis l'hypothèse que le tropisme cellulaire ainsi que la réponse immunitaire, inflammatoire et antivirale d'USUV pouvaient varier selon les lignées étudiées.

Globalement, ces projets ont permis de mieux caractériser le tropisme (notamment neuronal) de souches virales émergentes peu voire pas caractérisées.

## Chapitre II. Résultats – Articles de recherche

### **Article I:**

Zika virus infection promotes local inflammation, cell adhesion molecule upregulation, and leukocyte recruitment at the blood brain barrier (*Mbio – 2020*), *first author*.

### **Article II:**

Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models (*Plos neglected tropical diseases – 2020*), *first author*.

### **Article III:**

Differential neurovirulence of Usutu isolates in mice and neuronal cells (*under review, Journal of neuroinflammation – 2020*), *co-first author*.

## 1. Article I

### ***Zika virus infection promotes local inflammation, cell adhesion molecule upregulation, and leukocyte recruitment at the blood brain barrier***

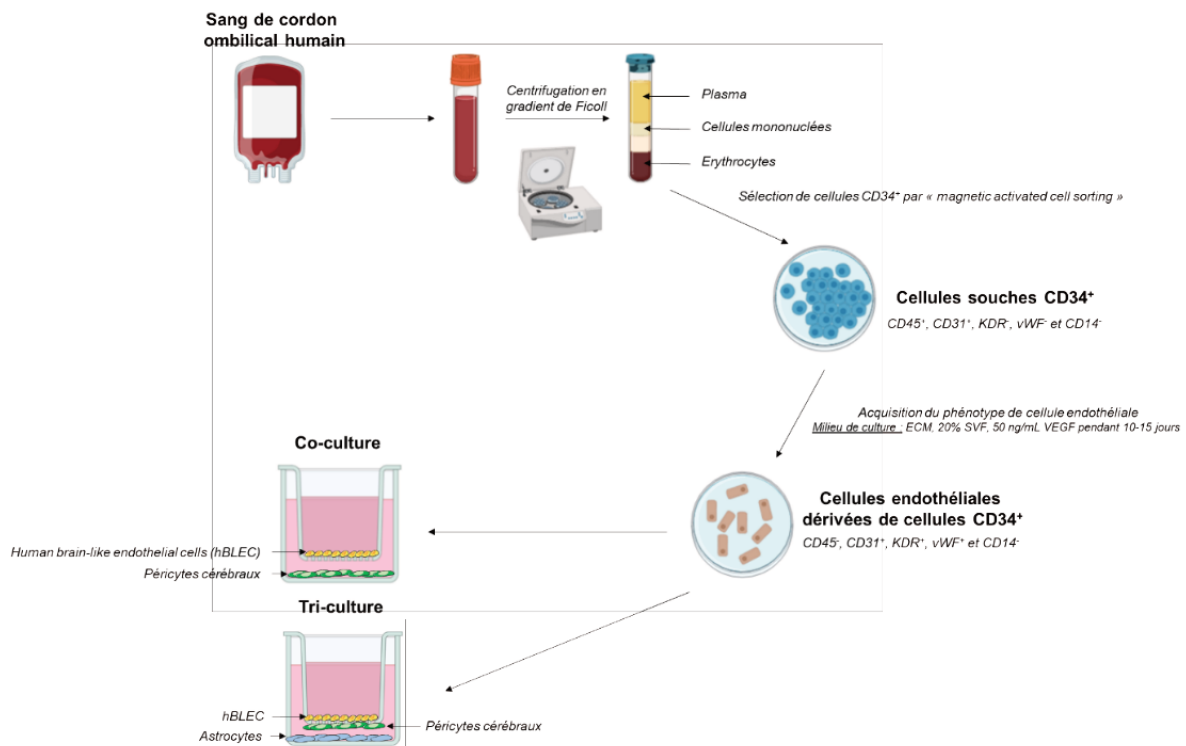
#### **a. But de l'étude**

L'infection du ZIKV chez l'adulte peut être associée dans certains cas à des troubles du SNC comme l'encéphalite et l'encéphalomyélite. La caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires régissant l'accès du ZIKV au SNC est donc particulièrement importante. Le but de cette étude était d'analyser l'impact de l'infection du ZIKV sur l'homéostasie de la BHE. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés aux cellules endothéliales cérébrales, ainsi qu'aux péricytes et aux astrocytes, cellules participant à la formation et au maintien de la BHE. Nous avons pour cela utilisé des approches *in vitro* et *in vivo* ainsi que du plasma de patients infectés par le ZIKV. Nous nous sommes notamment appuyés sur un modèle de BHE humaine obtenu à partir de cellules souches hématopoïétiques dérivées du sang de cordon ombilical<sup>556</sup> (**figure 40**). Les cellules endothéliales co-cultivées avec les péricytes ou cultivées avec les péricytes et les astrocytes ont des propriétés de BHE au niveau des gènes, des protéines et de la perméabilité et sont désormais appelées cellules endothéliales semblables au cerveau (*human brain-like endothelial cell*, hBLEC).

Nous avons observé que le ZIKV peut efficacement se répliquer dans les hBLEC et être libéré du côté apical (correspondant au côté sanguin) mais aussi du côté basolatéral (correspondant au côté cérébral) dans le modèle *in vitro* de BHE. Nous avons montré que les péricytes et les astrocytes peuvent, eux aussi, être infectés par le ZIKV et peuvent participer à libération des médiateurs inflammatoires. De plus, après l'infection du ZIKV, nous avons détecté une modulation de l'intégrité de la BHE, accompagnée de la libération de molécules inflammatoires et d'une up-régulation des molécules d'adhérence cellulaire (CAM). L'augmentation de l'expression des CAM favorise le recrutement des leucocytes dans le modèle *in vitro* de BHE infecté. Enfin, nous avons montré que les cerveaux de souris infectés par le ZIKV présentaient également une infection des cellules endothéliales cérébrales et une up-régulation des



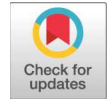
CAM. Les formes solubles de ces molécules ont, quant à elles, été trouvées augmentées dans le plasma des patients infectés par le ZIKV.



**Figure 40. Modèle de barrière hémato-encéphalique développé à partir de cellules souches hématopoïétiques issues de sang de cordon ombilical humain.**

Avec le consentement des parents, des donneurs et en accord avec la législation française, le sang de cordon ombilical est prélevé et centrifugé. Le « buffy coat » composé des cellules mononuclées est prélevé puis de nouveau centrifugé en gradient de Ficoll. Afin d'isoler les cellules souches hématopoïétiques par la technique de billes magnétiques, le marqueur membranaire CD34<sup>+</sup> est utilisé. Ces cellules expriment également les marqueurs CD45<sup>+</sup> et CD31<sup>+</sup> spécifiques respectivement des cellules hématopoïétiques et endothéliales. Les cellules CD34<sup>+</sup> purifiées sont ensuite cultivées une quinzaine de jours (ECM avec SVF 20% et VEGF 50ng/ml). À la fin de cette étape, le phénotype de cellules endothéliales est acquis et validé par l'expression du facteur von willebrandt (vWF) et du récepteur 2 du VEGF, le KDR (kinase insert domain receptor). Les cellules sont ensuite ensemencées en co-culture avec des péricytes cérébraux. Après 6 jours de co-culture les cellules endothéliales ont acquis les propriétés des cellules endothéliales cérébrales. Pour le modèle de tri-culture, les astrocytes sont mis en contact avec les cellules endothéliales et les péricytes après les 6 jours de co-culture.

Abréviations: ECM, Endothelial Cell Medium ; KDR, kinase insert domain receptor ; vWF, facteur von willebrandt. (*Adapté de: Modélisation in vitro de la barrière hématoencéphalique, Images Biorender*)



# Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier

Marion Clé,<sup>a</sup> Caroline Desmetz,<sup>b</sup> Jonathan Barthelemy,<sup>a</sup> Marie-France Martin,<sup>c</sup> Oriane Constant,<sup>a</sup> Ghizlane Maarifi,<sup>c</sup> Vincent Foulongne,<sup>a,d</sup> Karine Bolloré,<sup>a</sup> Yaël Glasson,<sup>e</sup> Frédéric De Bock,<sup>f</sup> Marine Blaquiére,<sup>f</sup> Lucie Dehouck,<sup>g</sup> Nelly Piro,<sup>e</sup> Edouard Tuailon,<sup>a,d</sup> Sébastien Nisole,<sup>c</sup> Fatiha Najioullah,<sup>h</sup> Philippe Van de Perre,<sup>a,d</sup> André Cabié,<sup>h</sup> Nicola Marchi,<sup>f</sup> Fabien Gosselet,<sup>g</sup> Yannick Simonin,<sup>a</sup> Sara Salinas<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Pathogenesis and Control of Chronic Infections, INSERM, Université de Montpellier, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France

<sup>b</sup>BioCommunication en CardioMétabolique, Université de Montpellier, Montpellier, France

<sup>c</sup>Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

<sup>d</sup>Pathogenesis and Control of Chronic Infections, INSERM, Université de Montpellier, Etablissement Français du Sang, CHU Montpellier, Montpellier, France

<sup>e</sup>Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier, BioCampus, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France

<sup>f</sup>Cerebrovascular Mechanisms of Brain Disorders, Institute of Functional Genomics, CNRS, INSERM, University of Montpellier, Montpellier, France

<sup>g</sup>Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique, Université d'Artois, Lens, France

<sup>h</sup>EA7524, Tropical and Infectious Disease Service, University of the Antilles, INSERM, Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Hôpital Pierre-Zobda-Quitman, Martinique, France

**ABSTRACT** The blood-brain barrier (BBB) largely prevents toxins and pathogens from accessing the brain. Some viruses have the ability to cross this barrier and replicate in the central nervous system (CNS). Zika virus (ZIKV) was responsible in 2015 to 2016 for a major epidemic in South America and was associated in some cases with neurological impairments. Here, we characterized some of the mechanisms behind its neuroinvasion using an innovative *in vitro* human BBB model. ZIKV efficiently replicated, was released on the BBB parenchyma side, and triggered subtle modulation of BBB integrity as well as an upregulation of inflammatory and cell adhesion molecules (CAMs), which in turn favored leukocyte recruitment. Finally, we showed that ZIKV-infected mouse models displayed similar CAM upregulation and that soluble CAMs were increased in plasma samples from ZIKV-infected patients. Our observations suggest a complex interplay between ZIKV and the BBB, which may trigger local inflammation, leukocyte recruitment, and possible cerebral vasculature impairment.

**IMPORTANCE** Zika virus (ZIKV) can be associated with neurological impairment in children and adults. To reach the central nervous system, viruses have to cross the blood-brain barrier (BBB), a multicellular system allowing a tight separation between the bloodstream and the brain. Here, we show that ZIKV infects cells of the BBB and triggers a subtle change in its permeability. Moreover, ZIKV infection leads to the production of inflammatory molecules known to modulate BBB integrity and participate in immune cell attraction. The virus also led to the upregulation of cellular adhesion molecules (CAMs), which in turn favored immune cell binding to the BBB and potentially increased infiltration into the brain. These results were also observed in a mouse model of ZIKV infection. Furthermore, plasma samples from ZIKV-infected patients displayed an increase in CAMs, suggesting that this mechanism could be involved in neuroinflammation triggered by ZIKV.

**KEYWORDS** Zika virus, blood-brain barrier, cell adhesion molecules, leukocyte recruitment

**Citation** Clé M, Desmetz C, Barthelemy J, Martin M-F, Constant O, Maarifi G, Foulongne V, Bolloré K, Glasson Y, De Bock F, Blaquiére M, Dehouck L, Piro N, Tuailon E, Nisole S, Najioullah F, Van de Perre P, Cabié A, Marchi N, Gosselet F, Simonin Y, Salinas S. 2020. Zika virus infection promotes local inflammation, cell adhesion molecule upregulation, and leukocyte recruitment at the blood-brain barrier. *mBio* 11:e01183-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01183-20>.

**Editor** Michael S. Diamond, Washington University School of Medicine

**Copyright** © 2020 Clé et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Sara Salinas, [sara.salinas@inserm.fr](mailto:sara.salinas@inserm.fr).

**Received** 8 May 2020

**Accepted** 25 June 2020

**Published** 4 August 2020

The central nervous system (CNS) is often considered an immune-privileged organ due to its separation from the bloodstream by various barriers, including the blood-brain barrier (BBB) and the blood-cerebral spinal fluid barrier (1). These barriers nonetheless allow selective passage of molecules and, especially, cells of the immune system (1, 2). The BBB represents a complex multicellular system that is tightly regulated: brain endothelial cells (BECs) form a tight endothelium, which is stabilized and dependent on the interaction with astrocytes, pericytes, and neurons, forming what is defined as the neurovascular unit (NVU) (2). Neurotropic viruses have been selected throughout evolution for their ability to access the CNS where, depending on their replication cycle and cellular effects, they cause a wide range of dysfunctions (3). Brain access can occur by different mechanisms, including axonal transport and direct or indirect passage through brain barriers (4, 5). Some viruses such as the human immunodeficiency virus (HIV) or West Nile virus (WNV) use the “Trojan horse” mechanism to cross the BBB: this occurs when infected cells of the immune system, with their natural ability to transcytose and reach the brain, allow viruses to penetrate the parenchyma (6, 7). Some viruses can also directly infect BECs or take advantage of the effect of inflammatory cytokines produced systematically upon infection that will transiently impair BBB impermeability and therefore facilitate viral entry to the CNS (4). Similarly, inflammatory chemokines may recruit immune cells, which, if infected, allow more virus to enter, as was proposed for HIV (8). Among neurotropic viruses, several arboviruses (arthropod-borne viruses, mostly responsible for acute infections leading to flu-like symptoms in the majority of symptomatic cases), can also access the CNS and cause a range of pathologies (9). For example, WNV, Japanese encephalitis virus (JEV), Usutu virus, and chikungunya virus are well described as determinants of neurological impairments in some patients, which can be in some cases fatal for the host (9). Recently, Zika virus (ZIKV) reemerged in the Pacific Islands and in South America, causing a major epidemic (10). ZIKV belongs to the *Flaviviridae* family and is a small single-stranded RNA enveloped virus isolated in 1947 in the Zika forest in Uganda (11). Two main lineages exist, namely, the original African and the more recent Asian ones. Interestingly, differences in virulence *in vitro* and in animal models have been reported for the two lineages, suggesting potential clinical difference in humans as well (12). ZIKV is transmitted mainly by the mosquito *Aedes aegypti*, but other less classical modes for an arbovirus have been described, including blood transfusion, sexual, and mother-to-child transmissions (13). Because of the extent of the American epidemic (more than one million patients were affected), severe forms of the disease were reported, including serious neurological complications such as Guillain-Barré syndrome (GBS) and congenital Zika syndrome (CZS) consisting of microcephaly and other neurodevelopmental defects (10, 13, 14). Regarding CZS, studies demonstrated that ZIKV can cross the blood-placental barrier and replicate in the placenta and in the developing embryo, including the brain, resulting in severe malformations at birth (15). In adults, several neurological symptoms have been described, including encephalitis and meningoencephalitis (16), suggesting that the virus can reach the mature CNS by crossing the BBB.

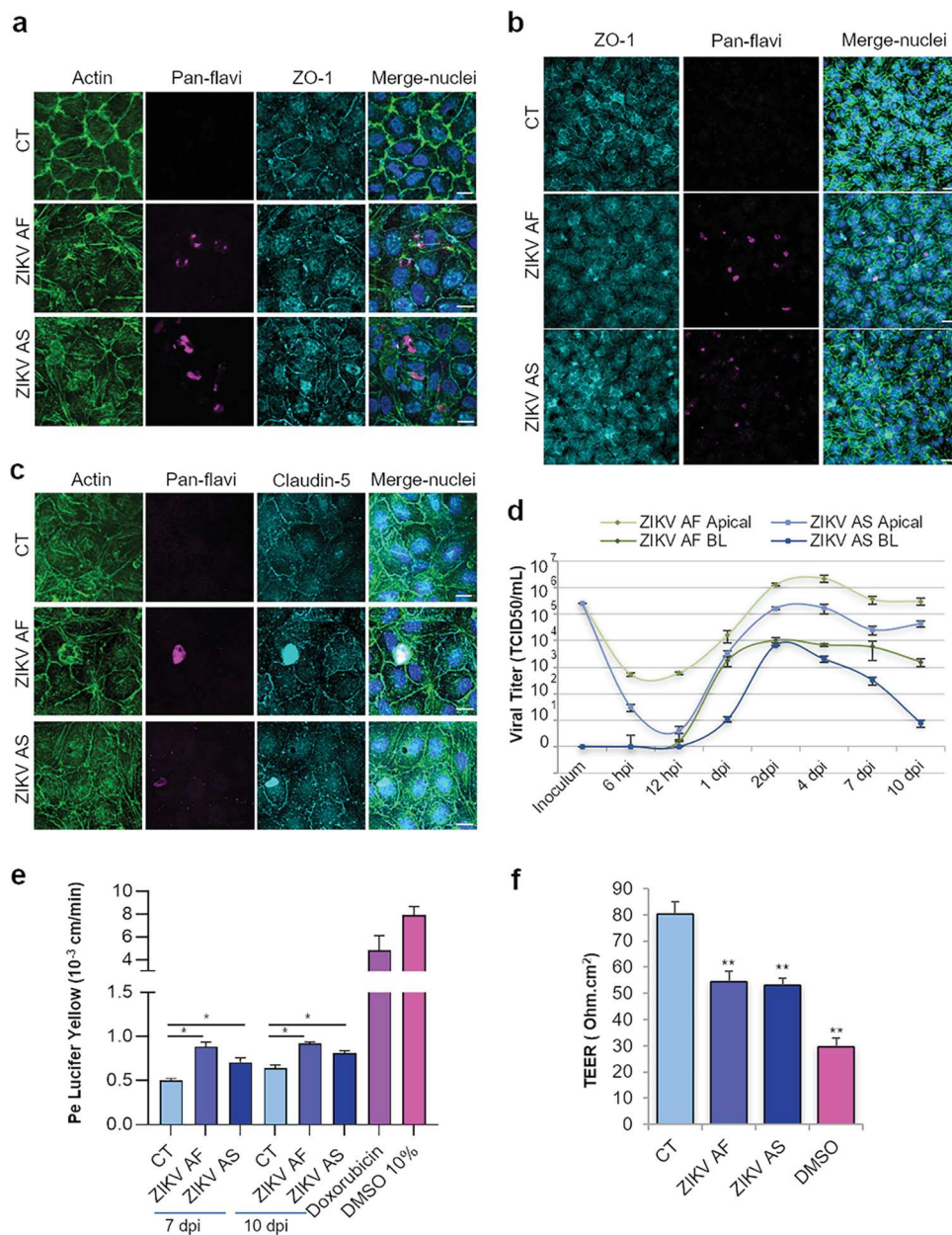
Several studies are starting to describe the ZIKV neurovirulence molecular and cellular mechanisms (10). One of the key issues remaining, however, is the characterization of the mechanisms governing ZIKV CNS access. Some flaviviruses such as WNV and JEV are known to interact with the BBB, although they use different mechanisms such as direct infection of the endothelial cells or the Trojan horse mechanism allowing transcytosis of infected immune cells (17). Interestingly, inflammatory mediators produced during infection will also have a direct effect on the BBB, either restraining (18) or facilitating CNS access (19). Regarding ZIKV, it was reported using primary human BECs or induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived BBB models that Asian ZIKV strains and the original, albeit controversial, MR766 African strain are able to directly infect BECs and replicate without disrupting the BBB integrity *in vitro* (20–23). Studies *in vivo* are inconsistent, since depending on strains and methods used, authors report no effect on the BBB integrity (21) or subtle effects that are strain dependent (23). Studies of BBB infection *in vitro* are particularly challenging, as many BBB models do not fully

describe the proper characteristics of the BBB found *in vivo* (24): immortalized cell lines are evidently far from displaying physiologically BBB phenotypes, in particular, because they fail to demonstrate low permeability to small molecules. Primary human BECs can lose their characteristics upon cell passages and display low transendothelial electrical resistance (24). Here, we used a multicellular *in vitro* human BBB model, based on the use of hematopoietic stem cells, which differentiate into brain-like endothelial cells (hBLECs), which display the main characteristics of the human BBB and are stable over an extended period of time, allowing study of long-term effects (25–28). We monitored the infection and effects of an African and an Asian strain of ZIKV on hBLECs and on pericytes, key components of the NVU that are emerging as potent mediators in neuroinflammation (29), as well as on astrocytes. We show that both ZIKV strains can readily infect and replicate in a polarized BBB, with partial effects on its integrity. Nonetheless, chemokines and inflammatory cytokines were produced and secreted both apically and basolaterally upon infection, together with an upregulation of adhesion molecules, which favors immune cell recruitment and docking to the BBB and may play a role in the neuroinflammatory mechanisms associated with this virus. Finally, similar observations were obtained in a mouse model of ZIKV infection as well in plasma samples from ZIKV-infected patients.

## RESULTS

**ZIKV replicates in hBLECs of an *in vitro* human BBB model and in brain pericytes with partial perturbation of endothelial permeability.** Viruses can cross the BBB using several pathways, including direct infection of brain microvascular endothelial cells, transcytosis, or the Trojan horse mechanism. To determine whether ZIKV can directly infect the BBB, we incubated a human *in vitro* BBB model that recapitulates the main characteristics of the barrier (25, 30, 31) with different multiplicities of infection (MOIs) of African (ZIKV AF) and Asian (ZIKV AS) strains of ZIKV (MOI, 0.1 and 1). Briefly, CD34<sup>+</sup> cord blood-derived hematopoietic stem cells were differentiated into endothelial cells and were subsequently seeded on culture inserts with brain bovine pericytes for 5 to 6 days to acquire BBB characteristics and become hBLECs before infections were performed (see Fig. S1a and b in the supplemental material). After initial infection, supernatants were collected and cells fixed at different days postinfection (dpi). Indirect immunofluorescence (IF) studies were then performed using a probe to label actin and an antibody against the junctional-associated protein zonula occludens (ZO)-1 to visualize endothelium architecture and an antibody (pan-flavivirus) to label viruses (Fig. 1a). While viral antigens were detected in cells at 6 dpi (MOI, 0.1), suggesting viral replication (Fig. 1a), global endothelium architecture did not appear massively perturbed, even at 10 dpi and a higher MOI (MOI, 1) (Fig. 1b and c), in contrast to what we previously showed in retinal pigment epithelium, which was very sensitive to ZIKV infection (32). Indeed, the localization of tight junction (TJ) proteins ZO-1 and claudin-5 did not appear strongly affected (Fig. 1b and c). However, the actin cytoskeleton showed rearrangement upon infection, and ZIKV-infected cells appeared to be higher, albeit not detached, in the endothelium as confocal imaging and three-dimensional (3D) reconstruction using imaging software showed, suggesting that some changes in the endothelium morphology may occur (Fig. S1c and d).

To have a quantitative approach to monitor viral replication, we measured viral titers in supernatants from ZIKV-infected BBB apical and basolateral sides at various time points using the 50% tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>) method (Fig. 1d and Fig. S2a). ZIKV AF and ZIKV AS were both efficiently replicating at MOIs of 0.1 and 1 and released from the apical side, which would correspond to the blood vessel luminal side, and from the basolateral side, which would correspond to the parenchymal side (Fig. 1d, MOI, 1; and Fig. S2a, MOI, 0.1). Viral production appeared to decrease slightly over time, but viral replication still occurred at 10 dpi (Fig. 1d). Viral RNA was detected by IF using a specific antibody against double-stranded (ds)-RNA and by a quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) approach (Fig. S2b and c), confirming active viral replication until at least 10 dpi. We then characterized whether the endothelium



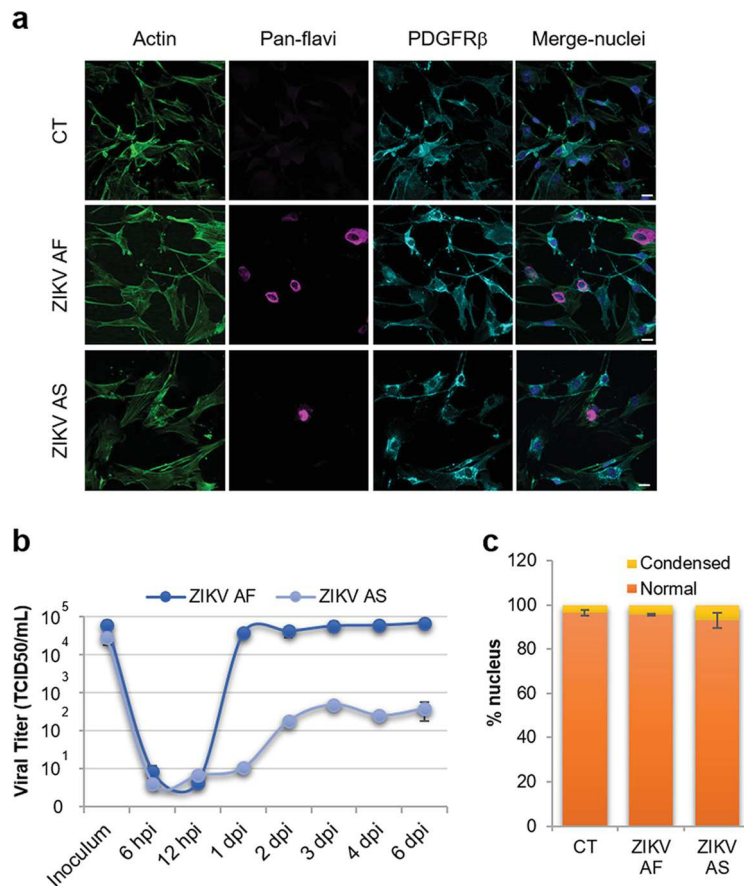
**FIG 1** *In vitro* human BBB is permissive to ZIKV infection and replication without strong deleterious effects on its integrity. (a) CT-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected (MOI, 0.1) hBLECs of BBB model grown on cell culture inserts fixed at 6 dpi. Indirect IF confocal studies of CT- and ZIKV-infected hBLECs using an actin probe (green) and antibodies against ZIKV (pan-flavivirus, magenta) and ZO-1 (cyan). Nuclei are labeled with Hoechst (blue). Bars, 15  $\mu$ m. (b) CT-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model grown on cell culture inserts were fixed at 10 dpi. Indirect IF confocal studies show actin (green), ZIKV (magenta), ZO-1 (cyan), and nuclei (blue). ZO-1 labeling highlights cell-cell adhesion, characteristic of polarized endothelia. Bars, 30  $\mu$ m. (c) Indirect IF studies of BBB model at 7 dpi (MOI, 1) showing actin (green), ZIKV (magenta), claudin-5 (cyan), and nuclei (blue). Bars, 15  $\mu$ m. (d) Viral titers in supernatants from ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model in apical and basolateral (BL) sides at various time points postinfection determined using the TCID<sub>50</sub> method. Results are expressed as means  $\pm$  standard errors of the means (SEMs) from 3 independent experiments. (e) Paracellular permeability of CT-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model grown on cell culture inserts at 7 and 10 dpi. Doxorubicin and DMSO are two positive controls. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*,  $P < 0.05$  (ZIKV AF/AS compared to CT). (f) Transendothelial electrical resistance (TEER) of CT-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB grown on cell culture inserts was measured at 10 dpi. DMSO is a positive control. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*\*,  $P < 0.01$  (compared to CT).

integrity and impermeability were perturbed upon ZIKV hBLEC infection. We used a fluorescence-based assay with Lucifer yellow (LY) to measure the endothelial permeability coefficient, and we measured the transendothelial electrical resistance (TEER) (25). The permeabilities of mock- and ZIKV-infected endothelia at MOIs of 0.1 and 1 were measured at 7 and 10 dpi. Mock-infected (control [CT]) endothelium displayed a permeability coefficient (Pe) of  $\sim 0.5 \times 10^{-3}$  cm/min, consistent with “tight” BBB endothelia (Fig. 1e). Interestingly, albeit important and efficient viral replication was occurring in ZIKV-infected cells, Pe was increased but still consistent with a tight BBB, suggesting that infection by the two strains of ZIKV did not massively impair BBB integrity but may trigger a subtle effect on the barrier integrity (Fig. 1e). Treatment of cells with doxorubicin, known to destabilize the endothelium, gave a Pe of  $4.8 \times 10^{-3}$  cm/min, while 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) treatment led to a Pe of  $7.83 \times 10^{-3}$  cm/min (Fig. 1e). TEER measurement at 10 dpi showed also a decrease in endothelium impermeability in ZIKV-infected BBB, consistent with the LY data (Fig. 1f). However, BBB permeability was not perturbed at a lower MOI (0.1) (Fig. S2d and e). Notably, basolaterally released ZIKV was much lower (ZIKV AF) or absent (ZIKV AS) at an MOI of 0.1 (Fig. S2a) and could potentially (and partially) explain why permeability was not perturbed.

Because this BBB model consists of coculture of hBLECs and brain bovine pericytes in the basolateral compartment, we also tested for replicating viruses in pericytes using RT-qPCR and specific primers for ZIKV. We therefore collected mRNA from pericytes in coculture with mock and infected hBLECs at 7 dpi and performed RT-qPCR. Interestingly, we detected active replication (Fig. S2c). Because pericytes are starting to gain attention as potential immunomodulators, we then asked whether human pericytes were potential targets during ZIKV CNS infection. Primary human pericytes were infected with ZIKV AF and ZIKV AS at an MOI of 1, and supernatants were harvested at different days postinfection to monitor infectious particle release and fixed at 4 dpi for IF studies. Figure 2a shows ZIKV replication in pericytes as anti-pan-flavivirus antibody labeled some platelet-derived growth factor receptor-positive (PDGFR<sup>+</sup>) cells. Moreover, viral replication quantification with the TCID<sub>50</sub> method showed that both strains replicated, albeit with different efficiencies (Fig. 2b). It is worthy to note that ZIKV AS poorly replicated, as the titer never exceeded  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml at the various days postinfection tested (Fig. 2b). However, ZIKV AF displayed efficient replication with a titer around  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml (Fig. 2b). This viral replication was not associated with cell death/toxicity, as quantification of apoptotic nuclei did not show significant differences in ZIKV-infected pericytes compared to that of mock-infected cells (Fig. 2c). This suggests that the lower replication rate of ZIKV AS in pericytes was not related to cell death.

Together, this set of data suggests that ZIKV directly and efficiently infects the BBB from the apical side and is released from both sides of the endothelium (i.e., can access the parenchyma). Moreover, this release can lead to pericyte infection and to partial perturbation of the BBB integrity.

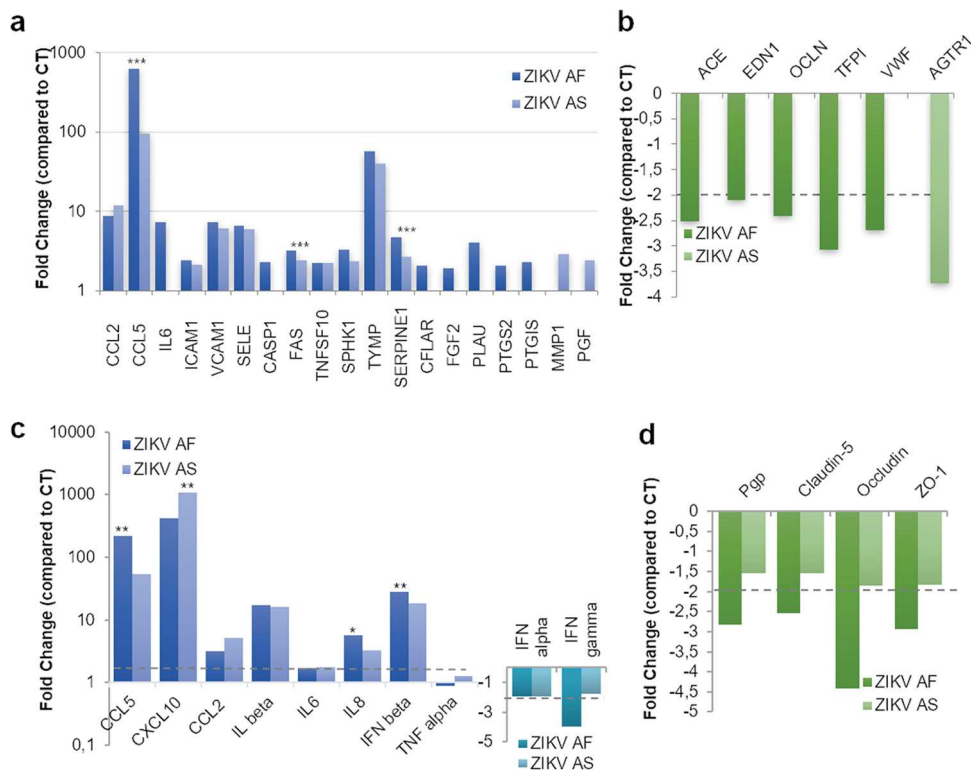
**ZIKV-infected hBLECs and pericytes upregulate inflammatory cytokines and chemokines.** Because ZIKV readily replicated in our *in vitro* BBB model without strong perturbation of the barrier integrity, we next aimed to monitor whether genes involved in general endothelial homeostasis were modulated upon infection. We first investigated by RT-qPCR the expression of 84 genes involved in endothelial cell biology, including genes regulating cell adhesion, inflammation, injury repair, and angiogenesis (see Materials and Methods). mRNAs from mock-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected endothelial cells (MOI, 1) were collected at 7 dpi. RT-qPCR analyses then showed the modulation ( $\geq$  or  $\leq 2$ -fold,  $P$  value  $\leq 0.05$  compared to CT) (Fig. S3) of several genes in infected cells compared to that under mock-treated conditions (Fig. 3). Twenty-two genes in total were modulated in ZIKV AF-infected cells (17 upregulated, 5 downregulated), whereas ZIKV AS led to the change of expression in 13 genes (12 upregulated, 1 downregulated) (Fig. 3a and b and Fig. S3b). It is interesting to note that although the endothelium integrity was only slightly perturbed, genes of inflammatory mediators



**FIG 2** Human pericytes are cellular targets for ZIKV infection. (a) Mock- (CT), ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected (MOI, 1) human pericytes were fixed at 4 dpi and labeled with an actin probe (green), pan-flavivirus (magenta), and PDGFR $\beta$  (cyan) by indirect IF. Nuclei are labeled with Hoechst (in blue). Bars, 20  $\mu$ m. (b) Viral titers from ZIKV AF- and ZIKV AS-infected pericytes determined by TCID<sub>50</sub> methods at various time points postinfection. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. (c) Quantification of apoptotic nuclei in CT-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected pericytes at 4 dpi. Apoptotic nuclei are represented in yellow and normal nuclei in orange. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs ( $\geq 110$  cells,  $n = 3$ ).

such as *CCL2*, *CCL5*, and *IL6* were upregulated by either both strains (*CCL2* and *CCL5*) or only ZIKV AF (*IL6*) (Fig. 3a). Interestingly *VCAM1* and *ICAM1*, encoding two cell adhesion molecules (CAMs) involved in leukocyte docking to the BBB, were also upregulated upon ZIKV infection (Fig. 3a). Other genes encoding proteins involved in adhesion were either upregulated (*SELE*) or downregulated (*VWF*) (Fig. 3a and b). The gene encoding a matrix metalloprotease (*MMP1*) as well as genes involved in the control of apoptosis, such as *FAS*, *CASP1*, or *TNFSF10* (*TRAIL*) were also upregulated, whereas *OCLN*, encoding occludin, a key protein regulating tight junctions, was downregulated by ZIKV AF (Fig. 3a and b). Of note, ZIKV AS led to the downregulation of the angiotensin receptor II gene (*ATGR*), which may play a role in angiogenesis. We then confirmed some of these modulated genes, as well as *CXCL10*, which we found strongly modulated by ZIKV in other cell types (32, 33), by targeted RT-qPCR analyses and found similar modulation (Fig. 3c and d; Fig. S3d). Moreover, we analyzed other genes involved in inflammatory responses (*IL1B*, *IL8*, *TNFA*, *IFNB*, *IFNA*, and *IFNG*) and BBB physiology and found that *IL1B*, *IL8*, and *IFNB* were found upregulated upon infection, whereas *IFNG*, *Pgp*, and genes encoding junctional-associated proteins occludin, claudin 5, and ZO-1 were downregulated in ZIKV AF-infected hBLECs, consistent with the subtle effects on endothelium permeability that we observed (Fig. 3c and d; Fig. S3d).

Because genes involved in inflammation were modulated, we then monitored the secretion of key cytokines and chemokines, known to modulate antiviral response and

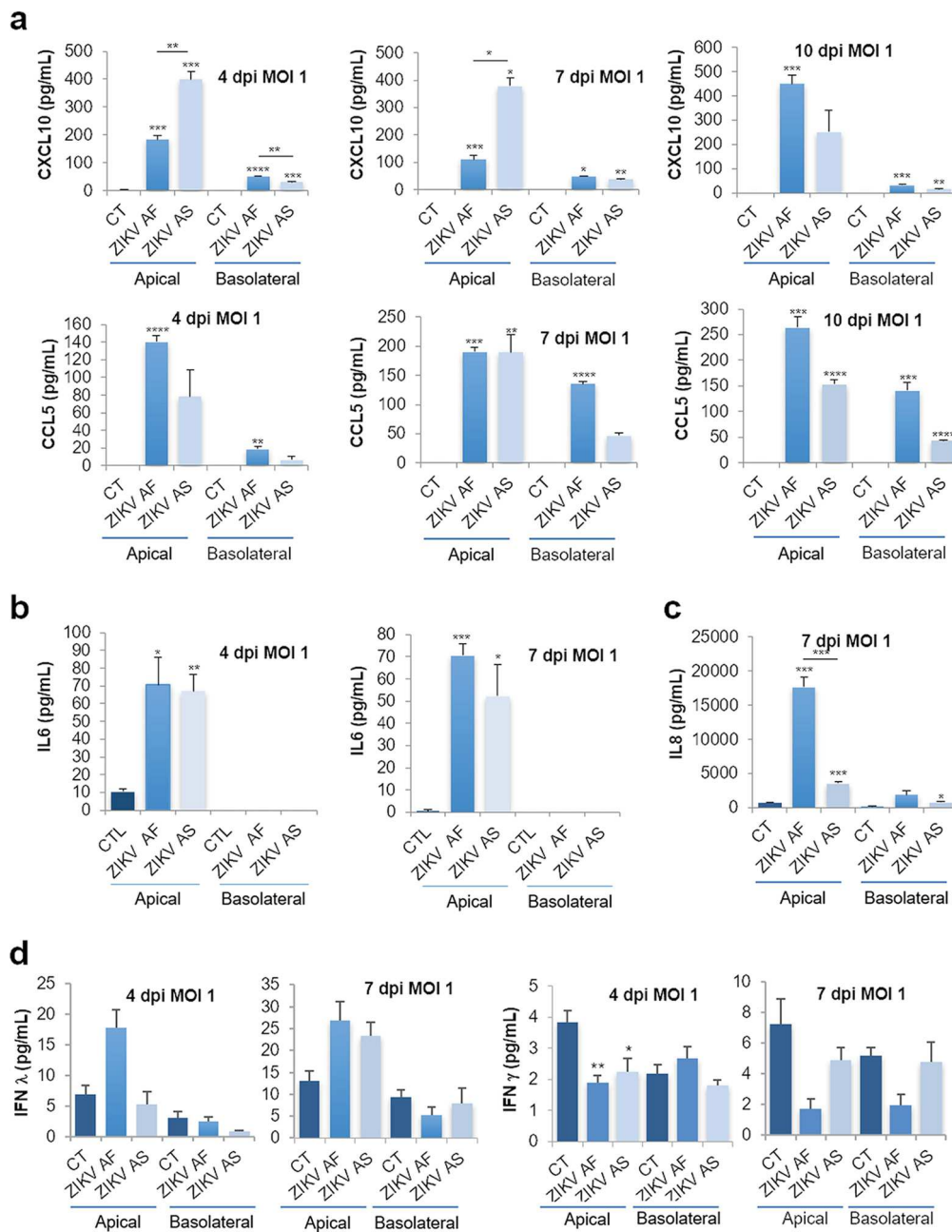


**FIG 3** ZIKV infection modulates gene expression in human BBB cells. mRNA from hBLECs from CT-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model grown on cell culture inserts collected at 7 dpi and subjected to RT-qPCR array analysis. Fold regulation of statistically significant genes upregulated (a) or downregulated (b) in ZIKV AF- and ZIKV AS-infected hBLECs compared to that in CT. Results are expressed as means of the fold change ( $n = 3$ ) (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant from CT) (see Fig. S3c in the supplemental material). Differences between lineages were observed (ratio gene/housekeeping gene ZIKV AF versus ZIKV AS, unpaired  $t$  test). \*\*\*,  $P < 0.001$ . (c) Gene expression of inflammatory response in hBLECs infected by ZIKV AF and ZIKV AS were measured by RT-qPCR. Results are expressed as means of the fold change ( $n = 3$ ) using *HPRT1* as the housekeeping gene (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant [ $P < 0.05$ ] from CT) (see Fig. S3d). Differences between lineages were observed (ratio gene/housekeeping gene ZIKV AF versus ZIKV AS, unpaired  $t$  test). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . (d) Gene expression of tight junction proteins in hBLECs infected by ZIKV AF and ZIKV AS were measured by RT-qPCR. Results are expressed as means of the fold change ( $n = 3$ ) using *HPRT1* as a housekeeping gene (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant [ $P < 0.05$ ] from CT) (see Fig. S3d).

immune cell activation/recruitment. Using different approaches, we measured the concentrations in apical and basolateral compartments of CXCL10, interleukin 6 (IL-6), CCL5, CCL2, IL-8, and interferon (IFN)- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , and - $\lambda$ . At both MOIs (Fig. 4 and Fig. S4), the expression and secretion of some cytokines and chemokines appeared to be increased in ZIKV-infected hBLECs, in the apical and sometimes basolateral compartments. Figure 4 shows that both strains led to increased expression/secretion of CXCL10, IL-6, and CCL5. Interestingly, as we and others showed that ZIKV AF strains were in most of the case more virulent than Asian strains of ZIKV in various cellular systems and *in vivo* (12), some cytokines and chemokines were found differentially modulated by the two strains, in particular, CXCL10 and IL-8 (Fig. 4a and c). To measure IFN production, we use a multiplex assay aimed to analyze IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , and - $\lambda$  concentrations in both compartments. Unfortunately, with this assay, we only detected IFN- $\gamma$  and - $\lambda$  and showed that, similarly to what we observed in RT-qPCR analyses, IFN- $\gamma$  was downregulated (Fig. 4d). IFN- $\lambda$  however, seemed to be slightly upregulated by both strains, albeit not significantly (Fig. 4d).

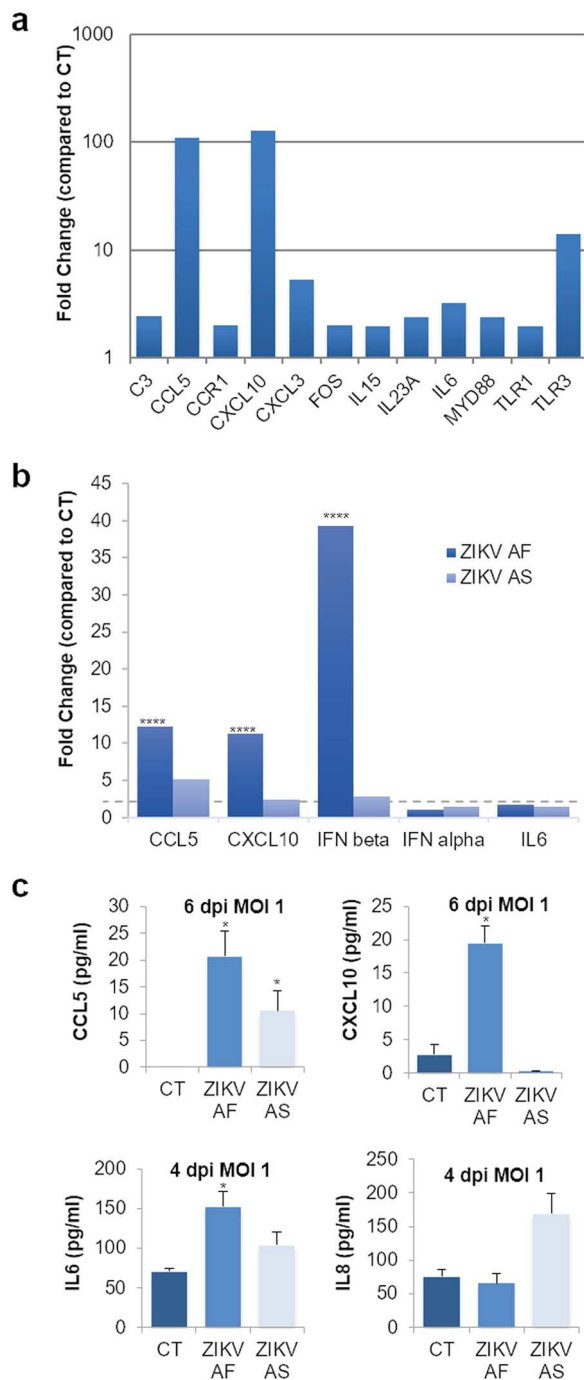
We then monitored the modulation of genes involved in inflammation and immunity in ZIKV-infected human pericytes. We performed RT-qPCR analyses on a panel of 84 genes involved in pathways regulating inflammatory responses (see Materials and Methods) or for targeted genes in mock-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected brain pericytes





**FIG 4** Increased expression of cytokines and chemokines in ZIKV-infected human BBB. (a) ELISA analyses of CXCL10 and CCL5 concentrations in the supernatants (apical and basolateral compartments) of CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model grown on cell culture inserts at 4, 7, and 10 dpi. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using an unpaired  $t$  test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  compared to CT. (b) ELISA analyses of IL-6 concentration in the supernatants (apical and basolateral compartments) of CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model grown on cell culture inserts at 4 and 7 dpi. Results are represented as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using an unpaired  $t$  test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  compared to CT. (c) Multiplex analyses of IL-8 concentration in the supernatants (apical and basolateral compartments) of CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model grown on cell culture inserts at 7 dpi. Results are represented as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using an unpaired  $t$  test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  compared to CT. (d) Multiplex analyses of IFN- $\gamma$  and - $\lambda$  concentrations in the supernatants (apical and basolateral compartments) of CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model grown on cell culture inserts at 4 and 7 dpi. Results are represented as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) analyzed using an unpaired  $t$  test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  compared to CT.

at an MOI of 1 and collected the mRNA at 3 and 6 dpi. Figure 5A shows gene modulation ( $\leq 2$ -fold,  $P$  value  $\leq 0.05$  compared to CT) (Fig. S5a) by ZIKV AF at an early time of infection (3 dpi). Similarly to that in hBLECs, the chemokines CCL5 and CXCL10 were upregulated by ZIKV (Fig. 5a). As described in many other cell types during the



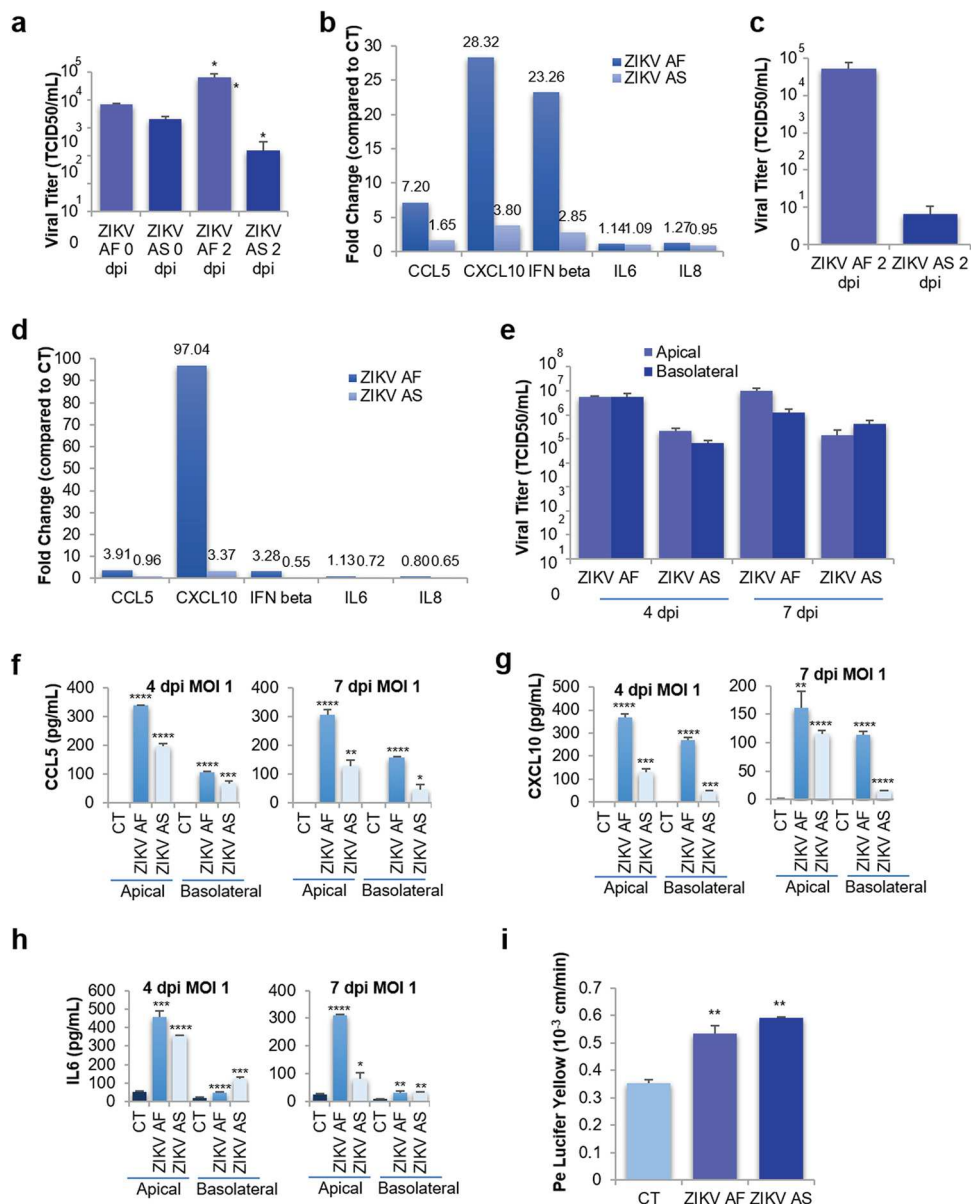
**FIG 5** ZIKV-infected pericytes express inflammatory cytokines and chemokines. mRNAs from mock- and ZIKV-infected pericytes (MOI, 1) at 3 dpi were collected and subjected to RT-qPCR analyses using a PCR array of 84 genes implicated in innate and adaptive immunity (see Materials and Methods). (a) Fold regulation of statistically significant genes modulated upon ZIKV AF infection are shown. Only genes where the ratio gene/housekeeping gene were statistically significant (unpaired *t* test  $P < 0.05$ , ZIKV AF compared to CT) (see Fig. S5a) from CT are shown. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). (b) Gene expression of inflammatory response in ZIKV AF and ZIKV AS-infected pericytes (MOI 1) by RT-qPCR at 6 dpi. Results are expressed as mean of the fold change ( $n = 3$ ) using *HPRT1* as housekeeping gene (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant ( $P < 0.05$ ) from CT (see Fig. S5b)). Differences between lineages were observed (ratio gene/housekeeping gene ZIKV AF versus ZIKV AS, unpaired *t* test) \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ . (c) ELISA and multiplex analyses of CXCL10, CCL5, IL-6, and IL-8 concentrations in the supernatants of CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) primary human pericytes at 4 and 6 dpi. Results are represented as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using an unpaired *t* test. \*,  $P < 0.05$  compared to CT.

course of ZIKV infection, Toll-like receptor 3 (TLR3) gene transcription was also increased in ZIKV-infected pericytes along with genes for the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-15 (Fig. 5a). We next analyzed by single-gene assay ZIKV AF- and ZIKV AS-infected pericytes at 6 dpi. Both *CCL5* and *CXCL10* were upregulated by the two strains, as well as *IFNB* (Fig. 5b). *IL6* modulation was just under the 2-fold threshold compared to that for the CT but was significantly upregulated (Fig. 5b; Fig. S5b). Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) on mock- and ZIKV-infected supernatants collected at 4 and 6 dpi showed increases in the expression levels of *CCL5* (both strains), *CXCL10*, and IL-6 (ZIKV AF), as well as potentially IL-8 (ZIKV AS, nonsignificantly, however) (Fig. 5c).

Altogether, this set of data showed that some of the BBB proteins are modulated by ZIKV infection in hBLECs and pericytes, even though the BBB integrity is not strongly perturbed. Proteins involved in inflammatory responses and chemoattraction as well as tight junction (TJ) proteins and adhesion molecules are affected upon infection and may trigger the recruitment of cells of the immune system and promote local inflammation.

**Astrocytes may potentiate local ZIKV BBB replication and inflammatory response.** As astrocytes are known to be targeted during ZIKV brain infection, as we and others demonstrated (33, 34), and because astrocytes are involved in the maintenance of BBB integrity (2), we then asked whether ZIKV BBB infection could be affected by this cell type. To monitor whether basolaterally released ZIKV and inflammatory molecules that we found to be modulated (Fig. 4) could affect human primary astrocytes, we incubated cells with basolateral supernatants from ZIKV-infected BBB (hBLECs plus pericytes) at 4 dpi for 2 days (final MOIs: ZIKV AF, 0.059; ZIKV AS, 0.007). We first measured whether further replication occurred and showed that ZIKV AF indeed replicated, as the initial titer increased (Fig. 6a). However, ZIKV AS did not lead to important replication in these time windows (Fig. 6a). mRNAs were extracted and RT-qPCRs on selected inflammatory genes were performed. Figure 6b shows that *CCL5*, *CXCL10*, and *IFNB* were modulated by both strains, albeit with significant differences between ZIKV AF and ZIKV AS (Fig. 6b and Fig. S5c). Because this genetic modulation of inflammatory molecules could be the result of ZIKV astrocyte infection and/or the effect of already present cytokines and chemokines in the basolateral compartment, we then directly infected human astrocytes with the same MOI in the basolateral compartments and measured viral titer and increase in inflammatory molecules at 2 dpi. Viral titers showed efficient replication of ZIKV AF, in a similar range as observed with incubation of the basolateral compartment, but poor replication of ZIKV AS (Fig. 6c). Regarding the modulation of inflammatory cytokines, only *CXCL10* was found to be more modulated by direct infection than by incubation with basolateral supernatants (Fig. 6d and Fig. S5d), suggesting that the combination of viral particles and cytokines and chemokines released by the basolateral side of hBLECs can potentiate the inflammatory responses in astrocytes.

Finally, we performed ZIKV infection of a triple-culture BBB model, where pericytes are cultured at the bottom of the transwell filter, coculture with hBLECs is allowed for 7 days prior to infection (MOI, 1), and human primary astrocytes are added to the wells (35) (Fig. S5e). Four and 7 dpi, we measured viral replication in apical and basolateral supernatants. Apical viral titers were in the same range as was observed in the coculture model (Fig. 6e and Fig. 1d), whereas basolateral titers were significantly higher (1 to 2 log), possibly due to active replication in astrocytes (Fig. 6e and Fig. 1d). ELISA analyses performed in apical and basolateral compartments showed increased expression of *CXCL10*, *CCL5*, and IL-6 (Fig. 6f to h). Notably, basolateral levels of these cytokines were higher and found earlier than in the coculture system (Fig. 4). However, BBB permeability measurements showed similar modulation by ZIKV infection as was found in coculture (Fig. 6i and Fig. 1e), suggesting that ZIKV infection/modulation of astrocytes, albeit increasing the inflammatory environment, did not further perturb BBB integrity in this model.



**FIG 6** ZIKV triggers inflammatory responses in human astrocytes. (a) Basolateral supernatants from ZIKV AF- and ZIKV AS-infected BBB (hBLECs plus pericytes) at 4 dpi were incubated with astrocytes for 2 days. Viral titers from ZIKV AF- and ZIKV AS-infected astrocytes were determined by TCID<sub>50</sub> at various times postinfection. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*,  $P < 0.05$  (ZIKV AF versus AS). (b) Gene expression of inflammatory response in astrocytes infected by basolateral supernatants from ZIKV AF- and ZIKV AS-infected BBB (hBLECs plus pericytes) were measured by qRT-PCR. Results are expressed as means of the fold change ( $n = 3$ ) using *HPRT1* as a housekeeping gene (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant [ $P < 0.05$ ] from CT) (see Fig. S5c). Differences between lineages were observed (ratio gene/housekeeping gene ZIKV AF versus ZIKV AS, unpaired  $t$  test). (c) Viral titers from ZIKV AF- and ZIKV AS-infected astrocytes were determined by TCID<sub>50</sub> at 2 dpi. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. (d) Gene expression of inflammatory response in ZIKV AF- and ZIKV AS-infected astrocytes was measured by qRT-PCR. Results are expressed as means of the fold change ( $n = 3$ ) using *HPRT1* as a housekeeping gene (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant [ $P < 0.05$ ] from CT) (see Fig. S5d). Differences between lineages were observed (ratio gene/housekeeping gene ZIKV AF versus ZIKV AS, unpaired  $t$  test). (e) Viral titers in supernatants from ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model (hBLECs/pericytes/astrocytes) in apical and basolateral sides at 4 and 7 dpi determined using the TCID<sub>50</sub> method. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs from 3 independent experiments. ELISA analyses of CCL5 (f), CXCL10 (g), and IL-6 (h) concentrations in the supernatants (apical and basolateral compartments) of CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model grown (hBLECs/pericytes/astrocytes) on cell culture inserts at 4 and 7 dpi. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using a nonparametric  $t$  test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  compared to CT. (i) Paracellular permeability of CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model (hBLECs/pericytes/astrocytes) grown on cell culture inserts at 7 dpi. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*\*,  $P < 0.01$  (ZIKV AF/AS compared to CT).

Together, these data suggest that ZIKV released from hBLECs leads to efficient infection of astrocytes and potentiates the inflammatory environment.

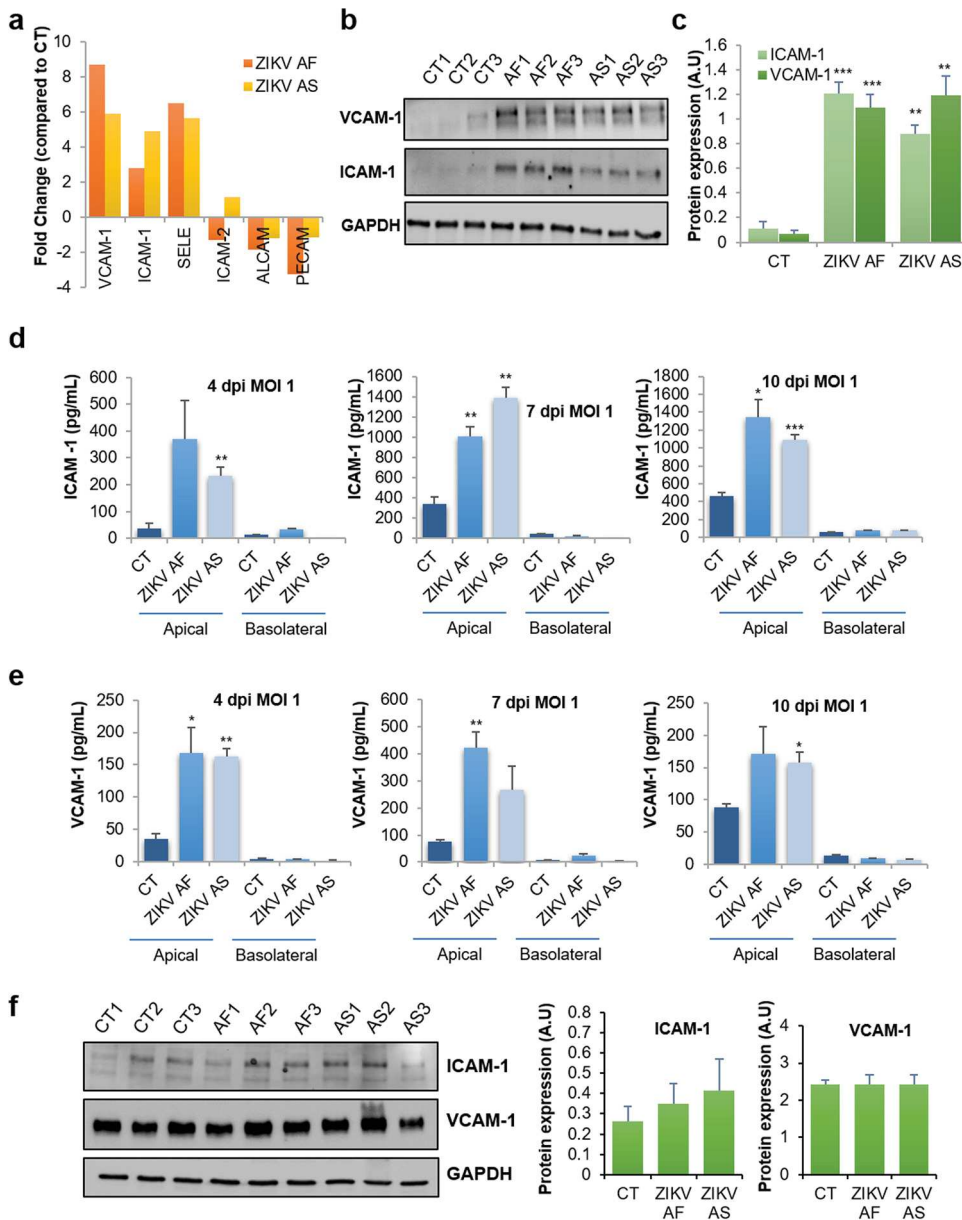
#### **ZIKV modulates CAM expression and favors leukocyte recruitment to the BBB.**

Because we detected the upregulation of some CAMs in our RT-qPCR array that are classically involved in leukocyte binding to the BBB endothelial cells, such as ICAM-1, SELE, and VCAM-1 (36), we then aimed to confirm these observations in single-gene assays. RT-qPCR analyses using single sets of primers showed the genetic modulation of *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, and genes encoding other CAMs known to be expressed on the BBB. We observed that ZIKV infection led to selective upregulation of CAMs (*VCAM1*, *ICAM1*, and *SELE*) whereas *PECAM* was downregulated upon ZIKV AF infection (Fig. 7a) ( $\leq 2$ -fold,  $P$  value  $\leq 0.05$  compared to CT) (Fig. S3d), confirming the data obtained previously with the array (Fig. 3a). We then monitored VCAM-1 and ICAM-1 expression by immunoblotting under similar conditions and found strong upregulation by the two strains (Fig. 7b and c). Because the extracellular domains of CAMs can be released from cells and act as soluble factors, we measured soluble CAM (sCAM) concentrations in the apical and basolateral compartments of mock- and ZIKV-infected hBLECs at various days postinfection. Figure 7d and e show that both soluble ICAM-1 and VCAM-1 are released by infected hBLECs from 4 to 10 dpi. Interestingly, the modulation of CAMs seemed to be specific for hBLECs, as ZIKV-infected pericytes did not show an increase of total or secreted levels of these proteins (Fig. 7f).

We next monitored whether leukocyte recruitment (binding) was affected in ZIKV-infected hBLECs. According to previously published studies (26, 28, 31), we incubated ZIKV-infected BBB at 7 dpi with  $10^4$  monocytes or CD4<sup>+</sup> T cells (LyT) for 30 min and gently washed and fixed them for IF studies. Prior labeling of leukocytes with carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE) allowed us to visualize monocyte and LyT binding at low (20 $\times$ ) (see Fig. S6a and b) or high (63 $\times$ ) (Fig. 8a and c) magnification. No gross effect on monocyte morphology was observed upon binding to the ZIKV-infected BBB (Fig. 8a). However, quantification of random fields at  $\times 20$  magnification showed that ZIKV infection led to significantly more monocyte recruitment (Fig. 8b). When bound LyT were observed, however, striking cellular morphological changes were detected by IF studies and software 3D rendering. Whereas LyT bound to the CT BBB were mostly round, LyT attached to ZIKV-infected hBLECs appeared flatter and to spread more (Fig. 8c and d). Quantification of this “spread” phenotype showed a significant increase under ZIKV infection conditions (Fig. 7e). To have a more quantifiable parameter, cell diameter/length was measured: LyT in contact with ZIKV-infected hBLECs showed increased length (Fig. 8f). We then monitored CAM localization during leukocyte binding: we detected by IF strong labeling of ICAM-1 in the ZIKV-infected BBB, especially in ZIKV-infected cells and in close proximity of monocytes, confirming both RT-qPCR and immunoblot studies (Fig. S6c). Similarly for monocytes, strong ICAM-1 labeling was detected in close proximity to LyT, possibly reflecting CAM recruitment at contact sites (Fig. S6d). To correlate more conclusively CAM upregulation by ZIKV infection to leukocyte recruitment, we then performed a blocking experiment using a cocktail of anti-ICAM-1, -VCAM-1, and E-selectin blocking antibodies as previously described (37). Antibodies were added 1 h prior to incubation with LyT in CT- and ZIKV-infected (MOI, 1) BBB models at 7 dpi. After LyT incubation for 30 min, filters were fixed and processed for IF and confocal analyses. Figure 8g and h show that in the presence of blocking antibodies, both the number of cells (Fig. 8g) and the cell diameter (Fig. 8h) were efficiently decreased, confirming the involvement of these CAMs in LyT recruitment at the BBB.

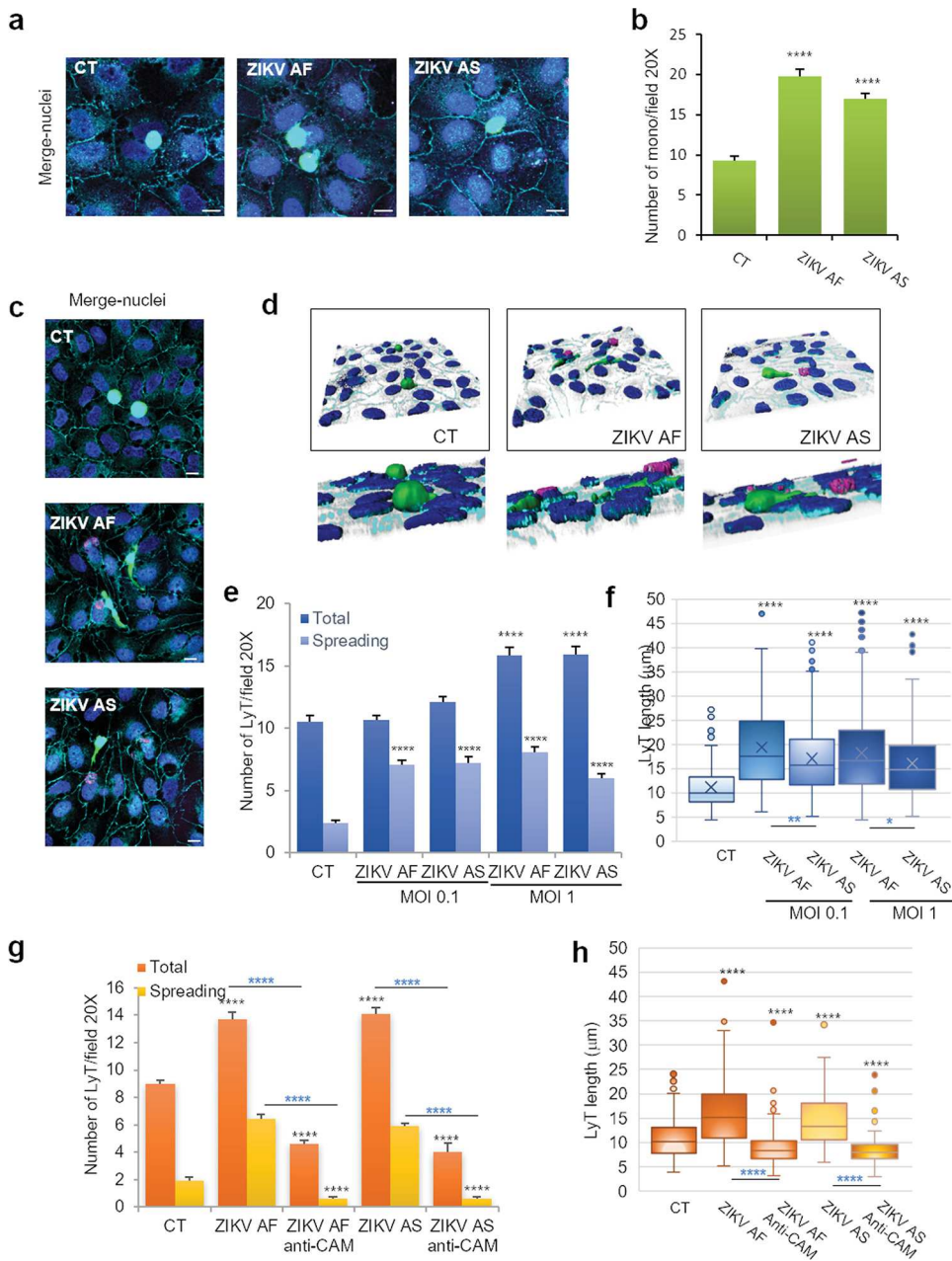
Altogether, these data suggest that upregulation of CAMs triggered by ZIKV infection may favor leukocyte recruitment to the BBB.

**CAM levels are increased during ZIKV infection in a mouse model and in humans.** Next, we analyzed CAM expression in a described mouse model of ZIKV infection and existing human cohorts from the French West Indies to investigate whether this modulation of CAMs during ZIKV (brain) infection was found *in vivo* and in patients. First, we took advantage of the pathogen-free *Irfar*<sup>-/-</sup> mouse model, which



**FIG 7** ZIKV hBLEC infection triggers strong upregulation of cell adhesion molecules. (a) Gene expression of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin [SELE], ICAM-2, ALCAM-2, and PECAM) in hBLECs infected by ZIKV AF and ZIKV AS. mRNA from hBLECs from CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) BBB model grown on cell culture inserts were collected at 7 dpi and subjected to RT-qPCR array analyses. Results are expressed as means of the fold change ( $n = 3$ ) using *HPRT1* as a housekeeping gene (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant [ $P < 0.05$ ] from CT) (see Fig. S3d). (b and c) Immunoblot blot analyses of the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected hBLECs at 7 dpi (MOI, 1). Representative images are shown. The quantification of the expression of these markers, relative to GAPDH expression, is expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) and analyzed using a Student's *t* test. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  compared to CT. (d and e) ELISA analyses of soluble ICAM-1 and VCAM-1 concentrations in the supernatants (apical and basolateral compartments) of CT or ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI, 1) hBLECs of the BBB model grown on cell culture inserts at 4, 7, and 10 dpi. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using a Student's *t* test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  compared to CT. (f) Immunoblot analysis of the expression of CAMs in mock-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected primary human pericytes at 6 dpi with an MOI of 1. Representative images are shown. The quantification of the expression of these markers, relative to GAPDH expression, is expressed as means  $\pm$  SEMs from 3 experiments.

is a pertinent model to study ZIKV pathogenesis (e.g., see reference 38) and that we recently described for ZIKV-related retinal pathology (32). To study BBB integrity and leukocyte CNS infiltration, mice were inoculated via the intraperitoneal route (i.p.) with phosphate-buffered saline (PBS; mock), ZIKV AF, or ZIKV AS ( $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml per mouse)



**FIG 8** Increased recruitment of leukocytes in ZIKV-infected human BBB. hBLECs grown on cell culture inserts were infected with ZIKV AF and ZIKV AS (MOI, 1 or 0.1) for 7 days;  $10^4$  monocytes (a) or lymphocytes CD4<sup>+</sup> (LyT) (c) prestained with CFSE were added to hBLECs for 30 min. (a) Mock-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected BBB models grown on cell culture insert were fixed after incubation with monocytes at 7 dpi. Indirect IF studies were used to visualize monocyte (green) interaction with hBLECs: merged image shows also ZIKV (pan-flavivirus, magenta), ZO-1 (cyan) and Hoechst (blue). Scale bars 10  $\mu\text{m}$ . (b) Quantitative analyses of monocyte numbers per field (20 $\times$ ). Results are expressed mean  $\pm$  SEM (30 fields per conditions per experiments ( $\geq 450$  cells,  $n = 3$ )) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  compared to CT. (c) Mock- and ZIKV AF- and ZIKV AS-infected BBB model grown on cell culture insert were fixed after incubation with LyT at 7 dpi. Indirect IF studies were used to visualize LyT (green) interaction with hBLEC: merge images show also ZIKV (pan-flavivirus, magenta), ZO-1 (cyan), and Hoechst (blue). Bars, 10  $\mu\text{m}$ . (d) 3D rendering of LyT interaction with mock-, ZIKV AF-, and ZIKV AS-infected BBB models. Confocal stacks of images shown in panel c were subjected to 3D reconstruction with the Imaris software (ZO-1, cyan; LyT, green; ZIKV, magenta; and nuclei, blue). (e) Quantitative analyses of LyT numbers per field (20 $\times$ ) in CT and ZIKV-infected BBB (MOI, 0.1 and 1). Cells elongated BBB qualified as “spreading.” Results are expressed means  $\pm$  SEMs (30 fields per conditions per experiments [ $\geq 320$  cells,  $n = 3$ ]) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  compared to CT. (f) LyT cell length (in microns) in CT and ZIKV-infected BBB (MOI, 0.1 and 1). Data are expressed as boxes and whiskers ( $\geq 300$  cells,  $n = 3$ ) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ . Black asterisks show differences compared to CT conditions, while blue asterisks show differences between ZIKV AF and ZIKV AS. (g) To monitor CAM involvement (Continued on next page)

and euthanized at 7 dpi. Some animals were then subjected to Evans blue (EB; a colorant used to monitor BBB integrity) i.p. injection at 7 dpi and euthanized 6 h post-EB i.p. injection. First, we showed efficient ZIKV brain infection through the detection of viral genomes by RT-qPCR using ZIKV NS5-specific primers (Fig. 9a). Figure 9b shows representative brains after EB and mock or ZIKV infection. Albeit we did not detect strong brain EB labeling as observed following WNV infections (19), ZIKV-infected brain appeared darker than CT brain, suggesting that partial BBB impairment occurred under these conditions (Fig. 9b). EB fluorescence was found sparsely in brain slices and was quantified in mock- and ZIKV-infected animals (see Fig. S7a). However, we showed a significant increase of EB signals in ZIKV-infected brains (Fig. 9c and Fig. S7a). Moreover, histoimmunocytochemistry showed CD45<sup>+</sup> (lymphoid cells) and CD3<sup>+</sup> (T cells) staining, highlighting CNS immune infiltration in ZIKV-infected animals (Fig. S7b). Histoimmunocytochemistry staining with the pan-flavivirus antibody revealed in ZIKV-infected animals the presence of positive cells lining blood vessels, consistent with cerebral endothelial cell infection by ZIKV (Fig. 9d and Fig. S7d). Moreover, staining with CD45 in consecutive slices (3- $\mu$ m thick) showed the recruitment of leukocytes at the BBB, some of them positive for ZIKV (Fig. 9d, arrows). To analyze the genetic modulation of neuroinflammation markers, TJ and adherens junction (AJ) proteins, as well as the levels of CAMs that we identified modulated by ZIKV *in vitro*, we performed RT-qPCR assays on several genes. Figure 9e shows that ZIKV-infected brains display an upregulation in the inflammatory genes *CXCL10*, *CCL5*, *TNFA*, *INFB*, *IL1B*, and *IL6*. Moreover, we observed that *ICAM1* and *SELE*, but not *VCAM1*, were also upregulated, partly consistent with our data with the human BBB *in vitro* model (Fig. 9f). However, genetic analyses of several TJ and AJ genes did not show strong modulation in ZIKV-infected brain (Fig. 9g). Only claudin-1 and V-cadherin were upregulated in ZIKV AF-infected brains. Immunohistological analyses of claudin-5 and ZO-1 expression and localization did not show obvious changes in the BBB area (see Fig. S8b and c), suggesting that BBB integrity was not massively perturbed in these animals but possibly in discrete areas, thus correlating with the *in vitro* results obtained with the hBLECs (Fig. 1).

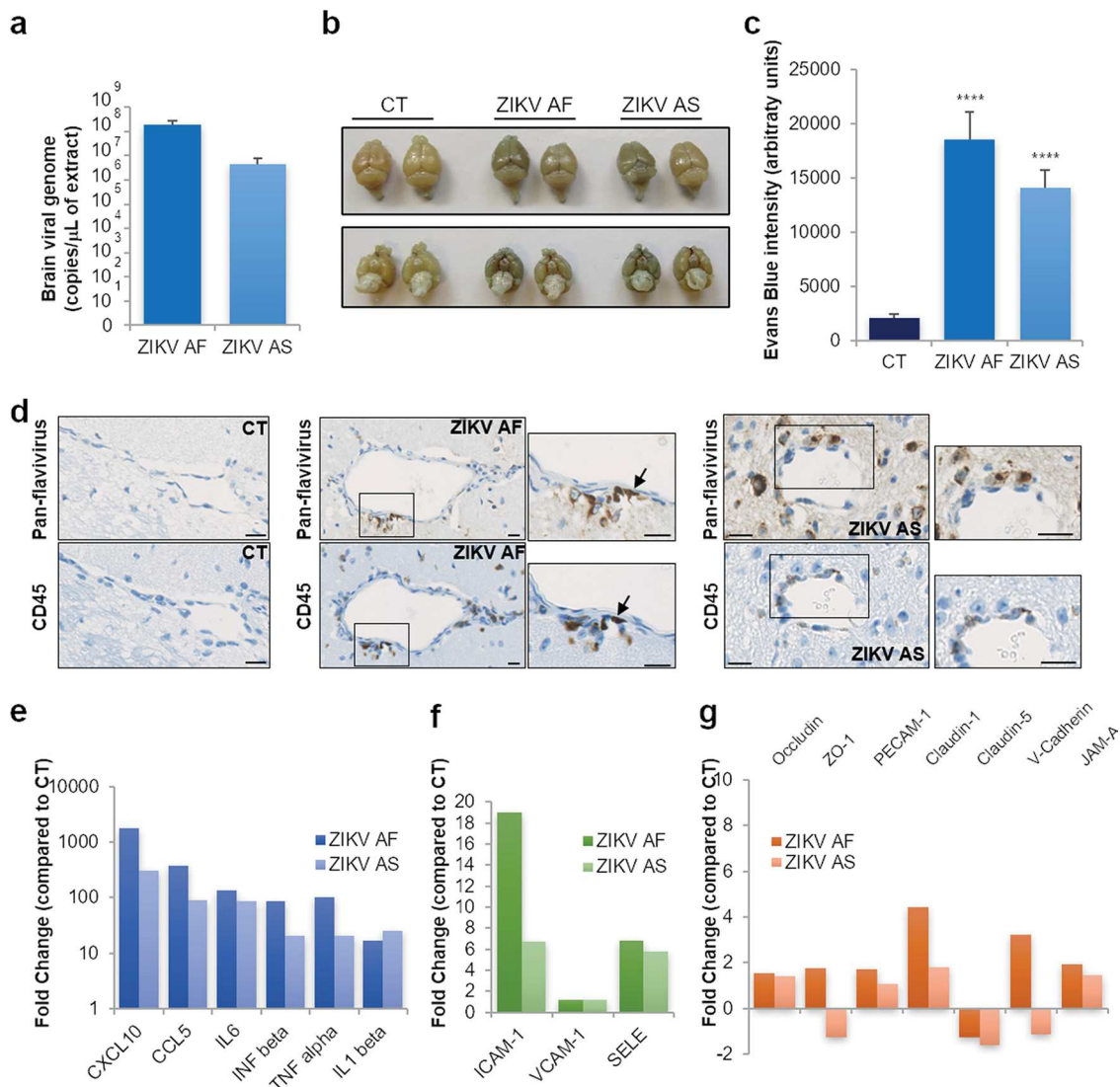
Finally, we monitored sCAM levels in plasma samples from healthy blood donors and ZIKV<sup>+</sup> symptomatic patients from the 2016 epidemic in the French West Indies. These patients displayed or not neurological symptoms upon hospital arrival (neuro and non-neuro, respectively) (Fig. 10a). We therefore performed ELISAs to measure CXCL10, ICAM-1, and VCAM-1 in these plasma samples and showed that, as previously described in ZIKV<sup>+</sup> patients (39), the CXCL10 concentration was significantly higher in ZIKV<sup>+</sup> patients, independently of their neurological status, as no statistically significant differences were found in levels between patients displaying neurological impairments and patients who did not (Fig. 10b). Levels of soluble ICAM-1 and VCAM-1 were also statistically modulated in ZIKV<sup>+</sup> patients, also independently of their neurological status (Fig. 10c and d).

These sets of observations suggest that CAMs are modulated *in vivo* and in humans during neuroinfection and could participate/exacerbate neuroinflammatory mechanisms triggered by ZIKV.

#### FIG 8 Legend (Continued)

in LyT binding/recruitment, hBLECs were incubated with a cocktail of blocking antibodies against ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin 1 h prior to LyT incubation. Quantitative analyses of LyT numbers per field (20 $\times$ ) in CT and ZIKV-infected BBB (MOI, 1). Results are expressed means  $\pm$  SEMs (30 fields per conditions per experiments [ $n = 3$ ]) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  compared to CT. Black asterisks show differences compared to CT conditions, while blue asterisks show differences between ZIKV AF/AS and ZIKV AF/AS treated with anti-CAM antibodies. (h) LyT cell length (in microns) in CT and ZIKV-infected BBB (MOI, 1) after CAM blocking. Results are expressed means  $\pm$  SEMs (30 fields per conditions per experiments [ $n = 3$ ]) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  compared to CT. Black asterisks show differences compared to CT conditions, while blue asterisks show differences between ZIKV AF/AS and ZIKV AF/AS treated with anti-CAM antibodies.

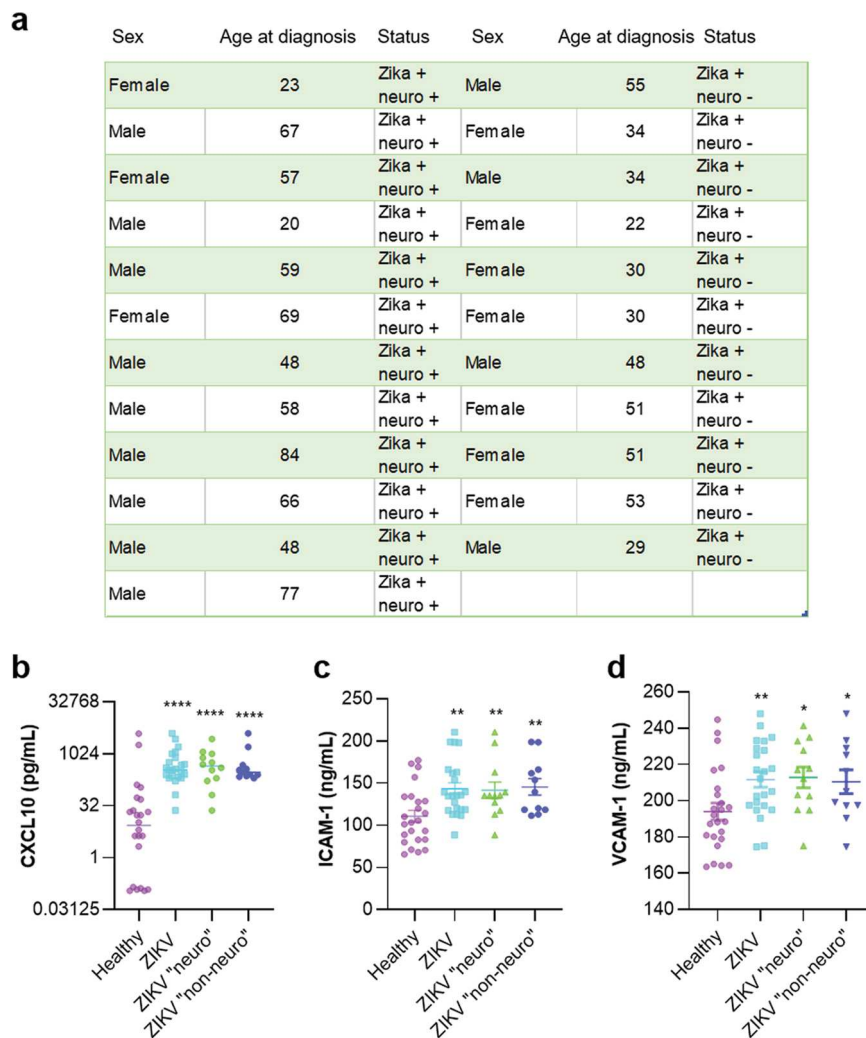




**FIG 9** ZIKV-infected mouse brain displays local BBB impairment, leukocyte infiltration, and CAM upregulation. (a) RT-qPCR analyses of ZIKV genome in the brain of ZIKV-infected *Ifnar<sup>-/-</sup>* mice 7 dpi. (b) Picture of dissected brains from EB-injected mock- and ZIKV-infected mice at 7 dpi. (c) Quantification Evans blue fluorescence in brain slices from mock- and ZIKV-infected animals. Results are expressed means  $\pm$  SEMs ( $n = 3$ ) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  compared to CT. (d) Three-micron consecutive paraffin sections were processed with Luxol blue and stained either with an anti-pan-flavivirus or an anti-CD45 (lymphoid cells) (brown labeling) antibody. Bars, 10  $\mu$ m. (e) RT-qPCR analyses of inflammatory genes in ZIKV-infected brains. Results are expressed as means of the fold change ( $n = 3$ ) using *GAPDH* as a housekeeping gene (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant [ $P < 0.05$ ] from CT) (see Fig. S8a). (f) RT-qPCR analyses of CAMs in ZIKV-infected brains. Results are expressed as means of the fold change ( $n = 3$ ) using *GAPDH* as a housekeeping gene (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant [ $P < 0.05$ ] from CT) (see Fig. S8a). (g) RT-qPCR analyses of TJ and AJ genes in ZIKV-infected brains. Results are expressed as means of the fold change ( $n = 3$ ) using *GAPDH* as a housekeeping gene (genes where the ratio gene/housekeeping gene is statistically significant [ $P < 0.05$ ] from CT) (see Fig. S8a).

## DISCUSSION

In this study, we showed that an *in vitro* multicellular human BBB model is permissive to direct ZIKV infection and replication, with partial impairment of its permeability during the course of infection. Moreover, pericytes and astrocytes, key components of the NVU and modulators of neuroinflammatory mechanisms, can also be targeted by ZIKV and allow viral replication. Interestingly, albeit viral replication was not deleterious, ZIKV in hBLECs, pericytes, and astrocytes led to the upregulation of some inflammatory cytokines (i.e., IL-6 and IL-8) and some chemokines involved in immune cell recruitment (i.e., CCL5 and CXCL10). An RT-qPCR array of genes involved in general endothelium homeostasis revealed that in hBLECs, ZIKV also led to the modulation of several genes



**FIG 10** sCAMs are increased in the plasma samples from ZIKV<sup>+</sup> patients. (a) ZIKV-infected patients from the CARBO cohorts. (b) CXCL10 levels in healthy blood donors and ZIKV<sup>+</sup> patients were measured by ELISAs. Results are expressed as means  $\pm$  SEMs (24 healthy, 24 ZIKV<sup>+</sup> plasma samples [12 neuro and 12 non-neuro]) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  compared to healthy plasma. (c and d) Soluble ICAM-1 and VCAM-1 levels in healthy blood donors and ZIKV<sup>+</sup> patients were measured by ELISAs. Results are expressed means  $\pm$  SEMs (24 healthy, 24 ZIKV<sup>+</sup> plasma samples [12 neuro and 12 non-neuro]) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  compared to healthy plasma samples.

involved in BBB physiology, such as CAMs and TJ proteins, arguing that the BBB could be perturbed (perhaps locally) during the course of infection. Modulation of CAM levels was responsible for an increased leukocyte recruitment/binding to ZIKV-infected BBB and could contribute to general immune cell CNS infiltration and inflammation-associated pathology. These observations were correlated by results in mouse models and, importantly, in the plasma of ZIKV<sup>+</sup> patients.

Arboviruses, and particularly some flaviviruses, are known to interact with, and cross, the BBB using different mechanisms such as infected immune cell transcytosis, also known as the Trojan horse pathway, or by direct hBLEC infection and release into the parenchyma (17). For instance, WNV can reach the CNS by infecting monocytes, dendritic cells, or macrophages (40, 41). ZIKV has been also suggested to use this mechanism (42–44), and here we show that some CD45<sup>+</sup> cells are recruited to cells lining blood vessels and display ZIKV antigen staining (Fig. 9d). The effect on BBB homeostasis of infected leukocytes is, however, still unclear. Direct infection of hBLECs by using various cell lines and *in vitro* models has been described for WNV, dengue

virus (DENV), JEV, and recently, ZIKV (17, 21, 37, 45, 46). Recent studies and our results suggest that ZIKV can directly infect BBB cells but may not have a strong deleterious effect on BBB integrity and that viral particles could be released basolaterally and reach the CNS (21). Other arboviruses such as WNV and JEV lead to endothelium integrity impairment and inflammatory molecule production that will disrupt BBB integrity and further allow virus CNS access (19, 47). Among these cytokines, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), and IL-6 have been shown to modulate BBB permeability by several mechanisms, including downregulation or relocalization of junction proteins such as occludin and ZO-1 (48, 49). Modulation of TJ and AJ protein expression in arbovirus infection may increase viral and immune cell CNS access by paracellular pathways (50).

In adults, ZIKV infection can be associated with peripheral neuropathology (Guillain-Barré syndrome) but also, in some cases, with CNS disorders such as encephalitis and encephalomyelitis (16, 51, 52). The characterization of the molecular and cellular mechanisms governing ZIKV CNS access are therefore particularly important. A few studies addressed this subject using *in vitro* BBB models. However, modeling the human BBB is still rather challenging, and in many cases, brain vascular immortalized cell lines are used, which are far from reproducing *in vivo* physiological properties, in particular, in terms of permeability (30, 31, 53). Promising and innovative *in vitro* models are starting to emerge, using stem cell- and iPSC-derived human BECs, to recreate 3D or flow properties (30, 53). Similarly to our observations in the present hBLEC model, a study using iPSC-derived BECs (22), as well as work using human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) (20) (cells isolated from pediatric and adult patients and kept in culture for several passages [54]) show efficient direct infection and release from both apical and basolateral sides without disruption of the endothelium integrity. However, these models are not completely pertinent, as the NVU is a complex multicellular system. In our system, hBLECs are in contact with factors produced by pericytes that allow the regulation of endothelium homeostasis and may participate/exacerbate inflammatory events occurring in these cells. Even though we detected efficient ZIKV replication of two African and Asian ZIKV strains, which both underwent a limited number of amplification passages (33), we nonetheless did not observe a strong impairment of the BBB integrity. However, albeit the permeability coefficient ( $P_e$ ) indicated an impermeable endothelium, ZIKV infection led to a  $P_e$  increase (i.e., an increase in permeability) of a very small lipophilic marker (i.e., LY, 442.3 Da) and a decrease of TEER, which could suggest that the endothelium integrity was partially perturbed. This was then confirmed by a visualization of actin network reorganization, with a potential subtle downregulation of proteins regulating BBB integrity such as TJ proteins (occludin, ZO-1, and claudin-5), PECAM-1, and transporters (e.g., PgP). This set of observations could imply that the general BBB homeostasis and function may indeed be impaired by ZIKV.

In this study, we found that the chemoattractive molecules CXCL10, CCL5, and CCL2 were potently released by the apical compartment upon ZIKV hBLEC infection, suggesting that circulating leukocytes could be attracted to the infected BBB. CXCL10 is emerging as a key inflammatory molecule expressed during neuroinflammatory processes such as autoimmune disorders (e.g., multiple sclerosis [55] or encephalitis [47, 56]). It is involved in the recruitment of T cells to the BBB and was proposed to favor inflammatory cell recruitment into the CNS following rabies virus infection (56). Interestingly, it was also detected in plasma samples from ZIKV<sup>+</sup> patients (our results and those in reference 39). Moreover, CCL5 and CCL2 are known mediators of leukocyte recruitment to the BBB (57, 58), thus suggesting that the local environment in ZIKV-infected BBB could favor immune cell recruitment/migration and access to the CNS. Besides the upregulation of chemoattractants, one of the key observations of this study was the marked increase in CAM expression, namely, ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin, in ZIKV-infected hBLECs. Using different approaches, we showed that this upregulation occurred through the endothelium and was not only restricted to infected cells. CAMs play crucial roles in BBB homeostasis, one of which is to mediate immune cell (e.g.,

leukocytes) capture, docking, and transmigration (59). This is an important step, as it is crucial for CNS immune surveillance, particularly in an inflammatory state (e.g., encephalitis and meningoencephalitis). CAMs present at the surfaces of endothelial cells are involved in numerous steps of leukocyte diapedesis, namely, capture/rolling (dependent on selectins), arrest (dependent on ICAM-1/VCAM-1), crawling, and diapedesis *per se* (60–62). Leukocytes can cross the BBB using para- or transcellular transmigration, without TJ and barrier disruption (59). This has been well documented in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) models (63). In EAE, as well as in multiple sclerosis (MS), ICAM-1, VCAM-1, and ALCAM are upregulated (59). Noteworthy, the cell surface level of ICAM-1 was shown to be directly proportional to T cell diapedesis (64). Besides their “physical role” as a docking factor, CAMs display intracellular functions that will support diapedesis: for instance, intracellular signaling is associated with ICAM-1 and VCAM-1 in brain vascular endothelial cells. The small GTPase Rho, a potent regulator of the actin cytoskeleton, can be activated upon ICAM-1 engagement by leukocytes, leading to actin rearrangement and TJ and AJ protein redistribution, allowing diapedesis (65). Here, we show that both monocytes and CD4<sup>+</sup> T cells (LyT) showed an increase in binding to hBLECs under ZIKV infection conditions. Moreover, LyT displayed a strong change in morphology, suggestive of the first step of diapedesis. In this context, CAMs were found to be necessary for both binding and “spreading,” as a cocktail of blocking antibodies strongly reduced both the total number and the size of bound LyT. Interestingly, a recent study reported that ZIKV-infected monocytes also displayed upregulation of CAMs such as ICAM-2 and V-cadherin and increased adhesion properties (66).

Upregulation of CAMs was also observed in the case of WNV CNS infection both *in vivo* (in animal models) and *in vitro* in human brain microvascular endothelial cells (HBMVECs; a brain endothelial cell line) and was proposed to be responsible for leukocyte diapedesis (37, 67). Similarly, upregulation of VCAM-1 in microvascular endothelial cell lines infected with dengue virus (DENV) was reported (45), whereas supernatant from DENV-infected monocytes led to the increase in ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin levels in human microvascular endothelial cells (HMVECs) (68). Here, we also found an increase in the concentration of soluble forms of ICAM-1 and VCAM-1 in the apical supernatant of ZIKV-infected hBLECs as well as in the plasma samples from ZIKV<sup>+</sup> patients. In the context of CAMs, circulation of soluble extracellular domains is often associated with inflammatory states. Their serum levels are increased in cardiovascular disorders such as arteriosclerosis and in some forms of cancer (69). Moreover, they can be found in acute disseminated encephalomyelitis, which is a postinfectious inflammatory disease, and in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with multiple sclerosis, where their level correlates with disease severity (70). Similar observations were made in patients suffering from Parkinson’s disease (71), highlighting the potential relation between sCAM levels in biological fluids and inflammation. Interestingly, an increase in soluble VCAM-1 has been detected in severe DENV infections and was proposed to represent a marker to monitor disease severity (72). To clinicians, the use and characterization of serum biomarkers is pertinent not only to predict disease severity but also potential neurological impairment (e.g., by detecting neuronal factors resulting from increased BBB permeability). In ZIKV<sup>+</sup> patients, however, we did not detect differences in sCAM levels depending of the neurological status at the time point tested (still in the viremic phase). We could therefore not conclude that levels of sCAMs correlate with ZIKV CNS targeting; therefore, levels could be predictive of CNS impairment during infection. It is possible that the general inflammatory response triggered by ZIKV in humans precludes specific detection in the plasma of ubiquitous molecules that are also modulated during CNS invasion or that differences appear later in the disease progression. One could also speculate that in some patients, ZIKV could reach the CNS without leading to strong and detectable neurological impairments. Nonetheless, adult CNS targeting during ZIKV infection could be a combination of strain-dependent virulence, inflammatory environment, and individual genetic background.

Moreover, we showed that human pericytes were infected by ZIKV, also leading to

the production of cytokines and chemokines. Due to their critical role in the NVU in BBB endothelial cell biology, modulation of pericyte homeostasis can have direct effects on barrier integrity (29). Moreover, pericytes have also been shown to directly regulate leukocyte diapedesis once they crossed the endothelial cell layer (73). Very few studies report on pericyte viral infection and their consequences: HIV was shown to efficiently infect pericytes and, in turn, trigger cellular dysfunction and inflammatory responses, which in some cases, may affect BBB integrity (74). Similarly, JEV can also infect brain pericytes, which, through the action of inflammatory molecules, will destabilize the brain endothelial barrier (75). Here, we detected efficient, albeit reduced, viral replication. This translated in the modulation of several genes involved in immune response, in particular, some chemokines such as CXCL10 and CCL5 and inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8. One could therefore draw the hypothesis that ZIKV release from the BBB basolateral compartment and further pericyte infection could favor the production of a local inflammatory environment. Interestingly, in ZIKV-infected retinal pericytes were also shown to be infected by ZIKV (76). One limitation in our study, however, is the use of bovine pericytes in the bi- and triple culture models. It will be important to use human pericytes in these models, as inflammatory responses may be different in infected human versus bovine pericytes. We also observed that astrocytes potentiate the inflammatory response in infected BBB, as levels of apically secreted CCL5 appeared to be more important when hBLECs were cultured with astrocytes and pericytes. The infection of astrocytes by ZIKV in close proximity to the BBB, concomitantly with pericytes, could strengthen the release of cytokines and chemokines and the modulation of BBB integrity as well as the recruitment of leukocytes from the blood.

A parallel between some of these observations and our previous work on the blood-retinal barrier, in particular, the retinal pigment epithelium (RPE) (32), is pertinent to draw here. Indeed, we and others have described the infection of several cell types of the blood-retinal barriers, which can explain the ocular disorders associated with ZIKV infection (77). Albeit some similar mechanisms in the induction of chemokines and some inflammatory cytokines were reported here (i.e., upregulation of *CCL5*, *CXCL10*, *IFNB*, *IL6*, etc.), it is noteworthy that ZIKV AF and ZIKV AS had a much stronger effect on the RPE integrity and homeostasis. Indeed, at stages of infections where the BBB was not perturbed, RPE impermeability was completely abolished, and electron microscopy studies revealed the (almost complete) epithelium disruption (32). Moreover, ZO-1 staining was nearly abolished in ZIKV-infected RPE, altogether demonstrating that cell-cell adhesion was strongly impaired. Here, on the contrary, the endothelium organization and integrity were only subtly affected. The balance in the production of cytokines and chemokines seems to be in line with the modest effect on barrier integrity, as neither IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$  and very limited amounts of IFN- $\gamma$  were produced, cytokines previously shown to mediate BBB loss of integrity triggered by WNV and JEV (19, 47). We report here nonetheless that BBB permeability was partially perturbed by direct ZIKV infection both *in vitro* and *in vivo*. A recent study also suggests that ZIKV can slightly modulate BBB integrity (23) and could be consistent with a local effect during infection, allowing virus entry and recruitment of immune cells. This was also illustrated during *in vivo* infection by JEV, where increased BBB permeability was observed in the cerebrum but not in the cerebellum, suggesting that differential alterations in the barrier properties of cerebrum and cerebellum microvascular endothelial cells could likely occur depending on the inflammatory stimuli involved (78).

It is noteworthy, however, that the use of *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice has a clear limitation when parallels to ZIKV human (neuro)pathology need to be drawn (79). In particular, since IFN pathways are involved in BBB integrity regulation, their modulation in mice could affect BBB homeostasis *per se*, since type I IFN can stabilize the BBB and modulate the expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , known to perturb BBB integrity (2). For instance, *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice subjected to WNV infection displayed an increased impairment of BBB permeability compared to that of WNV-infected wild-type (WT) animals (80). Regarding ZIKV and animal models, WT mice do not display strong sensibility to infection, due to

the absence of degradation of murine STAT2 and a subsequent clearance of the virus (79). Therefore, to study ZIKV, mice deficient in IFN signaling are used a majority of the time, with the limitations described above. Interestingly, one study, however, demonstrated strain-dependent BBB impairment in immunocompetent mice (23). The use of nonhuman primate models showed that ZIKV reached the CNS and could provide complementary approaches to better study the effect of ZIKV on BBB homeostasis *in vivo* (79). In this light, compromised blood-brain barrier (loss of ZO-1) was observed in new world monkey models subjected to ZIKV infection (81).

Finally, one could speculate on the differential neurotropism and local BBB inflammation/perturbation between ZIKV AF and ZIKV AS, as we observed higher replication and, in some cases, particularly in pericytes and astrocytes, stronger inflammatory responses triggered following infection *in vitro* by ZIKV AF. Numerous studies now point toward differences between African and Asian strains, with a generally higher virulence and cell toxicity associated with ZIKV of African origins (12, 82). It is not clear, however, whether differences in CNS access in adults exist between the different strains. One study reported differences between ZIKV strains in BBB modulation (23), and neural cell attachment and neurotoxicity dependent on ZIKV infection were proposed to be dependent on the prM-E protein (83). Here, we show that *in vitro*, ZIKV AF displayed a stronger apical and basolateral viral release, and in the mouse CNS, ZIKV AF replicated more efficiently and led to stronger upregulation of some inflammatory and adhesion molecules than ZIKV AS, suggesting that African strains may have better access to the adult CNS.

Altogether, our observations would favor a hypothesis where ZIKV direct infection of brain vascular endothelial cells would allow viral replication and possible delivery into the parenchyma, a mechanism that, in combination with the Trojan horse pathway, would favor ZIKV access to the CNS. Modulation of surface proteins such as CAM and of junction actor modulators, as well as secretion of some chemokines and inflammatory molecules, would help recruit leukocytes, which would engage in diapedesis and further infiltrate the CNS, favoring neuroinflammation. Pericytes, which are now well described as mediators of neuroinflammation, as well as astrocytes, could be infected and support this inflammatory state, possibly in local areas of the BBB.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** The antibodies used in this study were as follows: mouse anti-pan-flavivirus (clone 4G2, MAB10216; Millipore), rabbit anti-ZO1 (617300; Invitrogen), and rabbit anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (G9545; Sigma-Aldrich) antibodies, rabbit anti-VCAM-1 (clone EPR 16589; Abcam) and blocking antibodies (BBA5; R&D Systems), rabbit anti-ICAM-1 (clone 9HCLC; Abcam) and blocking antibodies (BBA3-200; R&D Systems), and mouse anti-hE-selectin (BBIG-E1; R&D Systems), rabbit anti-PDGF receptor beta (ab32570; Abcam), mouse anti-dsRNA (J2; Scicons), rabbit anti-ZIKV Env (Gene-Tex), rat anti-CD45 (14-0451; Bioscience), rabbit anti-CD3 (A0452; Agilent), and rabbit anti-claudin-5 (341600; Invitrogen) antibodies. Hoechst was purchased from Merck, and isolectin B4 was purchased from Vector Laboratories.

Vero cells (ATCC, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% or 2% heat-inactivated fetal bovine serum (HI-FBS), 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U penicillin, 2 mM L-glutamine, 1% sodium bicarbonate, and 1% HEPES buffer (all from Pan Biotech). C636 cells were grown in RPMI medium containing 10% or 2% HI-FBS, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 100 U penicillin, without L-glutamine but with 2.0 g/liter  $\text{NaHCO}_3$  (all from Pan Biotech). Human pericytes and astrocytes were purchased from ScienCell and cultured according to the manufacturer's instructions. Cells were cultured on poly-D-lysine-coated plates and were used between passage 2 and 4.

**Virus strains.** We used previously published ZIKV AF and AS strains (32, 33). Briefly, H/PF/2013 ZIKV of Asian lineage (French Polynesia, 2013) and ArB41644 ZIKV of African lineage (Bangui, Central African Republic, 1989) were produced and provided by the National Reference Center for arboviruses at fewer than 5 passages on Vero cells. Viral titers were determined by the 50% tissue culture infective dose ( $\text{TCID}_{50}$ ), which was calculated using the Spearman-Kärber method (84), and were expressed as  $\text{TCID}_{50}$  per milliliter.

***In vitro* human BBB models.** This model requires the collection of human umbilical cord blood, for which infants' parents signed an informed consent form, in compliance with French legislation. The protocol is approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH number [no.] DC2011-1321). All experiments were carried out in accordance with the approved protocol. Hematopoietic stem cells positive for the CD34 marker were isolated and purified from umbilical cord blood and then differentiated into endothelial cells as previously described (85). Then, the CD34<sup>+</sup> blood cord-derived endothelial cells (CD34<sup>+</sup>-EC) were seeded on Matrigel-coated Transwell filters (Costar, 0.4  $\mu$ m) on

top of bovine pericytes in 12-well plates as previously described (25). This model is then named human brain-like endothelial cells (hBLECs) and reproduces the main features of the human BBB (25, 28). Briefly, once plated, CD34<sup>+</sup>-EC and pericytes were cultured for 5 to 6 days, with medium changes every 2 days. Then, endothelial permeability (Pe) was tested by measuring Lucifer yellow (LY) (20  $\mu$ M; Life Technologies) transendothelial crossing using established protocols (25, 27). Pe was measured after 1 h of LY transport by calculating the concentration-independent parameter as previously published (27). The fluorescence detection was performed using a Tecan SPARK 10M apparatus with excitation/emission wavelength (nm) settings of 432/538 nm. Infection experiments were carried when the barrier was impermeable (i.e., with a Pe of  $\leq 1 \times 10^{-3}$  cm/min). ZIKV was added at the correct MOI in 200  $\mu$ l of complete endothelial medium (ECM) for 2 h on an orbital shaker. Three hundred microliters of ECM was then added and the inoculum removed. Infections were then carried for 4, 7, or 10 days. For each experiment, triplicates were used.

The TEER was measured using the Epithelial Volt/Ohm Meter EVOM2 (World Precision Instruments, Hertfordshire, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, electrodes were sterilized in 70% ethanol for 5 min, rinsed and equilibrated in media, and then placed in the compartmentalized chambers with the longer electrode vertically touching the bottom of the dish in the lower chamber and the shorter electrode in the upper chamber without touching the cell layer. TEER was recorded once the value stabilized, approximately 5 s after placing the electrode. To calculate the final TEER values (Ohms-cm<sup>2</sup>), the background measurement of a Matrigel-coated insert without cells was subtracted from the reading and the value multiplied by the growth surface area.

For triple-culture experiments, pericytes were seeded on the day of plating onto the gelatin-coated bottom of the Transwell filter (Costar, 0.4  $\mu$ m), and 3 h later, CD34<sup>+</sup>-EC were seeded on the Matrigel-coated top part of the filter. Coculture was allowed for 6 days, and Pe was tested via the LY protocol. The following day, human primary astrocytes were plated on poly-L-lysine-coated 12-well plates, and filters were transferred according to published protocol (35). In this set up, there is no contact between the different cell types. Infection with ZIKV was concomitantly performed.

**Leukocyte adhesion assays.** T cells and monocytes were purified according to established protocols and maintained for 7 days with the cytokine IL-2 (T cells CD4<sup>+</sup>) or used 12 to 18 h postisolation (monocytes). Buffy coats from healthy donors were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Montpellier, France). After Ficoll gradient on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), monocytes were isolated using CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec); purity was >95% CD14<sup>+</sup>. Adhesion assays were conducted as previously published (27). Briefly, immune cells (LyT or monocytes) were labeled using the CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) probe according to the manufacturer's instructions (Life Technology) and incubated for 30 min on hBLECs in ECM. Blocking experiments were performed by incubating with a cocktail of neutralizing antibodies against ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin (10, 20, and 25  $\mu$ g/ml, respectively; R&D systems [see above]) for 1 h prior to the adhesion assay. Cells were then gently rinsed with PBS, filters were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature (RT), and indirect immunofluorescence assessment was then performed. The "spread" phenotype was determined when the general cell shape was not circular and some cell ruffles or filopodium-like structures were observed. This descriptive method was further confirmed by analyzing the cell diameter.

**Mouse experiments and ethics statement.** Pathogen-free *Ilfnar*<sup>-/-</sup> mice (86) kindly provided by Giles Uzé were bred in the animal facilities at CECEMA (Centre d'Élevage et de Conditionnement Expérimental des Modèles Animaux). Groups of 6- to 8-week-old *Ilfnar*<sup>-/-</sup> mice were infected with ZIKV/PF13 or ZIKV/ArB41644, as described previously (32). Briefly, groups of 6- to 8-week-old mice were inoculated via an intraperitoneal route with 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml of ZIKV AS or ZIKV AF. At 7 dpi, mock- and ZIKV-infected mice were intravenously (i.v.) injected with 0.5% Evans blue solution (EB; 200  $\mu$ l per mouse) and euthanized after PBS intracardiac perfusion following a lethal dose of pentobarbital (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Brains were either fixed in 4% PFA and cut using a microtome (3- $\mu$ m sections) at the RHEM facilities (Montpellier) or snap-frozen. Mice were bred and maintained according to the French Ministry of Agriculture and European institutional guidelines (appendix A STE no. 123). Experiments were performed according to national regulations, and this study was specifically approved (approval no. 6773-201609161356607) by the regional ethics committee of Languedoc-Roussillon (Comité Régional d'Éthique sur l'Expérimentation Animale- Languedoc-Roussillon), France.

**Human samples (CARBO cohort).** CARBO (Cohort Arbovirose) is a descriptive and prognostic study of arbovirose in France, based on a hospital cohort of children and adults with suspected arbovirose. The main objective of the study was to define the predictive factors of severe arbovirose. This study is registered at clinicaltrials.gov (NCT01099852). Ethical clearance was obtained from the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (ANSM) (no. IDRCB 2010-A00282-37) and by the committee for the protection of individuals. Written and signed informed consent of all subjects was obtained. For this study, patient inclusion was conducted from December 2015 to December 2016. Inclusion criteria were suspicion of ZIKV infection, ability to sign informed consent, blood or urine sample positive for ZIKV RNA by reverse transcription-PCR (RealStar Zika Virus RT-PCR kit 1.0; Altona Diagnostics, Hamburg, Germany), and onset of symptoms of  $\leq 21$  days. Data were collected at the initial visit and, if possible, at day 3 after the onset of symptoms, between days 5 and 7, between days 8 and 10, at day 21, and at weeks 6 and 12, including sociodemographic data, comorbidities, and clinical characteristics. Neurologic manifestations were classified as either involving the peripheral nervous system (PNS) only, CNS only, or involving both PNS and CNS (mixed disorders). A diagnosis of Guillain-Barré syndrome was made using international Brighton criteria. Patients with encephalitis or acute myelitis were diagnosed according to consensus criteria.

**Statistics.** For all quantitative analyses, a minimum of three independent experiments were performed. Unpaired *t* tests (i.e., Wilcoxon-Mann-Whitney) were performed to analyze unpaired data.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**TEXT S1**, DOCX file, 0.1 MB.

**FIG S1**, TIF file, 0.8 MB.

**FIG S2**, TIF file, 0.9 MB.

**FIG S3**, TIF file, 0.5 MB.

**FIG S4**, TIF file, 0.1 MB.

**FIG S5**, TIF file, 0.1 MB.

**FIG S6**, TIF file, 1.0 MB.

**FIG S7**, TIF file, 1.8 MB.

**FIG S8**, TIF file, 0.6 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Giles Uzé for the *Irfnar<sup>-/-</sup>* mouse model and also Chantal Fournier, Fanny Leon, Vanessa Daoudi, Jean-Marie Peloponese, Aurélie Covinhes, the Montpellier RIO Imaging facility, the University of Montpellier A3 animal facility personnel, and CERBIM.

This work/project was publicly funded by the Montpellier University of Excellence (MUSE) through ANR (the French National Research Agency) under the Investissements d'avenir program ANR-16-IDEX-0006 and the Labex EpiGenMed Investissements d'avenir program ANR-10-LABX-12-01, as well by REACTing.

Conceived and designed the experiments: Y.S. and S.S.; performed the experiments: M.C., C.D., Y.S., J.B., O.C., G.M., K.B., V.F., Y.G., F.D.B., M.B., L.D., and S.S.; analyzed the data: F.G., N.M., S.N., A.C., Y.S., and S.S.; contributed reagents/materials/analysis tools: A.C., E.T., and P.V.D.P.; contributed to the writing of the manuscript: M.C. and S.S.

We declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. 2017. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol* 18:123–131. <https://doi.org/10.1038/ni.3666>.
- Banks WA, Erickson MA. 2010. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis* 37:26–32. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.031>.
- De Chiara G, Marcocci ME, Sgarbanti R, Civitelli L, Ripoli C, Piacentini R, Garaci E, Grassi C, Palamara AT. 2012. Infectious agents and neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 46:614–638. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8320-7>.
- Miner JJ, Diamond MS. 2016. Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood-brain barrier. *Curr Opin Immunol* 38:18–23. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.10.008>.
- Salinas S, Schiavo G, Kremer EJ. 2010. A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nat Rev Microbiol* 8:645–655. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2395>.
- Kramer-Hämmerle S, Rothenaigner I, Wolff H, Bell JE, Brack-Werner R. 2005. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res* 111:194–213. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.009>.
- Wang S, Welte T, McGargill M, Town T, Thompson J, Anderson JF, Flavell RA, Fikrig E, Hedrick SM, Wang T. 2008. Drak2 contributes to West Nile virus entry into the brain and lethal encephalitis. *J Immunol* 181:2084–2091. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2084>.
- Zhang Y-L, Ouyang Y-B, Liu L-G, Chen D-X. 2015. Blood-brain barrier and neuro-AIDS. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19:4927–4939.
- Salimi H, Cain MD, Klein RS. 2016. Encephalitic arboviruses: emergence, clinical presentation, and neuropathogenesis. *Neurotherapeutics* 13:514–534. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0443-5>.
- Gorshkov K, Shiryayev SA, Fertel S, Lin Y-W, Huang C-T, Pinto A, Farhy C, Strongin AY, Zheng W, Tersikh AV. 2018. Zika virus: origins, pathological action, and treatment strategies. *Front Microbiol* 9:3252. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03252>.
- Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46:509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).
- Simonin Y, van Riel D, Van de Perre P, Rockx B, Salinas S. 2017. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLoS Negl Dis* 11:e0005821. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005821>.
- Pierson TC, Diamond MS. 2018. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* 560:573–581. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y>.
- Chimelli L, Melo ASO, Avvad-Portari E, Wiley CA, Camacho AHS, Lopes VS, Machado HN, Andrade CV, Dock DCA, Moreira ME, Tovar-Moll F, Oliveira-Szejnfeld PS, Carvalho ACG, Ugarte ON, Batista AGM, Amorim MMR, Melo FO, Ferreira TA, Marinho JRL, Azevedo GS, Leal J, Madeiro da Costa RF, Rehen S, Arruda MB, Brindeiro RM, Delvecchio R, Aguiar RS, Tanuri A. 2017. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. *Acta Neuropathol* 133:983–999. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1699-5>.
- Platt DJ, Miner JJ. 2017. Consequences of congenital Zika virus infection. *Curr Opin Virol* 27:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.09.005>.
- da Silva IRF, Frontera JA, Bispo de Filippis AM, Moreira do Nascimento OJ, RIO-GBS-ZIKV Research Group. 2017. Neurologic complications associated with the Zika virus in Brazilian adults. *JAMA Neurol* 74:1190–1198. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.1703>.
- Mustafá YM, Meuren LM, Coelho SVA, Barros de Arruda L. 2019. Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. *Front Microbiol* 10:525. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00525>.
- Lazear HM, Daniels BP, Pinto a. K, Huang a. C, Vick SC, Doyle SE, Gale M, Klein RS, Diamond MS. 2015. Interferon-λ restricts West Nile virus neuroinvasion in Brazilian adults. *Sci Transl Med* 7:284ra59. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4304>.
- Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. 2004. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10:1366–1373. <https://doi.org/10.1038/nm1140>.

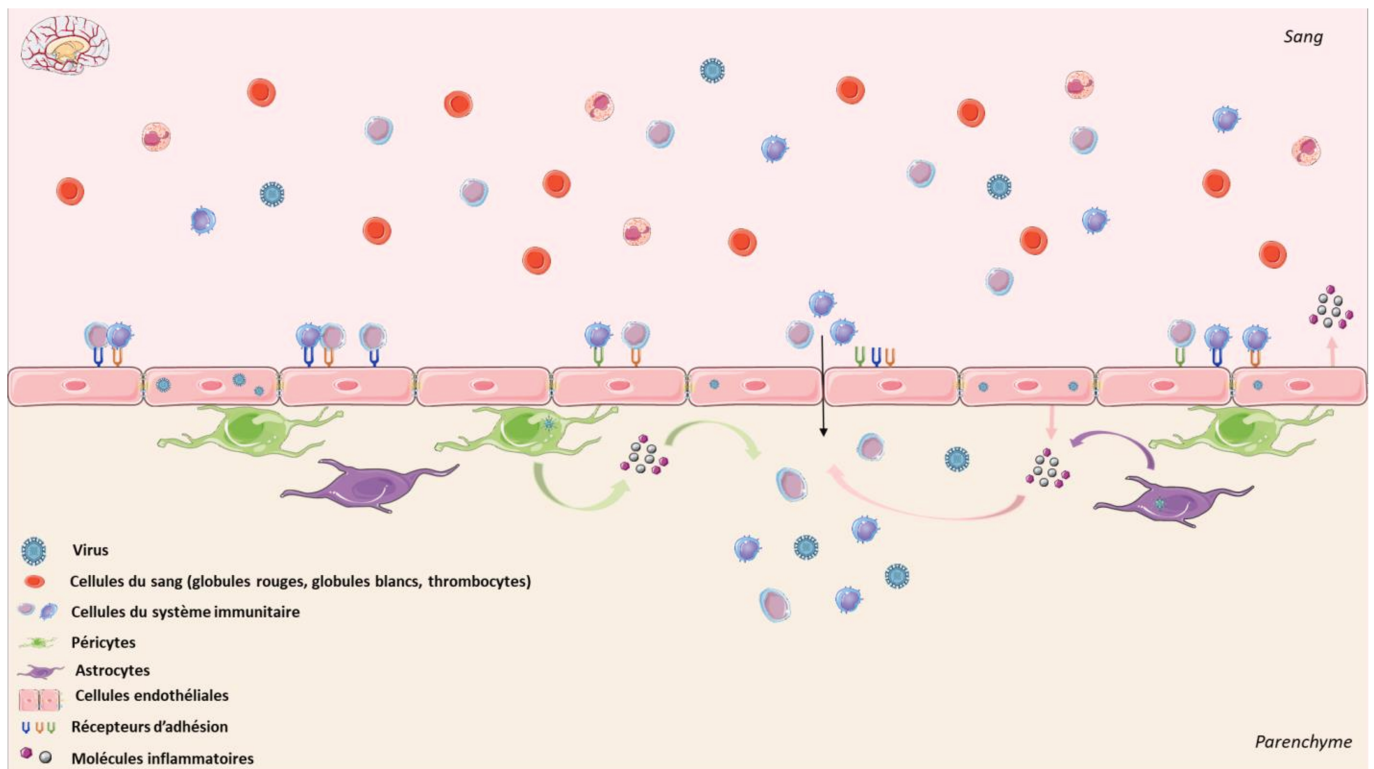


20. Mladinich MC, Schwedes J, Mackow ER. 2017. Zika Virus persistently infects and is basolaterally released from primary human brain microvascular endothelial cells. *mBio* 8:e00952-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00952-17>.
21. Papa MP, Meuren LM, Coelho SVA, Lucas C, G d O, Mustafá YM, Lemos Matassoli F, Silveira PP, Frost PS, Pezzuto P, Ribeiro MR, Tanuri A, Nogueira ML, Campanati L, Bozza MT, Paula Neto HA, Pimentel-Coelho PM, Figueiredo CP, de Aguiar RS, de Arruda LB. 2017. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. *Front Microbiol* 8:2557. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02557>.
22. Alimonti JB, Ribecco-Lutkiewicz M, Sodja C, Jezierski A, Stanimirovic DB, Liu Q, Haqqani AS, Conlan W, Bani-Yaghoob M. 2018. Zika virus crosses an *in vitro* human blood brain barrier model. *Fluids Barriers CNS* 15:15–19. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0100-y>.
23. Leda AR, Bertrand L, Andras IE, El-Hage N, Nair M, Toborek M. 2019. Selective disruption of the blood–brain barrier by Zika virus. *Front Microbiol* 10:2158. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02158>.
24. Wolff A, Antfolk M, Brodin B, Tenje M. 2015. *In Vitro* blood-brain barrier models—an overview of established models and new microfluidic approaches. *J Pharm Sci* 104:2727–2746. <https://doi.org/10.1002/jps.24329>.
25. Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, Coisne C, Engelhardt B, Dehouck M-P, Ferreira L. 2014. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* 9:e99733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099733>.
26. Lyck R, Lécuyer M-A, Abadier M, Wyss CB, Matti C, Rosito M, Enzmann G, Zeis T, Michel L, Garcia Martin AB, Sallusto F, Gosselet F, Deutsch U, Weiner JA, Schaeren-Wiemers N, Prat A, Engelhardt B. 2017. ALCAM (CD166) is involved in extravasation of monocytes rather than T cells across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 37:2894–2909. <https://doi.org/10.1177/0271678X16678639>.
27. Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, Fenart L. 2015. *In vitro* discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res* 1594:15–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.047>.
28. Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, Lyck R, Muller WA, Lassmann H, Engelhardt B. 2019. PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation. *Front Immunol* 10:711. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00711>.
29. Hurtado-Alvarado G, Cabañas-Morales AM, Gómez-González B. 2014. Pericytes: brain-immune interface modulators. *Front Integr Neurosci* 7:80. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00080>.
30. Aday S, Cecchelli R, Hallier-Vanuxem D, Dehouck MP, Ferreira L. 2016. Stem cell-based human blood-brain barrier models for drug discovery and delivery. *Trends Biotechnol* 34:382–393. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.01.001>.
31. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud P-O, Deli MA, Förster C, Galla HJ, Romero IA, Shusta EV, Stebbins MJ, Vandenhoute E, Weksler B, Brodin B. 2016. *In vitro* models of the blood-brain barrier: an overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab* 36:862–890. <https://doi.org/10.1177/0271678X16630991>.
32. Simonin Y, Erkilic N, Damodar K, Clé M, Desmetz C, Bolloré K, Taleb M, Torriano S, Barthelemy J, Dubois G, Lajoix AD, Foulongne V, Tuailon E, Van de Perre P, Kalatzis V, Salinas S. 2019. Zika virus induces strong inflammatory responses and impairs homeostasis and function of the human retinal pigment epithelium. *EBioMedicine* 39:315–331. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.010>.
33. Simonin Y, Loubatol F, Desmetz C, Foulongne V, Constant O, Fournier-Wirth C, Leon F, Molès J, Goubaud A, Lemaitre J, Maquart M, Leparco-Goffart I, Briant L, Nagot N, Van de Perre P, Salinas S. 2016. Zika virus strains potentially display different infectious profiles in human neural cells. *EBioMedicine* 12:161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.020>.
34. Chen J, Yang Y-F, Yang Y, Zou P, Chen J, He Y, Shui S, Cui Y, Bai R, Liang Y, Hu Y, Jiang B, Lu L, Zhang X, Liu J, Xu J. 2018. AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. *Nat Microbiol* 3:302–309. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0092-4>.
35. Deligne C, Hachani J, Duban-Deweer S, Meignan S, Leblond P, Carcaboso AM, Sano Y, Shimizu F, Kanda T, Gosselet F, Dehouck M-P, Mysiorek C. 2020. Development of a human *in vitro* blood-brain tumor barrier model of diffuse intrinsic pontine glioma to better understand the chemore-
- sistance. *Fluids Barriers CNS* 17:37. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00198-0>.
36. Takeshita Y, Ransohoff RM. 2012. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and *in vitro* models. *Immunol Rev* 248:228–239. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01127.x>.
37. Roe K, Orillo B, Verma S. 2014. West Nile virus-induced cell adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells regulate leukocyte adhesion and modulate permeability of the *in vitro* blood-brain barrier model. *PLoS One* 9:e102598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102598>.
38. Miner JJ, Sene A, Richner JM, Smith AM, Santeford A, Ban N, Weger-Lucarelli J, Manzella F, Ruckert C, Govero J, Noguchi KN, Ebel GD, Diamond MS, Apte RS. 2016. Zika Virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. *Cell Rep* 16:3208–3218. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.079>.
39. Naveca FG, Pontes GS, Chang AY-H, Villarouco da Silva GA, Alvos do Nascimento V, da Silva Monteiro DC, Da Silva MS, Abdalla LF, Santos JHA, Pires de Almeida TA, Mejía MDCC, Ramos de Mesquita TG, de Souza Encarnação HV, de Souza Gomes M, Amaral LR, Campi-Azevedo AC, Coelho-Dos-Reis JG, do Vale Antonelli LR, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Ramasawmy R. 2018. Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113:e170542. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170542>.
40. Bai F, Kong K-F, Dai J, Qian F, Zhang L, Brown CR, Fikrig E, Montgomery RR. 2010. A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J Infect Dis* 202:1804–1812. <https://doi.org/10.1086/657416>.
41. Paul AM, Acharya D, Duty L, Thompson EA, Le L, Stokic DS, Leis AA, Bai F. 2017. Osteopontin facilitates West Nile virus neuroinvasion via neutrophil “Trojan horse” transport. *Sci Rep* 7:4722. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04839-7>.
42. Jurado KA, Iwasaki A. 2017. Zika virus targets blood monocytes. *Nat Microbiol* 2:1460–1461. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0049-7>.
43. de Carvalho GC, Borget M, Bernier S, Garneau D, da Silva Duarte AJ, Dumais N. 2019. RAGE and CCR7 mediate the transmigration of Zika-infected monocytes through the blood-brain barrier. *Immunobiology* 224:792–803. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.08.007>.
44. Bramley JC, Drummond CG, Lennemann NJ, Good CA, Kim KS, Coyne CB. 2017. A three-dimensional cell culture system to model RNA virus infections at the blood-brain barrier. *mSphere* 2:e00206-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00206-17>.
45. Soe HJ, Khan AM, Manikam R, Samudi Raju C, Vanhoutte P, Sekaran SD. 2017. High dengue virus load differentially modulates human microvascular endothelial barrier function during early infection. *J Gen Virol* 98:2993–3007. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000981>.
46. Patabendige A, Michael BD, Craig AG, Solomon T. 2018. Brain microvascular endothelial-astrocyte cell responses following Japanese encephalitis virus infection in an *in vitro* human blood-brain barrier model. *Mol Cell Neurosci* 89:60–70. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.04.002>.
47. Wang K, Wang H, Lou W, Ma L, Li Y, Zhang N, Wang C, Li F, Awais M, Cao S, She R, Fu ZF, Cui M. 2018. IP-10 promotes blood-brain barrier damage by inducing tumor necrosis factor alpha production in Japanese encephalitis. *Front Immunol* 9:1148. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01148>.
48. Erickson MA, Banks WA. 2018. Neuroimmune axes of the blood–brain barriers and blood–brain interfaces: bases for physiological regulation, disease states, and pharmacological interventions. *Pharmacol Rev* 70:278–314. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014647>.
49. Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelhä M, Rösner J, Schneider UC, Vajkoczy P. 2018. Interleukin 6-mediated endothelial barrier disturbances can be attenuated by blockade of the IL6 receptor expressed in brain microvascular endothelial cells. *Transl Stroke Res* 9:631–642. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0614-2>.
50. Verma S, Lo Y, Chapagain M, Lum S, Kumar M, Gurjav U, Luo H, Nakatsuka A, Nerurkar VR. 2009. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: transmigration across the *in vitro* blood-brain barrier. *Virology* 385:425–433. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.047>.
51. Mehta R, Soares CN, Medialdea-Carrera R, Ellul M, da Silva MTT, Rosala-Hallas A, Jardim MR, Burnside G, Pamplona L, Bhojak M, Manohar R, da Silva GAM, Adriano MV, Brasil P, Nogueira RMR, Dos Santos CC, Turtle L, de Sequeira PC, Brown DW, Griffiths MJ, de Filippis AMB, Solomon T. 2018. The spectrum of neurological disease associated with Zika and chikungunya viruses in adults in Rio de Janeiro, Brazil: a case series. *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006212. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006212>.

52. Henriques-Souza A, de Azevedo Marques ET, Antunes de Brito CA, Brito Ferreira ML, de Moraes Machado MÍ, Pena LJ, Cordeiro MT, Moreira Á. 2017. Guillain-Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: detection of viral RNA and isolation of virus during late infection. *Am J Trop Med Hyg* 97:1405–1409. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0106>.
53. Jackson S, Meeks C, Vézina A, Robey RW, Tanner K, Gottesman MM. 2019. Model systems for studying the blood-brain barrier: applications and challenges. *Biomaterials* 214:119217. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.028>.
54. Persidsky Y, Stins M, Way D, Witte MH, Weinand M, Kim KS, Bock P, Gendelman HE, Fiala M. 1997. A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis. *J Immunol* 158:3499–3510.
55. Subileau EA, Rezaie P, Davies HA, Colyer FM, Greenwood J, Male DK, Romero IA. 2009. Expression of chemokines and their receptors by human brain endothelium: implications for multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:227–240. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318197eca7>.
56. Chai Q, She R, Huang Y, Fu ZF. 2015. Expression of neuronal CXCL10 induced by rabies virus infection initiates infiltration of inflammatory cells, production of chemokines and cytokines, and enhancement of blood-brain barrier permeability. *J Virol* 89:870–876. <https://doi.org/10.1128/JVI.02154-14>.
57. Liu KK, Dorovini-Zis K. 2012. Differential regulation of CD4<sup>+</sup> T cell adhesion to cerebral microvascular endothelium by the  $\beta$ -chemokines CCL2 and CCL3. *Int J Mol Sci* 13:16119–16140. <https://doi.org/10.3390/ijms131216119>.
58. Ubogu EE, Callahan MK, Tucky BH, Ransohoff RM. 2006. Determinants of CCL5-driven mononuclear cell migration across the blood–brain barrier. Implications for therapeutically modulating neuroinflammation. *J Neuroimmunol* 179:132–144. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.06.004>.
59. Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. 2011. Leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:24–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01140.x>.
60. Engelhardt B, Ransohoff RM. 2012. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 33:579–589. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.004>.
61. Steiner O, Coisne C, Cecchelli R, Boscacci R, Deutsch U, Engelhardt B, Lyck R. 2010. Differential roles for endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in shear-resistant T cell arrest, polarization, and directed crawling on blood–brain barrier endothelium. *J Immunol* 185:4846–4855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903732>.
62. Dietrich J-B. 2002. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood–brain barrier. *J Neuroimmunol* 128:58–68. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00114-5).
63. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Engelhardt B. 2005. Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol* 109:181–190. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0928-x>.
64. Abadier M, Haghayegh Jahromi N, Cardoso Alves L, Boscacci R, Vestwber D, Barnum S, Deutsch U, Engelhardt B, Lyck R. 2015. Cell surface levels of endothelial ICAM-1 influence the transcellular or paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier. *Eur J Immunol* 45:1043–1058. <https://doi.org/10.1002/eji.201445125>.
65. Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J. 1998. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol* 90:19–73. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)91294-2](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)91294-2).
66. Ayala-Nunez NV, Follain G, Delalande F, Hirschler A, Partiot E, Hale GL, Bollweg BC, Roels J, Chazal M, Bakoa F, Carocci M, Bourdoulous S, Faklaris O, Zaki SR, Eckly A, Uring-Lambert B, Doussau F, Cianferani S, Carapito C, Jacobs FMJ, Jouvenet N, Goetz JG, Gaudin R. 2019. Zika virus enhances monocyte adhesion and transmigration favoring viral dissemination to neural cells. *Nat Commun* 10:4430. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12408-x>.
67. Dai J, Wang P, Bai F, Town T, Fikrig E. 2008. ICAM-1 participates in the entry of West Nile virus into the central nervous system. *J Virol* 82:4164–4168. <https://doi.org/10.1128/JVI.02621-07>.
68. Kelley JF, Kaufusi PH, Nerurkar VR. 2012. Dengue hemorrhagic fever-associated immunomodulators induced via maturation of dengue virus nonstructural 4B protein in monocytes modulate endothelial cell adhesion molecules and human microvascular endothelial cells permeability. *Virology* 422:326–337. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.030>.
69. Ferreira E Fonseca ICC, Cordero da Luz FA, Uehara IA, Silva MJB. 2018. Cell-adhesion molecules and their soluble forms: promising predictors of “tumor progression” and relapse in leukemia. *Tumor Biol* 40:1010428318811525. <https://doi.org/10.1177/1010428318811525>.
70. Rieckmann P, Altenhofen B, Riegel A, Baudewig J, Felgenhauer K. 1997. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1 and sICAM-1) in cerebrospinal fluid and serum correlate with MRI activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 41:326–333. <https://doi.org/10.1002/ana.410410307>.
71. Perner C, Perner F, Gaur N, Zimmermann S, Witte OW, Heidel FH, Grosskreutz J, Prell T. 2019. Plasma VCAM1 levels correlate with disease severity in Parkinson’s disease. *J Neuroinflammation* 16:94. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1482-8>.
72. Liao B, Tang Y, Hu F, Zhou W, Yao X, Hong W, Wang J, Zhang X, Tang X, Zhang F. 2015. Serum levels of soluble vascular cell adhesion molecules may correlate with the severity of dengue virus-1 infection in adults. *Emerg Microbes Infect* 4:e24. <https://doi.org/10.1038/emi.2015.24>.
73. Rudziak P, Ellis CG, Kowalewska PM. 2019. Role and molecular mechanisms of pericytes in regulation of leukocyte diapedesis in inflamed tissues. *Mediators Inflamm* 2019:4123605–4123609. <https://doi.org/10.1155/2019/4123605>.
74. Nakagawa S, Castro V, Toborek M. 2012. Infection of human pericytes by HIV-1 disrupts the integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Mol Med* 16:2950–2957. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01622.x>.
75. Chen C-J, Ou Y-C, Li J-R, Chang C-Y, Pan H-C, Lai C-Y, Liao S-L, Raung S-L, Chang C-J. 2014. Infection of pericytes *in vitro* by Japanese encephalitis virus disrupts the integrity of the endothelial barrier. *J Virol* 88:1150–1161. <https://doi.org/10.1128/JVI.02738-13>.
76. Roach T, Alcendor DJ. 2017. Zika virus infection of cellular components of the blood-retinal barriers: implications for viral associated congenital ocular disease. *J Neuroinflammation* 14:43. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0824-7>.
77. Singh S, Farr D, Kumar A. 2018. Ocular manifestations of emerging flaviviruses and the blood-retinal barrier. *Viruses* 10:530. <https://doi.org/10.3390/v10100530>.
78. Liu TH, Liang LC, Wang CC, Liu HC, Chen WJ. 2008. The blood-brain barrier in the cerebrum is the initial site for the Japanese encephalitis virus entering the central nervous system. *J Neurovirol* 14:514–521. <https://doi.org/10.1080/13550280802339643>.
79. Morrison TE, Diamond MS. 2017. Animal models of Zika virus infection, pathogenesis, and immunity. *J Virol* 91:242–252. <https://doi.org/10.1128/JVI.00009-17>.
80. Daniels BP, Holman DW, Cruz-Orengo L, Jujvarapu H, Durrant DM, Klein RS. 2014. Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *mBio* 5:e01476-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01476-14>.
81. Berry N, Ferguson D, Ham C, Hall J, Jenkins A, Giles E, Devshi D, Kempster S, Rose N, Dowall S, Fritzsche M, Bleazard T, Hewson R, Almond N. 2019. High susceptibility, viral dynamics and persistence of South American Zika virus in New World monkey species. *Sci Rep* 9:14495. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50918-2>.
82. Beaver JT, Lelutiu N, Habib R, Skountzou I. 2018. Evolution of two major Zika virus lineages: implications for pathology, immune response, and vaccine development. *Front Immunol* 9:1640. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01640>.
83. Li G, Bos S, Tsetsarkin KA, Pletnev AG, Desprès P, Gadea G, Zhao RY, Li G, Bos S, Tsetsarkin KA, Pletnev AG, Desprès P, Gadea G, Zhao RY. 2019. The roles of prM-E proteins in historical and epidemic Zika virus-mediated infection and neurocytotoxicity. *Viruses* 11:157. <https://doi.org/10.3390/v11020157>.
84. Kärber G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch für. Archiv f Experiment Pathol u Pharmakol* 162:480–483. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>.
85. Pedroso DCS, Tellechea A, Moura L, Fidalgo-Carvalho I, Duarte J, Carvalho E, Ferreira L. 2011. Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. *PLoS One* 6:e16114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016114>.
86. Hwang SY, Hertzog PJ, Holland KA, Sumarsono SH, Tymms MJ, Hamilton JA, Whitty G, Bertoncello I, Kola I. 1995. A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11284–11288. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11284>.

## **b. Conclusion**

Nous avons décrit ici, pour le ZIKV, un mécanisme d'accès au SNC et ses effets sur l'homéostasie de la BHE. Nos observations suggèrent que l'infection des cellules endothéliales par le ZIKV permet une réplication virale au sein des cellules et une libération des particules virales dans le compartiment cérébral. La modulation des protéines de surface telles que les CAM, des modulateurs d'acteurs de jonctions ainsi que la sécrétion de certaines chimiokines et molécules inflammatoires, pourraient aider à recruter les leucocytes (**figure 41**). Cet environnement favoriserait l'engagement des leucocytes dans l'étape de diapédèse, leur permettant d'infiltrer davantage le SNC, favorisant ainsi la neuroinflammation. Pour finir, les péricytes et les astrocytes, connus comme médiateurs de la neuroinflammation, pourraient eux aussi être infectés et soutenir cet état inflammatoire dans des zones locales de la BHE.



**Figure 41. Schéma récapitulatif de nos résultats obtenus avec le virus Zika.**

## 2. Article II

### ***Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models***

#### **a. But de l'étude**

Bien que principalement asymptomatique ou responsable de signes cliniques légers, l'USUV a récemment été décrit comme étant associé à des troubles neurologiques chez l'Homme tels que des encéphalites et des méningo-encéphalites, ce qui met en évidence la menace potentielle que représente ce virus. Malgré cela, la pathogénèse d'USUV reste largement inexplorée.

Cette étude avait pour but de mieux caractériser la neuropathogénèse d'USUV à l'aide de modèles murins et de modèles cellulaires humains. Chez les souris adultes *ifnar<sup>-/-</sup>* et chez les souris swiss âgées d'une semaine, nous avons observé que l'infection d'USUV entraîne une perte de poids, des troubles moteurs et une mortalité. L'USUV infecte efficacement le SNC (cerveau, moelle épinière et œil) des modèles murins en association avec une infiltration massive des cellules immunitaires et une forte induction de cytokines pro-inflammatoires. Dans le modèle *in vitro* de BHE, nous avons observé qu'USUV peut infecter les cellules endothéliales, que celles-ci peuvent libérer des cytokines et chimokines inflammatoires sans altérer l'intégrité de la BHE. Suite à l'infection d'USUV chez les souris, nous avons observé des problèmes oculaires drastiques associés à une forte réponse inflammatoire. Pour ces raisons, nous nous sommes ensuite intéressés à un modèle *in vitro* d'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) humain. Nous avons utilisé un RPE dérivé de cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC) morphologiquement et fonctionnellement caractéristique du RPE *in vivo*<sup>557</sup>. La monocouche de RPE dérivée des iPSC est un pavé pigmenté polarisé qui exprime des marqueurs RPE spécifiques et des protéines de jonctions serrées (par exemple, ZO-1) et qui est pleinement fonctionnel en terme de phagocytose et de transport du liquide apicobasal. Il représente donc un modèle puissant pour l'étude de la physiopathologie du RPE. Dans ce modèle, nous avons observé qu'USUV infectait, répliquait et induisait des cytokines inflammatoires mais ne perturbait pas l'intégrité de cet épithélium.

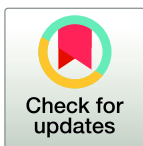
## RESEARCH ARTICLE

## Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models

Marion Clé<sup>1</sup>, Jonathan Barthelemy<sup>1</sup>, Caroline Desmetz<sup>2</sup>, Vincent Foulongne<sup>1</sup>, Lina Lapeyre<sup>1</sup>, Karine Bolloré<sup>1</sup>, Edouard Tuaillon<sup>1</sup>, Nejla Erkilic<sup>3</sup>, Vasiliki Kalatzis<sup>3</sup>, Sylvie Lecollinet<sup>4</sup>, Cécile Beck<sup>4</sup>, Nelly Pirot<sup>5,6</sup>, Yaël Glasson<sup>5,6</sup>, Fabien Gosselet<sup>7</sup>, Maria Teresa Alvarez Martinez<sup>8</sup>, Philippe Van de Perre<sup>1,9</sup>, Sara Salinas<sup>1</sup>, Yannick Simonin<sup>1\*</sup>

**1** Pathogenesis and Control of Chronic Infections, University of Montpellier, INSERM, EFS, Montpellier, France, **2** BioCommunication en CardioMétabolique (BC2M), University of Montpellier, Montpellier, France, **3** Inserm U1051, Institute for Neurosciences of Montpellier. University of Montpellier, Montpellier, France, **4** UPE, Anses Animal Health Laboratory, INRA, Anses, ENVA, Maisons-Alfort, France, **5** BCM, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France, **6** IRCM, University of Montpellier, ICM INSERM, Montpellier, France, **7** University of Artois, Blood-Brain Barrier Laboratory (BBB Lab), France, **8** RAM-ECE, BioCampus Montpellier, CNRS, INSERM, University of Montpellier, Montpellier France, **9** Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France

\* [yannick.simonin@umontpellier.fr](mailto:yannick.simonin@umontpellier.fr)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Clé M, Barthelemy J, Desmetz C, Foulongne V, Lapeyre L, Bolloré K, et al. (2020) Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models. PLoS Negl Trop Dis 14 (4): e0008223. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008223>

**Editor:** Eric Mossel, Center for Disease Control and Prevention, UNITED STATES

**Received:** December 6, 2019

**Accepted:** March 16, 2020

**Published:** April 23, 2020

**Copyright:** © 2020 Clé et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was funded by REACTing (reference: YY/FC/2018-032) and Montpellier University of Excellence (MUSE) through ANR (the French National Research Agency) under the "Investissements d'avenir" programme with the reference ANR-16-IDEX-0006. The funders had no role in study design, data collection and analysis,

## Abstract

Usutu virus (USUV), an African mosquito-borne flavivirus closely related to West Nile virus, was first isolated in South Africa in 1959. USUV emerged in Europe two decades ago, causing notably massive mortality in Eurasian blackbirds. USUV is attracting increasing attention due to its potential for emergence and its rapid spread in Europe in recent years. Although mainly asymptomatic or responsible for mild clinical signs, USUV was recently described as being associated with neurological disorders in humans such as encephalitis and meningo-encephalitis, highlighting the potential health threat posed by the virus. Despite this, USUV pathogenesis remains largely unexplored. The aim of this study was to evaluate USUV neuropathogenicity using *in vivo* and *in vitro* approaches. Our results indicate that USUV efficiently replicates in the murine central nervous system. Replication in the spinal cord and brain is associated with recruitment of inflammatory cells and the release of inflammatory molecules as well as induction of antiviral-responses without major modulation of blood-brain barrier integrity. Endothelial cells integrity is also maintained in a human model of the blood-brain barrier despite USUV replication and release of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, USUV-inoculated mice developed major ocular defects associated with inflammation. Moreover, USUV efficiently replicates in human retinal pigment epithelium. Our results will help to better characterize the physiopathology related to USUV infection in order to anticipate the potential threat of USUV emergence.

## Author summary

Number of emerging arboviruses involved in human infections has increased considerably in the past years. Among them, Usutu virus (USUV) is an African mosquito-borne

decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

virus first isolated in South Africa that recently emerged. USUV infection in humans is considered to be most often asymptomatic or to cause mild clinical signs. Nonetheless, increased cases of neurological complications such as encephalitis or meningoencephalitis have been reported in Europe but the mechanisms behind this neuropathogenesis remain largely unclear. In this study we showed that USUV can infect efficiently several organs and cells of the central nervous system associated with a drastic inflammation and various deleterious effects. Our results contribute to the characterization of the neurotropism related to USUV infection.

## Introduction

Among emerging viruses, Usutu virus (USUV) has recently attracted the attention of the scientific community due to its extensive spread in Europe, which has grown in recent years. USUV is an African mosquito-borne virus that was first identified in 1959 in South Africa [1]. Like West Nile virus (WNV), with which it shares many common features, it belongs to the Japanese encephalitis (JEV) serocomplex in the *Flavivirus* genus (*Flaviviridae* family) [2,3]. USUV is an enveloped virus of approximately 40–60 nm in diameter. Its genome is a single-stranded RNA of positive polarity comprised of 11,064 nucleotides harboring a 5' N7-methylguanosine-triphosphate cap but lacking a polyA tail at the 3' end [4]. The genome has a single open reading frame coding for a polyprotein of 3,434 amino acids that, after cleavage, gives rise to three structural proteins (capsid C, premembrane prM, and envelope E) and eight non-structural proteins (NS1/NS1', NS2a, NS2b, NS3, NS4a, 2K, NS4b, and NS5) [2]. Phylogenetic studies have shown that USUV strains can be divided into 8 lineages: 3 African and 5 European [5]. The originally isolated USUV strain SAAR 1776 belongs to African 2 lineage that has been known to be circulating in Europe for several years and was recently identified in a clinical case of a *frigore* facial paralysis in France [6,7]. Phylogenetic analyses suggest that at least three USUV introductions have occurred in Europe along the bird migratory routes from Africa [6]. The natural life cycle of USUV is very similar to that of WNV. The virus is maintained through an enzootic cycle involving mainly birds of the orders Passeriformes and Strigiformes as amplifying hosts and ornithophilic mosquitoes, like the common *Culex pipens* which is widespread in Europe, as vectors [8]. Major central nervous system (CNS) disorders such as prostration, disorientation, and ataxia have been reported in USUV-infected birds, leading to death. Necrotic areas and inflammatory infiltrates composed of lymphoid and histiocytic cells also have been reported in the brain of infected birds [9]. Mammals, including wild boars, were described as accidental or dead-end hosts [10–12]. USUV has also been detected in bats and in different rodents and shrew species, suggesting the possibility of the existence of non-avian reservoirs [13,14]. Up to 2015, USUV infection has been reported in mosquitoes, birds, and horses in a dozen of European countries. During the summer of 2016, major USUV epizootics affecting avifauna were evidenced in Northern Europe, and in 2018, USUV spread rapidly in Western Europe, associated with a large WNV epidemic [8,15–18].

In humans, USUV infection was first described in Africa (Central African Republic and Burkina Faso in 1981 and 2004, respectively), with mild clinical signs such as fever and skin rash reported [12]. In Europe, the recent epizootics were also accompanied by several descriptions of human neurological disorders, including facial paralysis, encephalitis, meningitis and meningoencephalitis, in immunocompromised and immunocompetent patients, representing to date around 30 cases [7,18–25]. Moreover, molecular and serologic evidence of USUV infection in Italian, German, Austrian and Dutch blood donors indicates that the virus is also circulating silently among asymptomatic humans in Europe and could potentially be a concern

for blood transfusions [26–29]. Very little is known about USUV pathogenicity. USUV, like many flaviviruses, is neurotropic. It can infect murine and human neuronal cells *in vitro*, leading to apoptosis or proliferation arrest [30]. Adult wild mice do not appear susceptible to USUV infection [10]. In contrast, mice lacking the interferon type 1 receptor (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>) were highly sensitive to USUV neuroinvasive infection, as has been described for other flaviviruses [31]. Experimental infections of one-week-old immunocompetent-Swiss and *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mice by intraperitoneal injection reproduced neurological signs such as depression, paraplegia, paralysis and coma [10,32].

In this study, we attempted to better characterize USUV neuropathogenicity using mice and human cellular models. We demonstrated that USUV efficiently replicates in the spinal cord and brain of mice associated with infiltration of immune cells and strong induction of pro-inflammatory cytokines. We also showed that USUV can infect a human model of the blood-brain barrier (BBB) without altering its integrity. Moreover, USUV-inoculated mice developed drastic ocular defects. To study the ability of USUV to replicate in the human retina, we infected confluent induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) cultured on transwell filters [33]. We observed USUV replication and cytokine induction that was not associated with a loss of epithelium integrity.

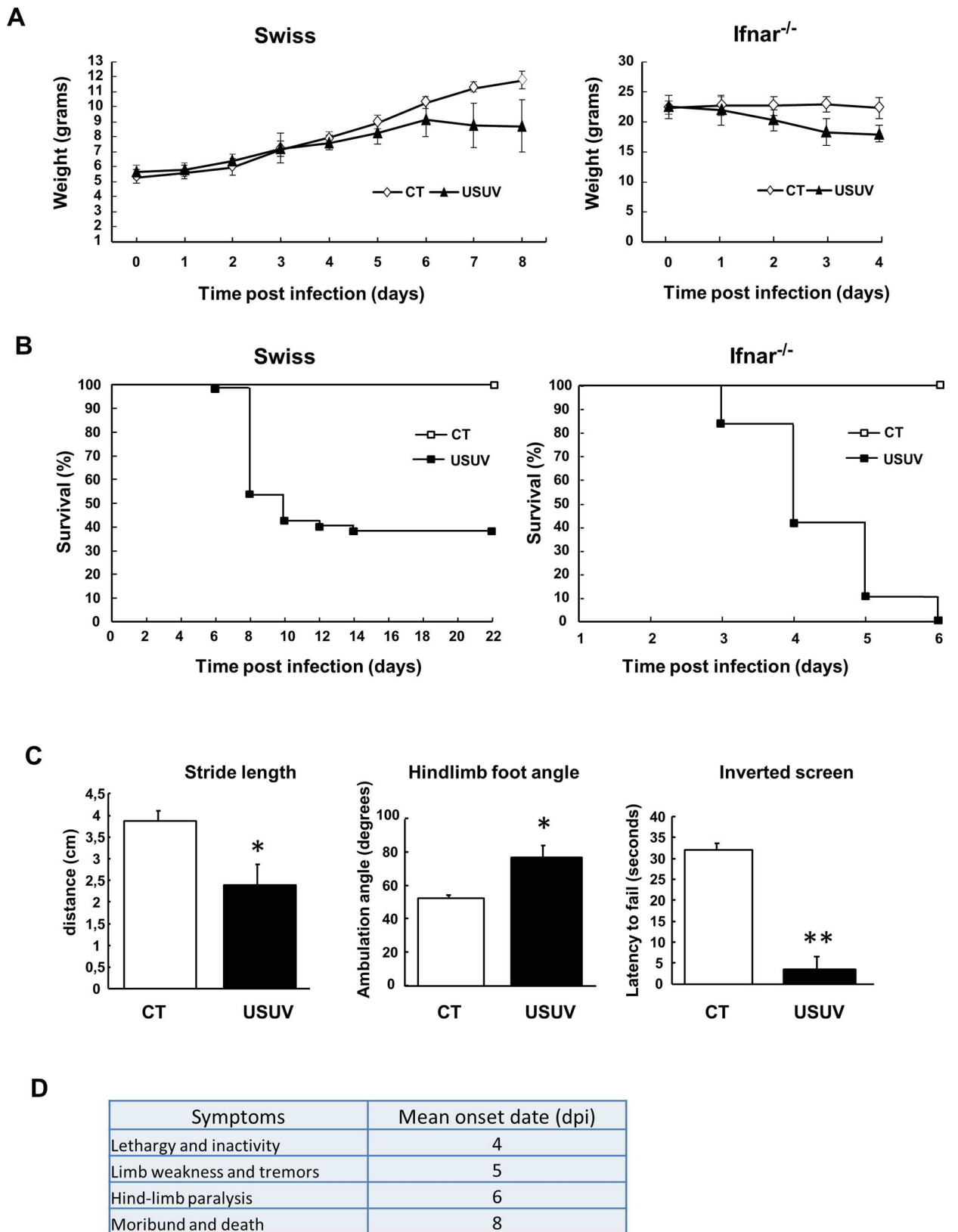
## Results

### USUV induces weight loss, motor impairment and mortality in mice

To better characterize USUV neuroinvasiveness, we first assessed the susceptibility of mice to USUV infection. Many *Flaviviruses*, such as dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV), classically do not effectively infect immunocompetent mice, likely due to an absence of species-specific immune evasion mechanisms [34,35]. For example, NS5 protein from ZIKV antagonizes human but not mouse STAT2, which transmits signals downstream of IFNAR1, a component of the type I IFN receptor [36]. To overcome this limitation, it is necessary to use either mice deficient in the interferon receptor (*Ifnar*<sup>-/-</sup>) gene or immunocompetent neonatal mice [34]. Previous reports of USUV-associated neuropathology in mice have shown that these animal models are pertinent to study USUV neuropathogenicity [31,32]. *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice (12 weeks old) and suckling immunocompetent Swiss mice (6 days old) were intraperitoneally (i.p.) inoculated and weight loss and motor defects were monitored until the end of the experiment. Infected animals progressively lost weight or failed to gain weight in both mice models (Fig 1A). In infected mice, the first signs (lethargy and inactivity) appeared 4 days post infection (dpi) and mean time to death was 8 dpi (Fig 1B–1D). All infected *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice died 6 dpi whereas suckling mice had 60% mortality at 14 dpi in accordance with a previous study (Fig 1B) [10]. We subsequently decided to focus primarily on studying the effect of USUV in immunocompetent suckling mice. Motor functions were examined at 6 dpi in neonatal mice using basic established motoric tests. Footprint assays, used to determine gait ataxia, showed characteristics of gait abnormalities in infected mice, such as a reduced stride length and increased hindlimb foot angle (Fig 1C). Endurance strength, measured through an inverted screen test, was significantly impaired in symptomatic USUV mice (around 60%), which exhibited significantly shorter latency to fall (Fig 1C). These results show that drastic motor dysfunction in USUV-infected mice appears quickly after infection.

### USUV replicates in multiple organs and tissues of the infected neonates but mainly in the nervous system

To better characterize USUV tropism, mice were dissected following euthanasia to isolate several organs and tissues. RT-qPCR targeting the NS5 gene of USUV was performed to quantify





**Fig 1. Pathogenic manifestations of USUV infection in suckling immunocompetent and *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Weight tracking and (B) survival rates of neonatal Swiss mice (6 days old) and *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice (80 days old) intraperitoneally inoculated with 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/mouse of USUV. CT = control mice. Infection by USUV is lethal at 60% for suckling Swiss mice and at 100% for *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice. Infected mice lose weight over time. (C) Left panel. Footprint assay of gait abnormalities in control and USUV-infected suckling mice. The stride length and hindlimb foot angle were measured using hind paws marked with blue ink. USUV-inoculated animals have a greater foot angle and a reduced stride length compared to non-infected mice, indicating motor defects. Right panel. Endurance measured by the inverted screen test shows that infected mice exhibited significantly shorter latency to fall. (D) Signs, morbidity rate, and onset date of USUV-infected suckling mice. Lethargy appears around 4 dpi and mice die on average at 8 days. Mice were monitored daily until clinical signs of disease were displayed and then were euthanized. n = 20 for each group. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

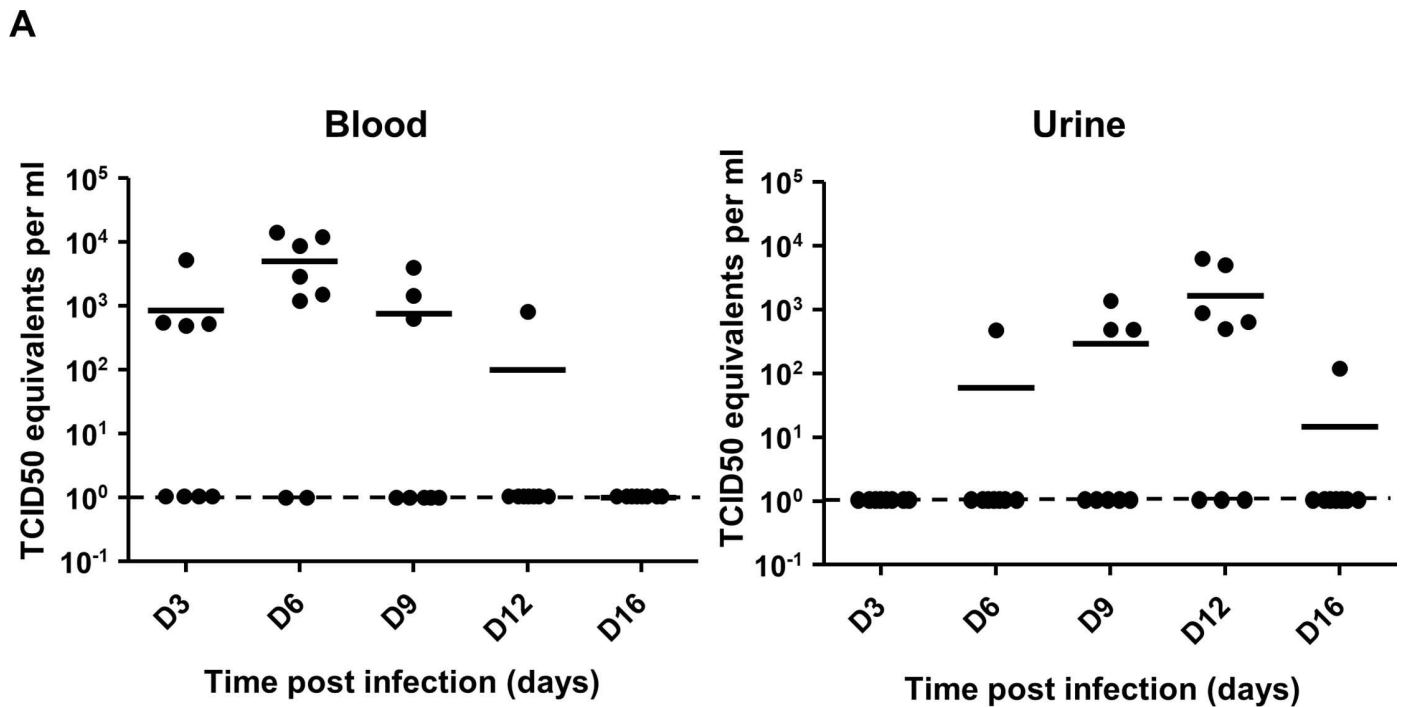
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008223.g001>

viral genome of USUV-infected mice as compared with the PBS-treated mice [37]. First, viral load was determined in blood and urine. Interestingly, viral RNA appears earlier in blood (3 dpi) than in urine (6 dpi) but also disappears earlier as described for several other flavivirus (Fig 2A). The late presentation of the viral RNA in the urine, which is predominantly detected at 12 dpi, suggests that urination could be a route for the excretion of the virus. Viral genome was then identified by RT-qPCR at 6 dpi in all other tested tissues: liver, spleen, hindlimb muscle, kidney, and bladder (Fig 2B). Interestingly, the highest amounts of viral genome were detected in nervous tissues such as eyes (including optic nerve), brain, spinal cord and sciatic nerves (Fig 2B, black bars).

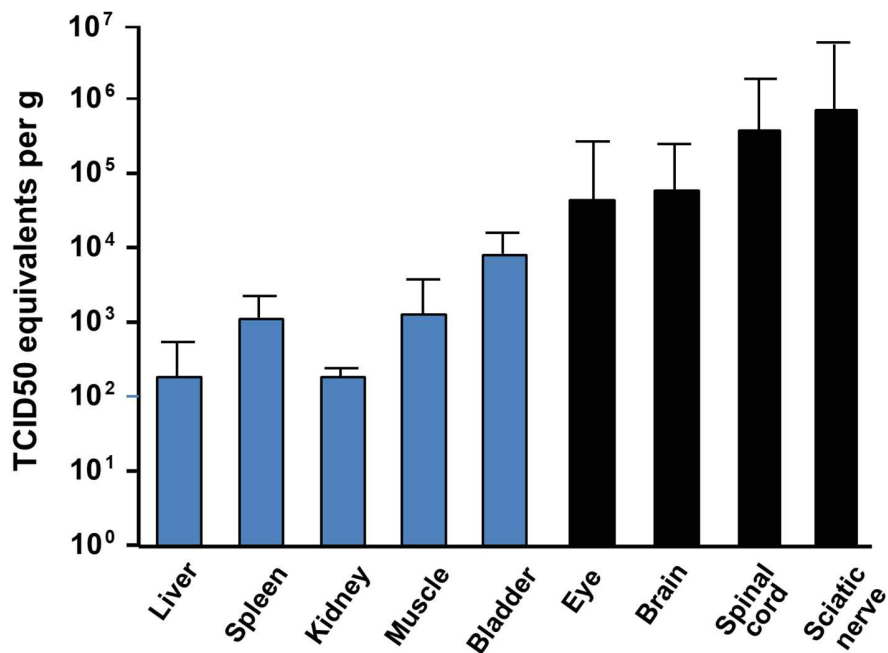
Therefore, our results suggest that USUV infects and replicates in various tissues and organs, with a greater tropism for the central and peripheral nervous system.

### USUV induces massive brain inflammation

As suggested by previous studies, as well as our RT-qPCR results (Fig 2B) and the signs observed in mice (such as limb weakness and hind-limb paralysis), USUV replicates and damages CNS tissues to cause functional abnormalities [10,32]. To better characterize the profile of brain infection, we performed immunofluorescence and immunohistochemistry (IHC) assay in different areas of the CNS in 12-day-old mice (6 dpi). First, brain sections were stained by HES (hematoxylin eosin saffron) to analyze the general histomorphology. We observed massive infiltrating cells (corresponding to 28% of total cells), cell shrinkage and some cells (6,2%) with nuclear condensation associated with caspase 3 staining, suggesting a limited apoptotic process (Fig 3A and 3B). Massive inflammatory infiltrates in multiple areas of the brain, mainly in striatum and thalamus, were highlighted by CD45 staining which recognize all lymphoid cells (Fig 3C and 3D). USUV-staining showed direct infection of the brain that is not correlated with the distribution of inflammatory cells (Fig 3E). Among these inflammatory cells, we detected infiltration of T cells (CD3 staining), macrophage infiltration (F4/F80 staining), but no significant B cell infiltration (PAX 5 staining) (Fig 4A, S1 Fig). Activated microglia are a major source of cytokines/chemokines induction within the inflamed brain. To determine if USUV replication and cell death induction correlated with microglia cell recruitment/activation, we stained brain sections for Iba1 (Ionized calcium binding adapter molecule 1), which is upregulated in activated microglia cells. We observed an increase in Iba1 staining in the brains of diseased mice as compared to control mice (Fig 4B). To determine whether this recruitment of inflammatory cells is correlated with overexpression of inflammatory cytokines and induction of anti-viral responses, we used a PCR array to analyze inflammatory cytokines and receptors (Fig 4C) [38]. The gene expression of some key cytokines and chemokines appeared to be strongly increased in USUV-infected brains. Notably, we observed upregulated mRNA expression levels of components of interferon (IFN) signaling such as *IFNβ*, but also interferon regulatory transcription factor (IRF) family such as *IRF5* and *IRF7*, *IFIH1* (interferon induced with helicase C domain 1) and several interferon-stimulated genes (ISGs): *OAS2* (2'-5'-oligoadenylate synthetase 2), *MX1* (MX dynamin-like GTPase 1) and *ISG15*



**B**



**Fig 2. USUV infects multiple organs of neonatal mice but target mainly the CNS.** 6-day-old Swiss mice were infected intraperitoneally with USUV at  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mouse. Viral burden was measured by RT-qPCR assay and indicated by TCID<sub>50</sub> equivalent per gram. (A) Viral burden in blood and urine at several times post injection. Viral RNA appears earlier in blood (3 dpi) than in urine (6 dpi) and disappears earlier. (B) Viral burden in several organs including CNS at 6 dpi. Viral genome was detected in liver, spleen, hindlimb muscle, kidney, and bladder. The higher amount of viral genome was identified in nervous tissues (black bars). Lower limit of detection is of 50 TCID<sub>50</sub> equivalent per gram or per ml.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008223.g002>

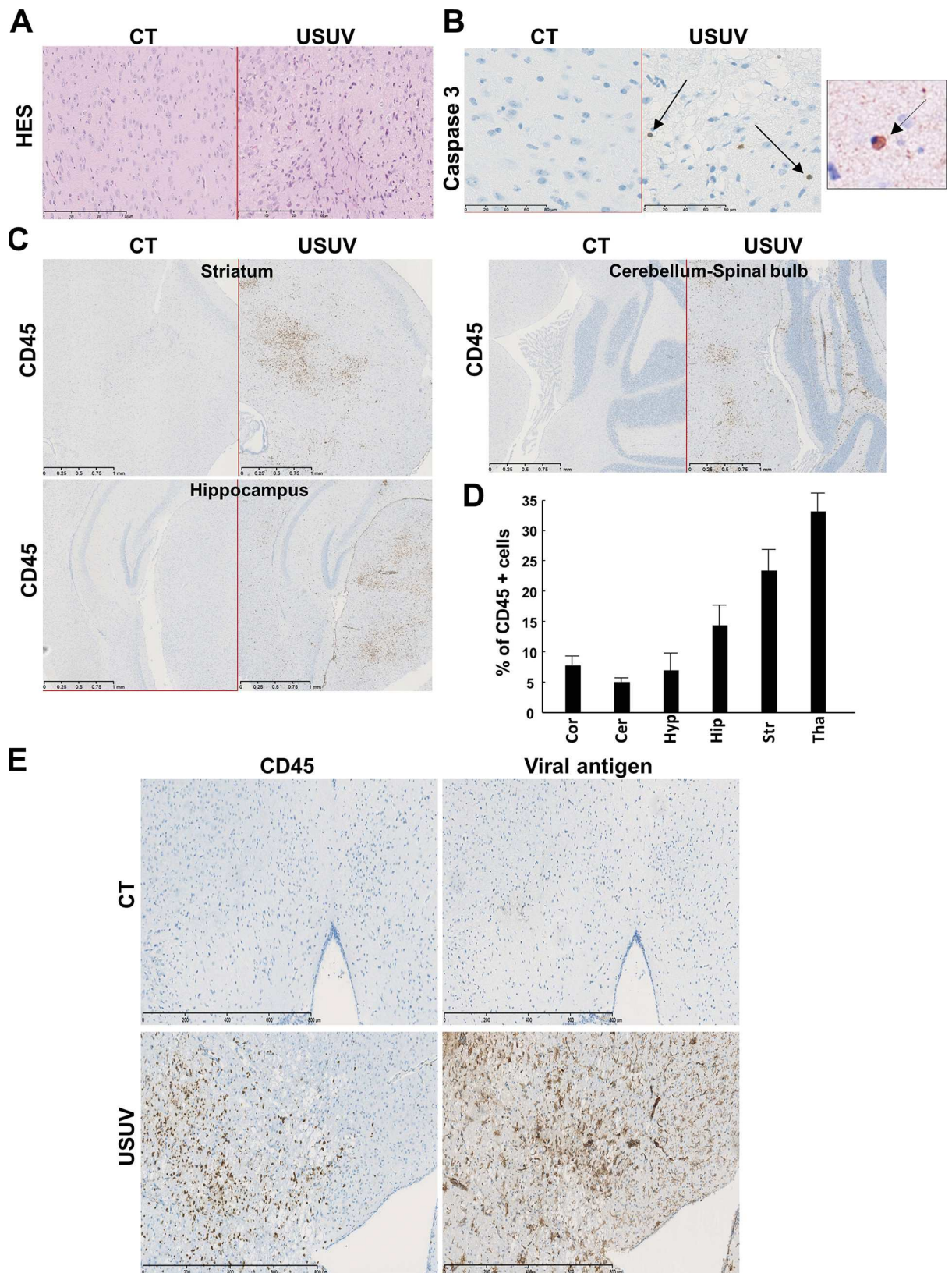
(Interferon stimulated gene 15). It is notable that the main components of inflammasome, such as *NLRP3* (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), *IL-1 $\beta$*  (interleukine 1 beta), *AIM2* (Absent In Melanoma 2), *CASP1* (caspase 1), *CASP8* (caspase 8) and *PYCARD*, are also overexpressed in USUV-infected mice. This suggests that this complex, involved in innate immunity, is activated following USUV infection as has been previously shown for other flaviviruses like WNV [39,40]. Several chemokines, such as *CXCL10*, *CXCL9* and *CCL5*, were also found highly upregulated in the brain of USUV-infected mice (Fig 4C). These cytokines are known to be increased within the CNS during arboviral encephalitis and are highly induced during JEV, WNV, TBEV (Tick borne encephalitis virus), SFV (Semliki Forest virus), and SINV (Sindbis virus) infection [41]. *CXCL10* has been reported to induce neuron apoptosis or direct damage in neuronal cells [42]. In our experiment, *CXCL10* mRNA is upregulated up to 1000 times the normal level in the brains of USUV-diseased mice (Fig 4C) and *CXCL10* protein level appears also up-regulated in infected mice (Fig 4D). Interestingly, *CCL5* protein was also found to be up-regulated in the blood of Swiss and *Ifnar*<sup>-/-</sup> USUV-infected mice (S2 Fig). Moreover, we observed the upregulation of one of the main inflammatory cytokines, *IL6*, and increased expression of *RIG-I* (DDX58), *LGP2* (DHX58) and *TLR3*, pattern-recognition receptors (PRRs) activated by viral dsRNA during viral replication (Fig 4C, S3 Fig) [43].

Numerous studies have shown that flaviviruses can reach the CNS by crossing the BBB, with or without barrier breakdown, using several pathways, including direct infection of brain microvascular endothelial cells, transcytosis or through infected-immune cells (Trojan-horse mechanism) [44]. To determine if USUV infection is associated with loss of BBB integrity, we infected adult mice (*Ifnar*<sup>-/-</sup>) that have fully formed BBB. After infection, animals were subjected to Evans blue (EB, a colorant used to monitor BBB integrity) by intraperitoneal-injection at 3 dpi (as we did not detect viral RNA in brain until 3 dpi) and 6 dpi. There was no blue labelling in brain suggesting no major BBB disturbance after USUV infection while other organs, like the liver, were blue (Fig 4E).

Altogether our observations suggest that USUV induces a strong antiviral-response in the CNS, which is associated with inflammation and highlighted by the recruitment of inflammatory cells and the mRNA upregulation of pro-inflammatory cytokines and chemokines as well as of inflammasome components.

### USUV replicates in brain-like endothelial cells of an *in vitro* human BBB model and upregulates inflammatory cytokines and chemokines

Our *in vivo* results suggest that USUV can cross the BBB without major barrier breakdown and may lead by this mechanism to encephalitis and/or meningoencephalitis *via* inflammatory response. Moreover, we previously shown that USUV, like for other flaviviruses, can infect human neuronal precursors and astrocytes, leading to death by apoptosis or arrest of proliferation, respectively [45]. As arbovirus infection in mice might be species-specific, we determined whether our observations had relevance to human tissues. To address this issue, we sought to determine whether USUV could directly infect the human BBB and perturb its integrity. We used an innovative human *in vitro* BBB model that recapitulates the main characteristics of the endothelial barrier observed *in vivo*. Briefly, CD34<sup>+</sup> cord blood-derived hematopoietic stem



**Fig 3. USUV induces apoptosis and cellular infiltration in the mouse brain.** (A) Transverse sections of the brain (thalamus) of USUV-infected and control (mock, PBS injected) mice at 6 dpi stained with haematoxylin/eosin/saffron. We observe cellular infiltration and cell shrinkage. CT = control mice. (B) Some cells present nuclear condensation and caspase 3 staining after immunohistochemistry, suggesting apoptotic process in USUV-infected mice. Right panel: zoom on apoptotic cell. Arrows indicate apoptotic cells. (C) Immunohistochemical CD45 staining (associated with luxol blue) showing massive inflammatory infiltrates in multiple areas of the infected brain. (D) Quantification of CD45 positive cells in different brain area. Cor: Cortex, Cer: Cerebellum, Hyp: Hypothalamus, Hip: Hippocampus, Str: Striatum, Tha: Thalamus. (E) Immunohistochemical staining of viral antigen and CD45. The majority of infected cells are not inflammatory cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008223.g003>

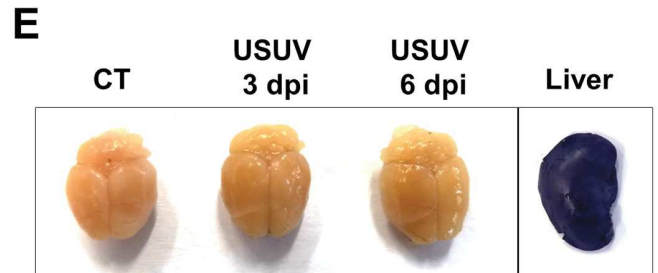
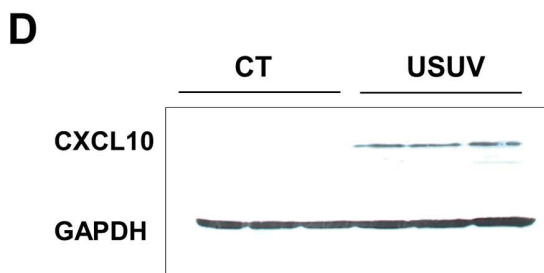
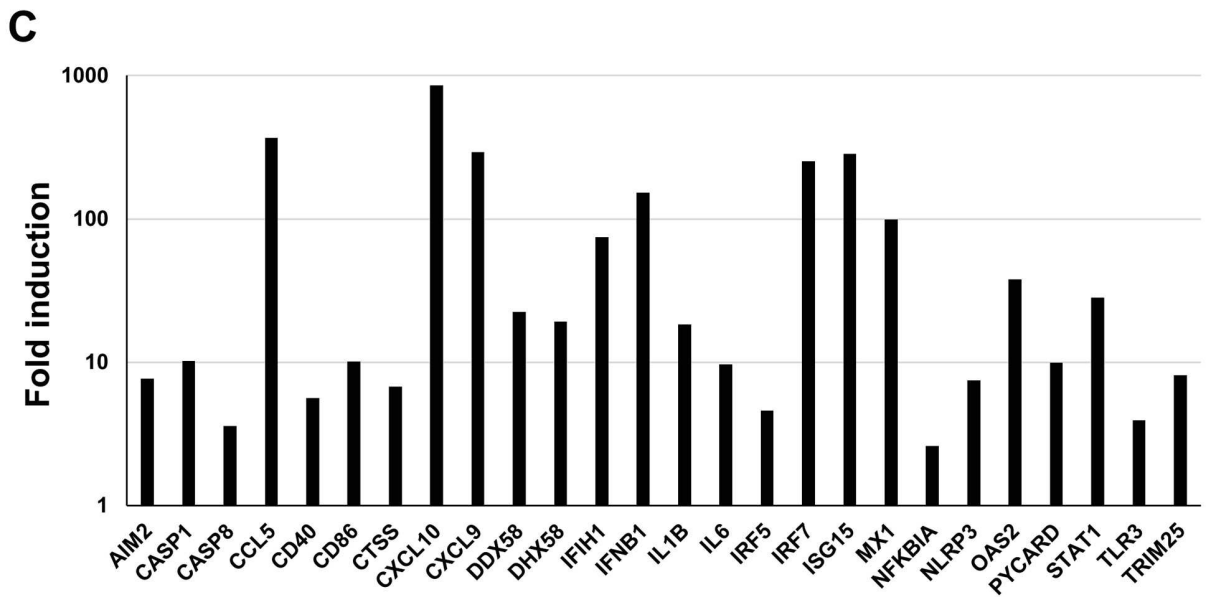
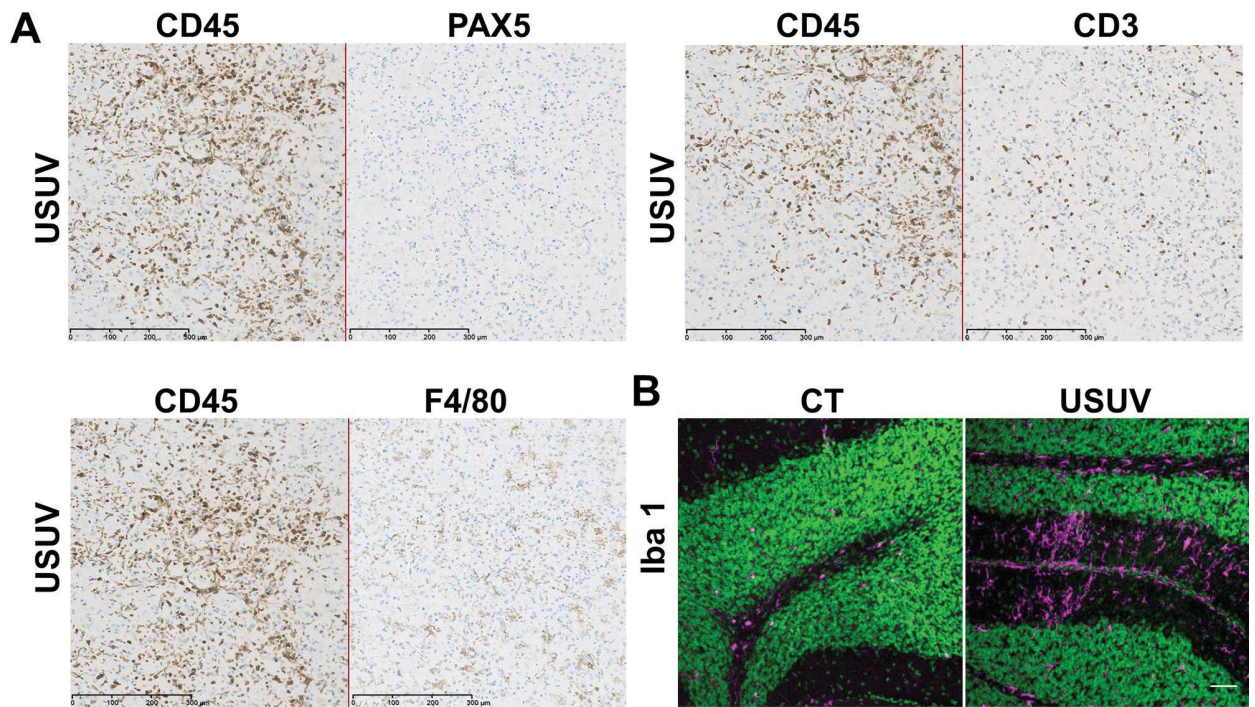
cells were allowed to differentiate on culture inserts in contact with pericytes for 6–7 days to acquire BBB characteristics (Fig 5A) [46]. These brain-like endothelial cells (hBLECs) express tight junctions and transporters typically observed in brain endothelium [46] and allow to study drugs or cells passage across the BBB [47,48]. hBLECs were infected by USUV on the apical side at the multiplicity of infection (MOI) of 0.1. At 4, 7 and 10 dpi supernatants were collected in the apical and basolateral sides and cells were fixed to analyze endothelium integrity. Viral replication was determined by tissue culture infective dose 50% (TCID<sub>50</sub>). Fig 5B shows viral titers in apical sides (corresponding to blood vessel lumens) at 4 dpi and to a lesser extent at 7 dpi (corresponding to the production between 4 to 7 days, as medium need to be changed at 4 dpi), whereas no efficient production was detected at late time (7 to 10 dpi production). Weak viral production was detected later (at 7 dpi) in the basolateral sides (which would correspond to the parenchyma side) and increased at 10 dpi. We used the clearance of the small paracellular integrity marker, Lucifer Yellow, to evaluate the endothelial permeability coefficient [46]. Endothelium integrity did not appear significantly altered at the studied times (until 10 dpi) as the control and infected endothelium displayed a permeability coefficient of  $\sim 0.5 \times 10^{-3}$  cm/min, consistent with “tight” BBB endothelia (inferior to 1.5). This result was confirmed by  $\beta$ -catenin and actin immunofluorescence at 10 dpi to assess endothelium architecture (Fig 5C and 5D). No significant cytopathic effects (CPE) were observed despite infection of endothelium cells (Fig 5E).

Using ELISA assays, we next measured the concentrations in apical and basolateral sides of CXCL10, CCL5, and IL6, chemokines and cytokines that we previously showed as upregulated in USUV-infected mouse brains. Following USUV infection, we showed secretion of CXCL10, CCL5, and IL6 in apical compartments from 4 to 10 dpi, but the secretion level decreased with time. CXCL10 and CCL5 were also secreted at the basolateral side (Fig 5F).

Altogether, our results suggest that USUV may directly infect the BBB from the luminal side. USUV infectious particles are released from apical and basolateral compartments of the endothelium and could therefore reach the CNS *via* this route. Moreover, productive infection does not significantly alter the BBB integrity as the endothelium remains impermeable and no architectural disturbance was observed. Otherwise, chemokines such as CXCL10 or CCL5 are secreted from both sides in infected hBLECs, potentially leading to the recruitment of inflammatory cells to promote the massive inflammation observed *in vivo*.

### USUV induces spinal cord inflammation

As shown in Fig 2B, a high viral RNA amount was found in the spinal cord of infected mice. We also observed infected cells by immunofluorescence (Fig 6A). This is why we decided to explore the inflammation profile in the spinal cord and to compare it with the one observed for infected brains. First, CD45 staining indicated recruitment of uninfected inflammatory cells in USUV spinal cords (Fig 6B and 6C). We also detected apoptosis (10.1%) in the spinal cord of infected-animals (Fig 6D). Interestingly, the inflammation profile studied by PCR-array was very similar in the spinal cords and brains of USUV-infected mice. We detected in particular overexpression of the same chemokines (CXCL10, CXCL9, CCL5), as well as of



**Fig 4. USUV induces massive brain inflammation.** Histological sections of neonatal brain mice infected by USUV (6 dpi). (A) Immunohistochemical staining of B-cells (PAX 5), T-cells (CD3) and macrophages (F4/F80) showing T-cells and macrophages infiltration. (B) Immunofluorescence staining (Iba1 in pink, nucleus in green) shows microglia recruitment/activation in USUV-infected brain contrary to control mice (CT). (C) RT-qPCR analysis using a specific inflammatory cytokines and receptors PCR array of mRNA collected at 6 dpi from brain of control and infected mice. Fold regulation of statistically significant genes normalized to CT are indicated for 3 mice of each group.  $p < 0.05$  (p value in [S3A Fig](#)). Scale bar = 50 $\mu$ m. (D) CXCL10 protein level in control and infected mice. (E) Representative picture of dissected brain from EB-injected mock- and USUV- infected mice at 3 and 6 dpi showing no blue labelling. Liver is used as positive control of EB staining.

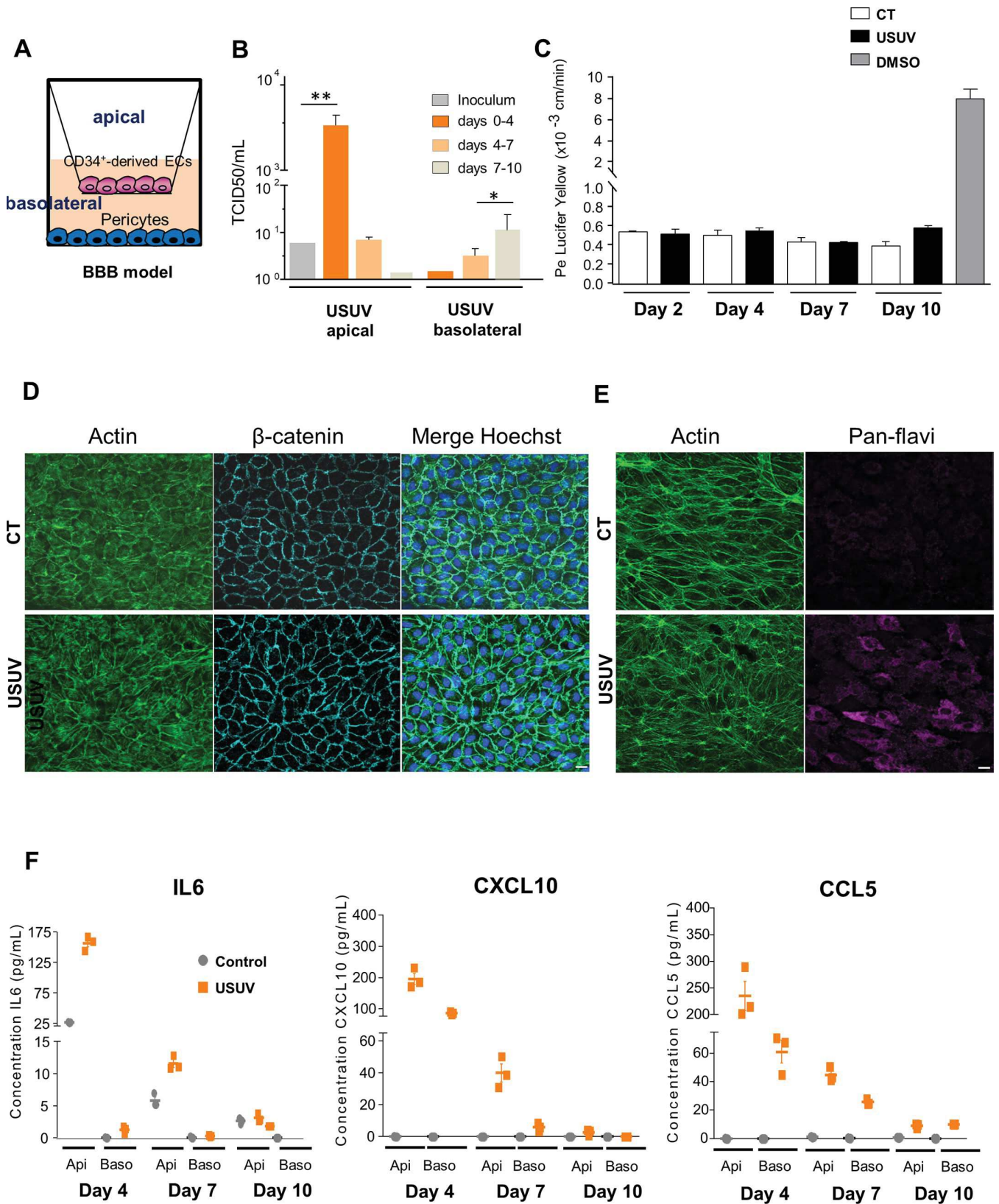
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008223.g004>

spinal cord-specifically upregulated *CCL3* and *CCL4* chemokines. Antiviral response was also overexpressed (*IFN $\beta$* , *OAS2*, *MX1*, *ISG15*, *IRF5*, *IRF7*, . . .) as well as inflammasome components (*NLRP3*, *CASP8*), and we found the same PRRs overexpressed in the spinal cord as in the brain (*RIG-I*, *LGP2* and *TLR3*) ([Fig 6E](#), [S4 Fig](#)).

### USUV induces inflammatory responses in the eye and efficiently replicates in human retinal pigment epithelium

As an extension of the CNS, the eye displays similarities to the brain and spinal cord in terms of anatomy, functionality, response to injury, and inflammation [49]. Although eyes are sequestered from the systemic circulation, numerous viruses, among them arboviruses can still reach this organ and cause inflammation and pathologies [50]. Several flaviviruses, including DENV, ZIKV and WNV, have been described as triggering ophthalmic damage, including retinopathy [51]. Using a RT-qPCR approach, we observed that USUV could replicate in the eyes of neonatal mice ( $4 \times 10^4$  TCID50 eq per g, [Fig 2B](#)) and *Ifnar*<sup>-/-</sup> infected mice ( $10^5$  TCID50 eq per g). This replication was associated with some ocular defects, including severe conjunctivitis in *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice with extraocular exudate, as shown in [Fig 7A](#). Similarly, USUV-infected neonatal mice frequently presented closed eyes. Histological analyses by HES staining showed disruption of both inner and outer retinal structure and a loss of photoreceptors layer ([Fig 7B and 7C](#)). Histological analysis revealed otherwise no apoptotic cells after staining with caspase 3 antibody ([S5 Fig](#)), whereas CD45 staining revealed infiltration of inflammatory cells in all layers of the posterior compartments, mainly in retinal ganglion cell layer and the inner retina, but also in the optic nerve and in the iris of the anterior eye, suggesting neuroretinitis and uveitis ([Fig 7C](#)). As microglial cells are the major population of immune cells in quiescent retina, and are important for the maintenance of retinal homeostasis, we checked for their presence in infected eyes [52]. We observed strong infiltration of microglial cells in USUV-infected eyes, mainly in close proximity to the RPE ([Fig 7D](#)). To see if inflammatory cell infiltration in eyes is associated or not with chemokine/cytokine overexpression, we measured mRNA expression of *CXCL10*, *CCL 5* and *IL6*, among the strongest inflammatory mediators overexpressed in previous tested organs (*i.e.*, brain and spinal cord). All of these chemokines/cytokines were overexpressed after USUV infection whereas *IFN $\beta$*  and *TNF $\alpha$*  (tumor necrosis factor) levels remained unchanged ([Fig 7E](#)).

The RPE, the supporting tissue of the retina, consists of a monolayer of epithelial cells that contributes to the retinal-blood barrier and regulation of the immune response in the eye [53,54]. In these cells, viral replication could be associated with anti-viral responses and cytokine secretion, which could potentiate local inflammation. Human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium is morphologically and functionally characteristic of the RPE *in vivo* and thus represents a powerful model for studying pathophysiology of the RPE and its role during arboviral infection [55,56]. We infected human RPE, grown on transwell filters in compartmentalized chambers, with USUV at a MOI of 0.2. We observed viral production in apical and basolateral chambers over a period of 7 days by the TCID50 method ([Fig 7F](#)). Epithelium integrity was maintained upon infection and measures of the





**Fig 5. USUV replicates in a human model of the Blood-Brain Barrier without alteration of endothelium integrity.** (A) Human *in vitro* BBB model that consists in CD34+ blood cord-derived endothelial cells (CD34+-EC) that have been further differentiated and cultured in transwell filters placed on top of bovine pericytes. (B) BBB model was infected with USUV at MOI 0.1. Viral titers from inoculum, apical and basolateral compartments are indicated at 4 dpi, 7 dpi and 10 dpi. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). (C) Permeability (Pe) of the Lucifer Yellow (LY) paracellular marker was measured in mock (control, CT)- or USUV-infected BBB models at 2 dpi, 4 dpi, 7 dpi and 10 dpi. Positive control of the opening of BBB: endothelial cells were incubated with 10% dimethylsulfoxide (DMSO) one hour before permeability experiment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. (D) Immunofluorescence of actin and  $\beta$ -catenin staining showing no major perturbation of endothelium architecture at 10 dpi. Scale bar = 10 $\mu$ m. (E) Immunofluorescence of actin and pan-flavivirus staining showing infection of endothelium cells. (F) ELISA analyses of IL6, CXCL10 and CCL5 concentrations in the supernatants from apical (api) and basolateral (baso) compartments of mock- or USUV-infected BBB model at 4 dpi, 7 dpi and 10 dpi.

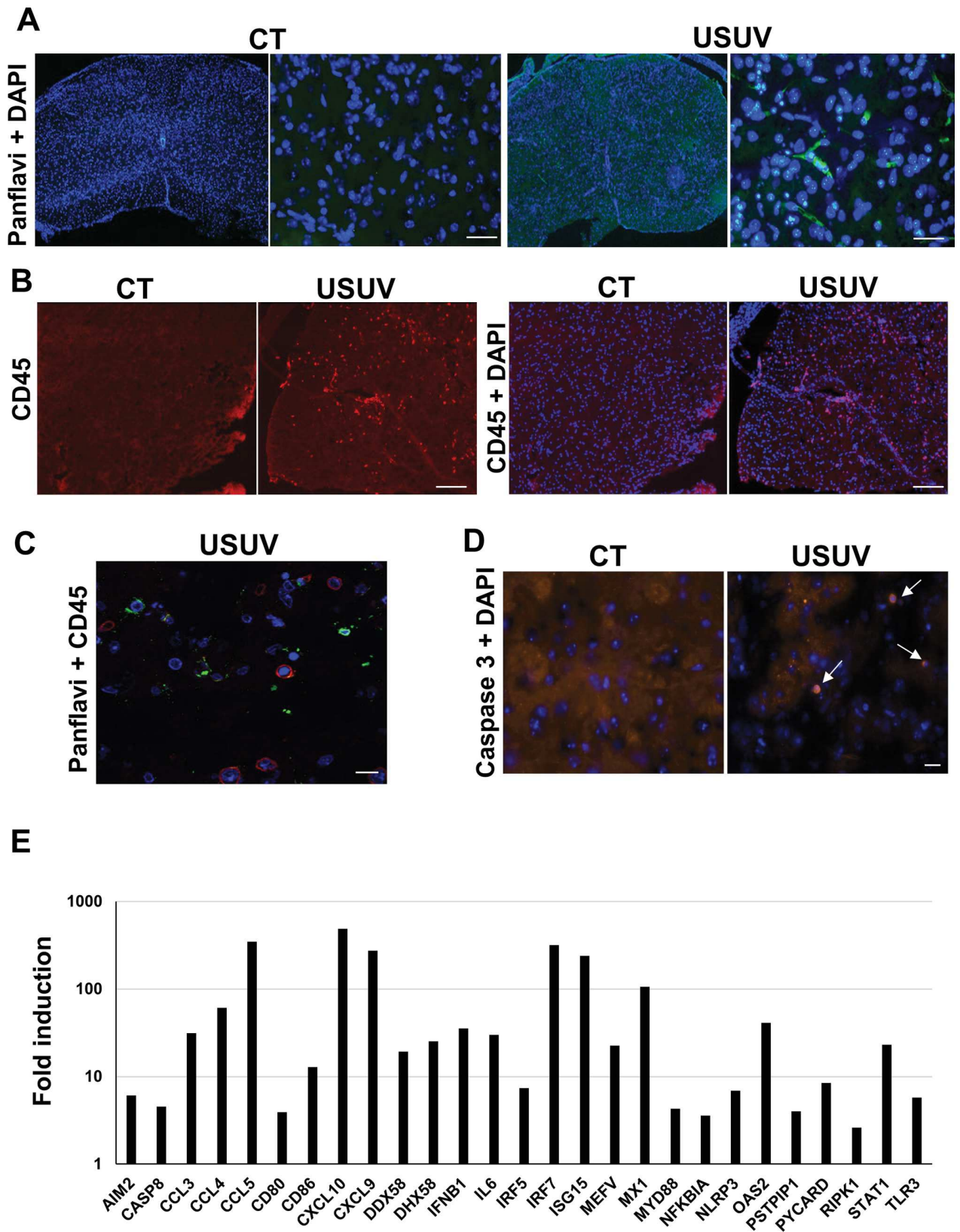
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008223.g005>

transepithelial resistance (TEER) of confluent RPE monolayers showed no significant variation after infection (S6 Fig). We performed RT-qPCR analysis targeting mainly genes involved in interferon response. This analysis disclosed upregulation of type 1 IFN (*IFN $\alpha$*  and *IFN $\beta$* ) and Interferon-Responsive Genes showing notably upregulation of many IFI (Interferon-inducible protein) (Fig 7G). Interestingly, CXCL10, CCL5 and IL6 were also found upregulated in human RPE infected by USUV, as was observed in the murine eyes as well as the brain and spinal cord.

Taken together, these data suggest that USUV replication in mouse eyes induces inflammation as in the CNS. Moreover, USUV infects human RPE and elicits a strong anti-viral response, potentially leading to immune-mediated responses.

## Discussion

The immune system initially is mobilized to defend the CNS from the invading pathogens, but sometimes can participate in devastating pathological reactions. Even with the great diversity of viruses that invade the CNS, many infections induce common pathogenic cascades such as the release of potentially detrimental immune mediators that can cause neurotoxicity. Therefore, despite the immune-privileged status of the CNS, inflammation can appear and induce neuronal damage in humans and animals. This inflammation can take place in several anatomical regions such as the meninges (meningitis), parenchyma (encephalitis), or spinal cord (myelitis), but also in multiple regions (meningoencephalitis, encephalomyelitis). Antiviral immune responses can also under certain conditions be an active contributor to these neurological disorders [57]. The symptoms and severity of the disorders thus depend on several factors, such as cell tropism, viral cytopathogenicity and the host immune response. One of our striking results is the massive inflammatory response in the brain and spinal cord of USUV-infected mice. Interestingly, the inflammatory signature is very similar in both organs. As part of this inflammatory signature, the chemokine CXCL10 plays a pivotal role in the attraction of leukocytes into the CNS, and was previously described to be upregulated after flavivirus infection like for WNV, which is closely related to USUV [41]. Notably this C-X-C chemokine was shown to be induced in several models of WNV brain and spinal cord infection as well as in WNV-infected blood donors [58–61]. CXCL10 can be secreted by numerous cell types, including leukocytes, monocytes, endothelial and epithelial cells, and is produced through the activation of IFN signaling or the lymphotoxin- $\beta$  receptor LT $\beta$ R via NF- $\kappa$ B [62]. This chemokine binds to the seven trans-membrane-spanning G protein-coupled receptor CXCR3, which regulates both chemotaxis and apoptosis of several immune cell types, and so can be either beneficial or detrimental to viral infection [42,63]. In response to USUV infection, this inflammatory context is associated with strong antiviral-response induction, as shown by up regulation of *IFN $\beta$*  and ISGs in the brain and spinal cord. These observations confirm previous studies showing induction of anti-viral response despite USUV replication, supporting the hypothesis that USUV does not possess mechanisms that interfere efficiently with IFN induction [45,64]. Mechanisms used by USUV to overcome this IFN response, while establishing a productive

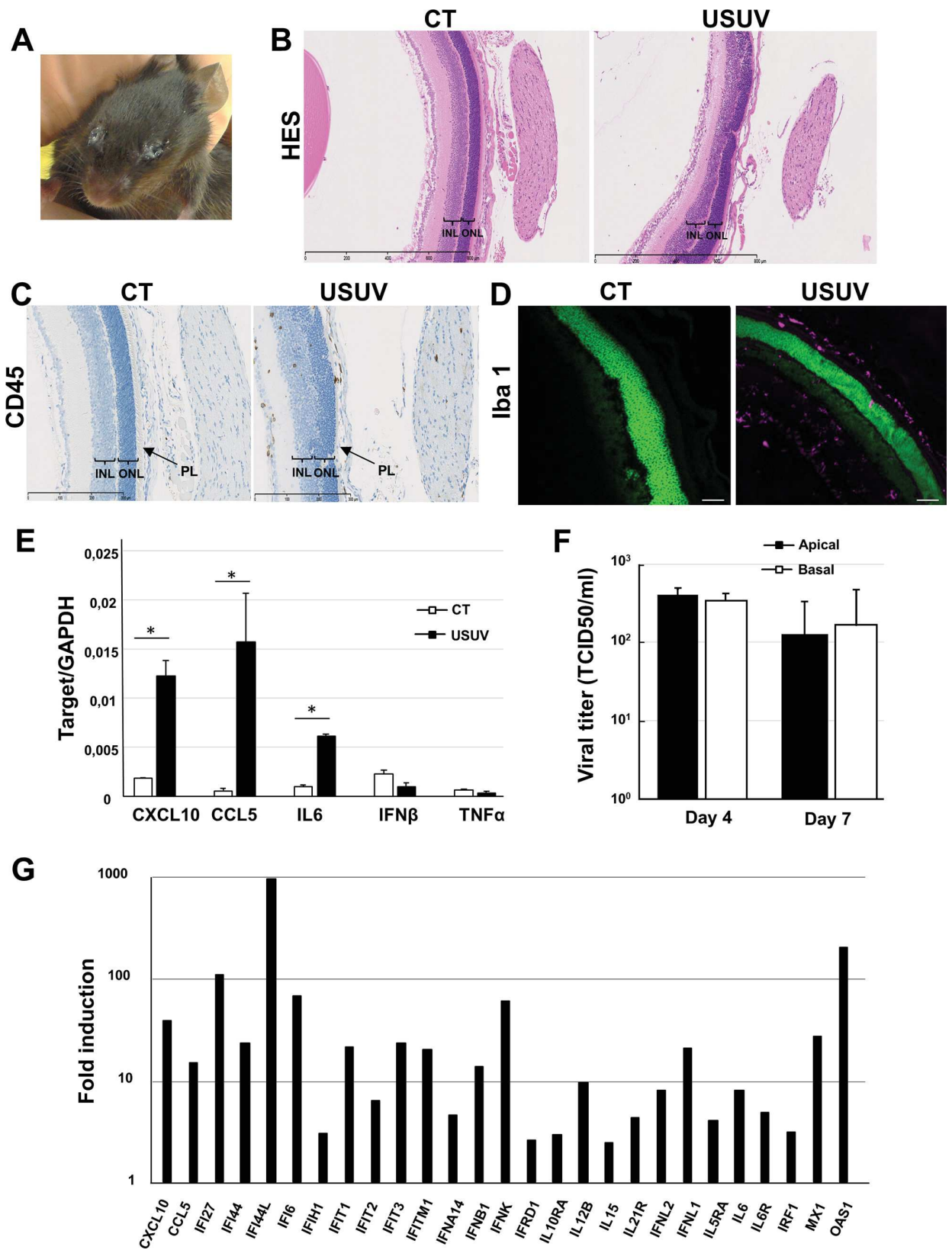


**Fig 6. USUV induces spinal cord inflammation.** (A) Immunofluorescence of control (CT) and USUV-infected spinal cords of Swiss mice at 6 dpi. The virus is labeled using a pan-flavivirus antibody (green) and nuclei by DAPI (blue). Scale bar = 20  $\mu$ m. (B) Immunofluorescence CD45 staining showing inflammatory infiltrates in infected-spinal cord (C) not associated with USUV staining (adjacent sections). Scale bar = 15  $\mu$ m in panel B and 50  $\mu$ m in panel C. (D) Immunofluorescence caspase 3 staining showing apoptosis in infected-spinal cord. Arrows indicate apoptotic cells. Scale bar = 20  $\mu$ m. (E) RT-qPCR analysis using a specific inflammatory cytokines and receptors PCR array of mRNA collected at 6 dpi from the spinal cord of control and infected mice. Fold regulation of statistically significant genes normalized to CT are indicated for 3 mice in each group.  $p < 0.05$  (p value in [S3B Fig](#)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008223.g006>

infection remains to be determined but the absence of efficient protective effect of type 1 IFN has been demonstrated for numerous other neurotropic flaviviruses [65–68]. In USUV-infected brains and spinal cords, we observed an increased expression of RIG-I, LGP2 (a positive regulator of RIG-I) and TLR3, PRRs known to be activated by viral dsRNA during viral replication [43]. Moreover, our results suggest an activation of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes after USUV infection, as we detected overexpression of major components of these structures (i.e., *NLRP3*, *IL-1 $\beta$* , *AIM2*, *CASP1*, *CASP8* and *PYCARD*) [40]. Inflammasome is a multiprotein complex organized in inflammasome sensor molecules like NLR, AIM2 or RIG-I connect to caspase 1 via ASC, which is an adaptor protein encoded by *PYCARD* that is common to all inflammasomes [69]. It plays an important role in the innate immune pathway and regulates at least two responses of the host: secretion of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-18) and induction of pyroptosis, a highly inflammatory form of programmed cell death that depends on the activation of at least one of the inflammatory caspases such as caspase-1 [69]. Several studies have demonstrated that some viruses have the ability to activate diverse inflammasomes, such as the NLRP3, AIM2, and RIG-I inflammasomes, which in turn contributes to mediate the host response to viral infection [40]. Moreover, inflammasome activation has been shown to be important for immune response and inflammation induced by several flaviviruses like DENV, ZIKV and WNV [70–72].

Studies of BBB infection are especially complicated due to a lack of pertinent models. Using an innovative human *in vitro* BBB model, recapitulating the main characteristics of the endothelial barrier, we showed that the human BBB is permissive to USUV replication. Despite the presence of proinflammatory cells and viral RNA in the brain, a significant decrease in barrier integrity was not observed at the time points assessed in this study contrary to what has been observed for WNV [73]. These results suggest that USUV directly infects vascular endothelial cells, which allow direct passage across the BBB into the CNS without compromising the BBB integrity. It is generally believed that BBB disruption is a determinant event preceding viral invasion; however, several studies suggest that neurotropic flaviviruses can reach the CNS by crossing the BBB without barrier breakdown, allowing free virus to spread in the CNS. Some viruses can directly infect brain endothelial cells, which allow direct passage across the BBB. Moreover, the CNS exhibits areas (such as the choroid plexus and circumventricular organs) that are not completely protected by the BBB and serve as entry points for viruses. Several neurotropic viruses can also reach the CNS as cell-associated particles through a mechanism called the “Trojan horse”, in which peripheral-infected leukocytes transmigrate through the endothelial cell layer and release the virus within the CNS parenchyma. Finally, some viruses infect and migrate through peripheral nerves by axonal transport [44]. Viruses can then infect resident cells in the brain such as neurons, microglia, astrocytes and pericytes. We previously showed that astrocytes and neurons are permissive to USUV infection and we display here *in vivo* and *in vitro* infection and recruitment/activation of microglia after USUV infection [30]. We detected enhanced secretion of chemokines by endothelial cells that is classically required to attract leukocytes to the brain. Among them, infected-leukocytes also could be recruited and release the virus within the CNS through the “Trojan horse” mechanism, as suggested for WNV [74]. Thus, global upregulation of inflammatory cytokines and chemokines in the brain



**Fig 7. USUV induces strong inflammatory responses in mouse eyes and efficiently replicates in human retinal pigment epithelium.** (A) Representative photograph demonstrating ocular pathology and exudate in *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice inoculated intraperitoneally with USUV at 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/mouse. (B) Histological sections of uninfected (CT) or USUV-infected (6 dpi) neonatal mouse eye stained with haematoxylin/eosin/saffron and (C) immunohistochemical CD45 staining showing inflammatory infiltrates in neonatal eyes. Disruption of both inner and outer retinal structure and loss of photoreceptors layer were observed. INL: inner nuclear layer. ONL: outer nuclear layer. PL: photoreceptors layer. (D) Immunofluorescence staining shows microglia recruitment/activation in eyes of infected mice (Iba1: purple, nuclei: false colored green). Scale bar = 50µm. (E) qRT-PCR analysis of CXCL10, CCL5, IL6, IFNα and TNFα mRNA collected at 6 dpi from eyes of control and infected mice. \**p* < 0.05. (F) iPSC-derived-RPE were infected with USUV at MOI 0.2. Viral titers from apical and basolateral compartments of RPE grown on cell culture inserts were measured at 4 dpi and 7 dpi. Results are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. (G) Fold regulation of statistically significant genes modulated at 2 dpi normalized to CT in USUV-infected RPE by qRT-PCR analysis using a specific interferons and receptors PCR array. Results are expressed as means of the fold regulation for 3 independent experiments and analyzed using a Mann-Whitney test, *p* < 0.05 (*p* value in [S4 Fig](#)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008223.g007>

could be responsible for leukocyte recruitment and participate in general immune cell CNS infiltration and inflammation-associated pathology.

Numerous infectious pathogens are known to directly affect the spinal cord or trigger autoimmune reactions, which may result in inflammation and permanent damage associated notably to acute flaccid paralysis or transverse myelitis [75]. Acute flaccid paralysis is characterized by lesions in the anterior horn cells of the spinal cord, with abnormalities noted on magnetic resonance imaging (MRI) predominantly found in the gray matter. Transverse myelitis is caused by inflammation of the spinal cord that may result from viral infections, abnormal immune reactions, or insufficient blood flow through the blood vessels. Inflammation can damage or destroy myelin and so interrupt communication between the nerves in the spinal cord and the rest of the body [75]. This can cause particularly muscle weakness, paralysis or sensory problems. Our results clearly showed that USUV targets the spinal cord, which is consistent with the motor defects that we observed. We also described an inflammation signature in the spinal cord with a cytokine profile that is very similar to what we observed in the brain.

Another striking effect of USUV infection is its capacity to infect mouse eyes and a human iPSC-derived RPE model. This last model is morphologically and functionally characteristic of the RPE *in vivo* presenting polarized pigmented cobblestone expressing characteristic RPE markers and tight junction proteins [42]. It thus represents a powerful tool to study the pathophysiology of the RPE. Anatomically and developmentally, the eyes are known as an extension of the CNS and are proposed to act as a reservoir of viral replication; moreover RPE are known to be targeted by numerous pathogens including arboviruses, such as DENV, ZIKV and WNV, leading to major ophthalmological damage [50,51,56,76]. Numerous studies have shown the critical role of immune cells in retinal disease, and neuroinflammation is an important aspect of many diseases of the eye. Like the brain the eye is also surrounded by an array of blood-ocular barriers that share structures and mechanisms with the CNS gating system. Our results showed disruption of both inner and outer retinal structure and a loss of photoreceptors layer in mouse eyes whereas USUV-infection does not seem to affect the integrity of the human ocular epithelium *in vitro*, but replication is associated with activation of inflammation through an immune-mediated reaction. The inflammatory signature in USUV-infected eyes is, at least partially, similar to that of the CNS. Interestingly, among the cytokines overexpressed in our ocular models, CXCL10 has already been shown to be implicated in various ocular disorders involving retinal degeneration and has been shown to be up-regulated in human RPE and in the eyes of mice infected systemically with ZIKV [56,63,77–79].

In conclusion, we showed that USUV infects multiple organs and cells of the CNS associated with drastic inflammation and various deleterious effects such as motor and ocular defects. Despite the fact that several neurological complications such as encephalitis or meningoencephalitis have been recently reported for USUV, this emergent virus has been much less studied than other related flaviviruses. Its recent spread in Europe, concomitant with that of

the closely related WNV, must lead us to be vigilant and to better characterize the epidemiological and biological characteristics of USUV infection.

## Materials and methods

### USUV strains, production and cellular infection

Africa 2 strain of USUV (Rhône 2705/France/2015-KX601692), was provided by Anses (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) and was propagated three times on Vero cells (ATCC CCL-81). Viral stocks were prepared by infecting sub confluent Vero cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 in D-MEM medium (Thermoscientific) supplemented by 2% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma). Cell supernatant was collected 6 dpi and viral stock harvested after centrifugation at 300 g to remove cellular debris. Viral titers were determined by TCID<sub>50</sub>, which was calculated using the Spearman-Kärber method and were expressed as TCID<sub>50</sub> per mL [80].

Cells at 60–70% confluence were rinsed once with phosphate-buffered saline (PBS), and USUV diluted to the required MOI were added to the cells in a low medium volume. Cells were incubated for 2 h at 37°C with permanent gentle agitation and then culture medium was added to each well, and cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. As a control, cells were incubated with the culture supernatant from Vero cells (mock condition).

### Mouse experiments

Pathogen-free *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice [81] kindly provided by Dr. Gilles Uzé were backcrossed onto a C57BL/6 background. Swiss mice were purchased from Janvier Laboratories (Saint-Berthevin Cedex, France). Mice were infected at E.C.E. (Etablissement Confiné d'Expérimentation), a level 3 animal facility of the University of Montpellier.

Groups of 8 to 12-week-old males for *Ifnar*<sup>-/-</sup> mice and of 6 days for studies in neonatal Swiss animals were inoculated intraperitoneally with 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/mouse of USUV. USUV-infected mice and control mice were euthanized by cervical dislocation or with a lethal dose of pentobarbital (Sigma-Aldrich Darmstadt, Germany) at indicated dpi depending on the experimental design. At 3 and 6 dpi three mock- and USUV-infected mice were i.p. injected with 0.5% Evans blue solution (200 µL per mouse) for 6 hours and euthanized after PBS intra-cardiac perfusion. Organs and tissues (urine, blood, liver, spleen, kidney, muscle, bladder, eye, brain, spinal cord, sciatic nerve) were snap frozen with liquid nitrogen for viral burden and Elisa analysis or collected after PBS intra-cardiac perfusion, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and cut using a microtome (3 µm sections) at the RHEM facilities (Montpellier). Animals were sacrificed if they present deterioration of body condition score and drastic weight loss (more than 20%).

### Ethics statement

Mice were bred and maintained according to the French Ministry of Agriculture and European institutional guidelines (appendix A STE n° 123). Experiments were performed according to national regulations and approved by the regional ethics committee of Languedoc-Roussillon (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale- Languedoc-Roussillon), France (approval N° 6773–201609161356607).

For human BBB model all adult subjects provided written informed consent, and a parent or guardian of any child participant provided informed consent on the child's behalf, in compliance with the French legislation. The protocol was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH Number DC2011-1321).

### Motor tests

**Footprint analysis.** Mouse hindpaws were dipped in nontoxic water-based paints. Mice were then allowed to walk down an enclosed runway lined with white paper. Three trials were performed for each mouse. Two to four steps from the middle portion of each run were measured for hind-stride length. Hindlimb foot angle is used to determine gait abnormalities. It is measured by drawing a line from the mid-heel through the middle (longest) digit. At least nine steps were measured for each mouse. Mean values were used for statistical analysis.

**Inverted screen.** The subject was placed on a grid screen. The grid was waved lightly in the air, then inverted 60 cm over a cage with soft bedding material. Mice were tested only one time with a 60-s maximum cutoff, and the latency to fall was recorded.

**Histology and immunostainings.** Samples were collected and fixed 24h in neutral buffered formalin 10%. Brain and eyes were dehydrated and embedded in paraffin for brain and eyes. Spinal cords were removed, post-fixed and embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Zoeterwoude, the Netherlands); sections (12  $\mu$ m) of lumbar region were stained with CD45 (Bioscience, 14–0451, 1:500) and then mounted in Eukitt. Paraffin-embedded tissue was cut into 3- $\mu$ m-thick sections, mounted on slides, then dried at 37°C overnight. Tissue sections were stained with HES with HMS 740 autostainer (MM France) for preliminary analyses. Immunohistochemical staining was performed on the Discovery Ultra Automated IHC staining system using the Ventana DAB Map detection kit. Following deparaffination with Discovery EZ Prep solution at 75°C for 24 minutes, antigen retrieval was performed at 95–100°C for 24 or 32 minutes using Discovery CC1 buffer for PAX5 and CD3e stainings respectively for 15 minutes using Discovery RiboCC buffer for CD45 staining, and 24 minutes using Discovery CC2 buffer for Cleaved caspase 3 staining. Endogenous peroxidase was blocked with Discovery Inhibitor CM for 8 minutes at 37°C. The slides were incubated after rinsing at 37°C for 60 minutes with a goat anti-PAX5 antibody (Santa cruz, sc1974, 1:125), a goat anti-CD3e antibody (Santa cruz, sc1127, 1:2000), a rabbit anti-Cleaved caspase 3 antibody (Cell signaling, 9671, 1:4000) or a rat anti-CD45 antibody (Bioscience, 14–0451, 1:500). Signal enhancement was performed using the Discovery DAB Goat OmniMap Kit for CD3e and PAX5 stainings, Discovery DAB Rabbit OmniMap Kit for Cleaved Caspase 3 staining and rabbit anti-rat IgG (H+L) as the secondary antibody (Thermo Scientific, 31219) and the Discovery DAB Rabbit OmniMap Kit for CD45 staining. For viral antigen immunostaining, antigen retrieval was performed for 4 minutes at 37°C with Protease 1 solution from Ventana which is an endopeptidase (alkaline protease) of the serine protease family. Endogenous peroxidase was blocked with Discovery Inhibitor CM for 8 minutes at 37°C. The slides were incubated after rinsing at 37°C for 32 minutes with a mouse anti-flavivirus group antigen monoclonal antibody (Millipore, MAB10216, 1:800 in Dako antibody diluent with background reducing components). Signal enhancement was performed using Rabbit monoclonal to mouse IgG1 + IgG2a + IgG3 as the secondary antibody (Abcam, ab133469, 1/8000) and the Discovery DAB Rabbit HQ Kit. Slides were then counterstained for 8 minutes and manually dehydrated before coverslips were added. Slides were treated with a Hamamatsu NanoZoomer 2.0-HT scanner by MRI platform and images were visualized with the NDP.view 1.2.47 software. Positive cells were counting using QuPath bioimage analysis software.

### Immunofluorescence assays

For indirect immunofluorescence, cells were fixed with 4% PFA and permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 5 min at room temperature (RT), followed by a blocking step with 2% bovine serum albumin (BSA) and 10% horse serum for 30 min to 1h at RT. Primary and secondary antibodies were diluted in blocking solution and incubated sequentially for 1h at RT.

Samples were then mounted with fluorescent mounting medium (Prolongold, ThermoFischer) with Hoescht (Sigma) and imaged by confocal microscopy using the Zeiss SP85 confocal microscope, with 40× or 63× 1.4 NA Plan Apochromat oil-immersion objectives.

### ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ELISA assays for human CXCL10, IL6, CCL5 were performed in mock- and USUV-infected supernatants from hBLECs at various dpi according to the manufacturer's instructions (R&D systems). Reading were done on spectrophotometer (ThermoFischer Scientifics) and data were analysed using the xPONENT program. Mean concentrations (pg/mL) of cytokines were all superior to the detection limits, defined as the mean background value plus standard deviations (stddev).

### Measurement of viral burden *in vivo*

Organs were weighed and homogenized with zirconia beads in a Fastprep 24 apparatus (MP Biomedicals) in 250 or 500 µL PBS and stored at −80°C. RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Blood and urine RNAs were extracted at 4, 6, 9, 12 and 16 dpi from 100 µL of samples, with the EZ1 apparatus running the EZ1 DSP virus kit (Qiagen). Viral RNA levels were measured by a one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay (RT-qPCR) on the Light Cycler 480 (Roche) with primers, probe and cycling conditions previously described [37]. Viral burden was expressed on a log10 scale as TCID50 equivalents per gram after comparison with a standard curve produced using serial 10-fold dilutions of USUV with known viral titers.

### RT-qPCR assays

USUV-or mock-infected cells (RPE cultured in 24-well plates) or mouse organs homogenized (brain and spinal cord) were harvested in RLT buffer (Qiagen) and total RNA was extracted using RNeasy mini-kit (Qiagen). Complementary DNA was synthesized using Omniscript reverse transcriptase (Life Technologies). RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Interferons & Receptors (RPE, # PAHS 064Z, 96 well format, Qiagen, 84 genes analyzed) or for Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors RT (#PAMM-011Z, 96 well format, Qiagen, 84 genes analyzed) as well as single transcript levels analysis were performed using the LC480 real time PCR instrument (Roche) and the Light Cycler 480 SYBR Green I master Mix (Roche). Volumes of mix, cDNA, RNase-free water, and cycling conditions were determined according to the manufacturer's instructions. Gene expression was normalized to that of the housekeeping gene HPRT. Genes without interpretable amplification curves were excluded from the analysis.

### Immunoblotting

Samples were lysed by boiling in SDS sample buffer, sonicated, and complemented with dithiothreitol (DTT). Protein concentrations were measured by a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, MA, USA). Equal amounts of protein from total cell lysates (10 µg) were loaded on SDS-PAGE gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked and incubated overnight at 4°C with primary antibodies and then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Amersham) for 1 h, bands were visualized by ChemiDoc XRS plus (Biorad Laboratories Hercules, CA).

### *In vitro* human BBB model

The *in vitro* human BBB model consists in CD34<sup>+</sup> blood cord-derived endothelial cells (CD34<sup>+</sup>-EC) that have been further differentiated and cultured in transwell filters (Costar) on



top of bovine pericytes in 12-well plates as previously described [46]. Briefly, once plated, CD34<sup>+</sup>-EC and pericytes were cultured for 5–6 days with medium change (Endothelium Cell Medium (ECM) supplemented with 5% Fetal Calf Serum (ECM-5)) every 2 days. Then, endothelial permeability (Pe) was tested by measuring Lucifer Yellow (LY, 20 μM; Life Technologies) transendothelial crossing using established protocols [46,82]. Pe was measured after 1 hour of LY transport by calculating the concentration-independent parameter as previously published [82]. The fluorescence detection was performed using a Tecan apparatus with excitation/emission wavelength (nm) settings of 432/538. Infection experiments were carried when the barrier was impermeable (*i.e.* with a  $Pe \leq 1,5 \times 10^{-3}$  cm/min). USUV was added at the MOI of 0,1 in 200 μL of ECM-5 for 2h on an orbital shaker. 300 μL of ECM-5 were then added and the inoculum removed. Infections were then carried for 4, 7 or 10 days with medium change at the same time. For each experiment, triplicates were used.

### iPSC-derived RPE generation and culture

Human iPSCs were generated from wild type BJ fibroblasts (ATCC CRL2522) as previously described [83]. iPSCs were cultured in Knockout DMEM medium (ThermoFischer Scientific) supplemented with 20% KO serum replacement (ThermoFischer Scientific), 1% GlutaMAX (ThermoFischer Scientific), 1% non-essential amino acids (ThermoFischer Scientific), 0.1% β-mercaptoethanol (ThermoFischer Scientific) and 1% penicillin-streptomycin (ThermoFischer Scientific). Six weeks later, pigmented foci were manually dissected, pooled, dissociated with 0.25% trypsin, filtered through a 40-μm filter and seeded at a density of  $\sim 3 \times 10^4$  cells per 0.32 cm<sup>2</sup> on a 1/30 dilution Corning Matrigel HESC-qualified matrix (Dominique Dutscher). Experiments were performed on iPSC-derived RPE at P3. USUV was added at the MOI of 0,2 in 200 μL of medium for 2h on an orbital shaker. 300 μL of new medium were then added and the inoculum removed.

### Transepithelial resistance (TEER) measurements

The iPSC-derived RPE was cultured on Matrigel-coated, clear BD Falcon cell culture inserts with high density 0.4 μm pores (Dominique Dutscher) in 24-well plates at P3. The TEER was measured using the Epithelial Volt/Ohm Meter EVOM2 (World Precision Instruments, Hertfordshire, U.K.) according to the manufacturer's instructions as previously described [56]. Electrodes were sterilized in 70% ethanol for 5 min, rinsed and equilibrated in media, then placed in the chambers with the longer electrode vertically touching the bottom of the dish in the lower chamber and the shorter electrode in the upper chamber without touching the cell layer. To calculate the final TEER values (Ohms.cm<sup>2</sup>), the background measurement of a Matrigel-coated insert without cells was subtracted from the reading and the value multiplied by the growth surface area.

### Material

Antibodies used in this study are: mouse anti-pan-flavivirus (clone 4G2, MAB10216 Millipore), rabbit anti-β-catenin, (clone E247, Abcam), goat anti-PAX5 antibody (Santa cruz, sc1974), goat anti-CD3e antibody (Santa cruz, sc1127), rabbit anti-Cleaved caspase 3 antibody (Cell signaling, 9671), rat anti-CD45 antibody (Bioscience, 14-0451), rabbit monoclonal anti-iba1 (Abcam, ab 178847), actinGreen (R37110, ThermoFischer scientific), rabbit polyclonal anti-CXCL10 (Abcam, ab 9938), mouse monoclonal anti-GAPDH (Abcam, ab 8245).

## Statistical analyses

For quantitative analyses, a minimum of three independent experiments were performed. Student's *t*-test and the Mann-Whitney test were performed to analyze unpaired data (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). Data were analyzed with GraphPad Prism software.

## Supporting information

**S1 Fig. Histological sections of neonatal brain control mice.** Immunohistochemical staining of B-cells (PAX 5), T-cells (CD3) and macrophages (F4/F80).  
(TIF)

**S2 Fig. ELISA analyses of CXCL10, IL6 and CCL5 concentrations in the blood of control- or USUV-infected mice at 6 dpi for Swiss mice and at 3 dpi for IFNAR mice.**  
(TIF)

**S3 Fig. *p*-values of RT-qPCR analyses from PCR array.** *p*-values of RT-qPCR analyses of the specific inflammatory cytokines and receptors PCR array from USUV-infected neonatal versus control brain (A) and (B) spinal cord at 6 dpi.  
(TIF)

**S4 Fig. *p*-values of RT-qPCR analyses from PCR array.** *p*-values of RT-qPCR analyses of the specific interferons and receptors PCR array from USUV-infected RPE versus control (mock) RPE at 2 dpi.  
(TIF)

**S5 Fig. Immunofluorescence caspase 3 staining showing no apoptosis in USUV-infected eyes.**  
(TIF)

**S6 Fig.** (A) iPSC-derived RPE were grown to confluence at passage 3 and showed classical pigmented cobblestone structure by light microscopy in control and infected cells at day 7. (B) Measures of RPE transepithelial resistance (TER) were performed using an epithelial volt-ohm meter before and after USUV infection at a MOI of 0.1. No significant variation was found in USUV-infected RPE versus control cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$  independent experiments.  
(TIF)

## Acknowledgments

We thank the "Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier" histology facility for processing our animal tissues and for their histology techniques and expertise, and the Montpellier Rio Imaging facility for microscope imaging. We thank more precisely Morgane Broyon and Aurélie Covinhes from RHEM platform who also participated in this study for their technical assistance. We thank Dr Giles Uzé for the *Ifnar*<sup>-/-</sup> mouse model, François Rassendren and Hélène Hirbec for the BV2 microglia cell line. This work has benefited from support by the Labex EpiGenMed, an "Investissements d'avenir" program.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Vasiliki Kalatzis, Sara Salinas, Yannick Simonin.

**Formal analysis:** Yannick Simonin.

**Funding acquisition:** Philippe Van de Perre, Sara Salinas, Yannick Simonin.

**Investigation:** Marion Clé, Jonathan Barthelemy, Caroline Desmetz, Vincent Foulongne, Lina Lapeyre, Karine Bolloré, Nejlja Erkilic, Nelly Pirot, Yaël Glasson, Sara Salinas, Yannick Simonin.

**Methodology:** Marion Clé, Caroline Desmetz, Vincent Foulongne, Karine Bolloré, Vasiliki Kalatzis, Nelly Pirot, Maria Teresa Alvarez Martinez, Yannick Simonin.

**Project administration:** Yannick Simonin.

**Resources:** Vincent Foulongne, Edouard Tuaille, Nejlja Erkilic, Sylvie Lecollinet, Cécile Beck, Fabien Gosselet, Yannick Simonin.

**Supervision:** Yannick Simonin.

**Validation:** Karine Bolloré, Vasiliki Kalatzis, Yannick Simonin.

**Writing – original draft:** Yannick Simonin.

**Writing – review & editing:** Marion Clé, Vincent Foulongne, Vasiliki Kalatzis, Sylvie Lecollinet, Cécile Beck, Nelly Pirot, Fabien Gosselet, Sara Salinas.

## References

1. Williams MC, Simpson DIH, Haddow AJ, Knight EM. The isolation of west nile virus from man and of usutu virus from the bird-biting mosquito *mansonia aurites* (theobald) in the entebbe area of uganda. *Ann Trop Med Parasitol*. 1964; 58: 367–374. <https://doi.org/10.1080/00034983.1964.11686258> PMID: [14212897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14212897/)
2. Calisher CH, Gould EA. Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res*. 2003; 59: 1–19. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59001-7](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59001-7) PMID: [14696325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14696325/)
3. Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparc-Goffart I, et al. Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10: 6049–83. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116049> PMID: [24225644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24225644/)
4. Bakonyi T, Gould EA, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology*. 2004; 328: 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.005> PMID: [15464850](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15464850/)
5. Cadar D, Lühken R, van der Jeugd H, Garigliany M, Ziegler U, Keller M, et al. Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, Western Europe, 2016. *Eurosurveillance*. 2017; 22: 1–7. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30452> PMID: [28181903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28181903/)
6. Engel D, Jöst H, Wink M, Börstler J, Bosch S, Garigliany MM, et al. Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. *MBio*. 2016; 7: 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01938-15> PMID: [26838717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26838717/)
7. Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, Gutierrez S, Gil P, Constant O, et al. Human Usutu Virus Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24. <https://doi.org/10.3201/eid2405.171122> PMID: [29664365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29664365/)
8. Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, et al. Usutu virus: A new threat? *Epidemiol Infect*. 2019; 147: e232. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001213> PMID: [31364580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31364580/)
9. Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csörgo T, Lussy H, et al. Emergence of usutu virus in Hungary. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 3870–3874. <https://doi.org/10.1128/JCM.01390-07> PMID: [17913929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17913929/)
10. Blázquez A-BB, Escribano-Romero E, Martín-Acebes MA, Petrovic T, Saiz J-CC. Limited susceptibility of mice to Usutu virus (USUV) infection and induction of flavivirus cross-protective immunity. *Virology*. 2015; 482: 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.020> PMID: [25827530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25827530/)
11. Escribano-Romero E, Lupulović D, Merino-Ramos T, Blázquez A-B, Lazić G, Lazić S, et al. West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Vet Microbiol*. 2015; 176: 365–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.005> PMID: [25724332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25724332/)
12. Nikolay B, Diallo M, Boye CSB, Sall AA. Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2011; 11: 1417–1423. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0631> PMID: [21767160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21767160/)

13. Diagne M, Ndione M, Di Paola N, Fall G, Bedekelabou A, Sembène P, et al. Usutu Virus Isolated from Rodents in Senegal. *Viruses*. 2019; 11: 181. <https://doi.org/10.3390/v11020181> PMID: 30795524
14. Cadar D, Becker N, de Mendonca Campos R, Börstler J, Jöst H, Schmidt-Chanasit J. Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2014. pp. 1771–1773. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140909> PMID: 25271769
15. Benzarti E, Sarlet M, Franssen M, Cadar D, Schmidt-Chanasit J, Rivas JF, et al. Usutu Virus Epizootic in Belgium in 2017 and 2018: Evidence of Virus Endemization and Ongoing Introduction Events. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2019; vbz.2019.2469. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2469> PMID: 31479400
16. Michel F, Sieg M, Fischer D, Keller M, Eiden M, Reuschel M, et al. Evidence for West Nile Virus and Usutu Virus Infections in Wild and Resident Birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses*. 2019; 11. <https://doi.org/10.3390/v11070674> PMID: 31340516
17. Čabanová V, Šikutová S, Straková P, Šebesta O, Vichová B, Zubříková D, et al. Co-Circulation of West Nile and Usutu Flaviviruses in Mosquitoes in Slovakia, 2018. *Viruses*. 2019; 11. <https://doi.org/10.3390/v11070639> PMID: 31336825
18. Nagy A, Mezei E, Nagy O, Bakonyi T, Csonka N, Kaposi M, et al. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Eurosurveillance*. 2019; 24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.28.1900038> PMID: 31311619
19. Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grottole A, Sabbatini AMT, Tagliacuzzi S. Rapid communications First human case of usutu virus neuro invasive infection, italy, august—september 2009. 2009; 5–6.
20. Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P, et al. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August–September 2009. *Euro Surveill*. 2009; 14. <https://doi.org/10.2807/es.14.50.19448-en>
21. Cavrini F, Pepa ME Della, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, et al. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J Clin Virol*. 2011; 50: 221–223. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.11.008> PMID: 21156352
22. Grottole A, Marcacci M, Tagliacuzzi S, Gennari W, Di Gennaro A, Orsini M, et al. Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2017; 23: 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.019> PMID: 27677699
23. Santini M, Vilibic-Cavlek T, Barsic B, Barbic L, Savic V, Stevanovic V, et al. First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August–September 2013: clinical and laboratory features. *J Neurovirol*. 2014; 21: 92–97. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0300-4> PMID: 25361698
24. Vilibic-Cavlek T, Savic V, Sabadi D, Peric L, Barbic L, Klobucar A, et al. Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the “One health” context, 2018. *Transbound Emerg Dis*. 2019; tbed.13225. <https://doi.org/10.1111/tbed.13225> PMID: 31067011
25. Pacenti M, Sinigaglia A, Martello T, De Rui E, Franchin E, Pagni S, et al. Clinical and virological findings in patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018. *Eurosurveillance*. 2019; 24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900180> PMID: 31771697
26. Carletti F, Colavita F, Rovida F, Percivalle E, Baldanti F, Ricci I, et al. Expanding Usutu virus circulation in Italy: detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. *Eurosurveillance*. 2019; 24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649> PMID: 30670139
27. Cadar D, Maier P, Müller S, Kress J, Chudy M, Bialonski A, et al. Blood donor screening for west nile virus (WNV) revealed acute usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Eurosurveillance*. 2017; 22: 3051. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.14.30501> PMID: 28422005
28. Bakonyi T, Jungbauer C, Aberle SW, Kolodziejek J, Dimmel K, Stiasny K, et al. Usutu virus infections among blood donors, Austria, july and august 2017 –Raising awareness for diagnostic challenges. *Eurosurveillance*. 2017; 22. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644>
29. Zaaijer HL, Slot E, Molier M, Reusken CBEM, Koppelman MHGM. Usutu virus infection in Dutch blood donors. *Transfusion*. 2019; <https://doi.org/10.1111/trf.15444> PMID: 31270821
30. Salinas S, Constant O, Desmetz C, Barthelemy J, Lemaitre J-M, Milhavet O, et al. Deleterious effect of Usutu virus on human neural cells. Beasley DWC, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e0005913. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005913> PMID: 28873445
31. Martín-Acebes MA, Blázquez AB, Cañas-Arranz R, Vázquez-Calvo Á, Merino-Ramos T, Escribano-Romero E, et al. A recombinant DNA vaccine protects mice deficient in the alpha/beta interferon receptor against lethal challenge with Usutu virus. *Vaccine*. 2016; 34: 2066–2073. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.015> PMID: 26993334
32. Weissenböck H, Bakonyi T, Chvala S, Nowotny N. Experimental Usutu virus infection of suckling mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination. *Acta Neuropathol*. 2004; 108: 453–460. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0916-1> PMID: 15372281

33. Li Y, Wu W-H, Hsu C-W, Nguyen H V, Tsai Y-T, Chan L, et al. Gene therapy in patient-specific stem cell lines and a preclinical model of retinitis pigmentosa with membrane frizzled-related protein defects. *Mol Ther*. 2014; 22: 1688–97. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.100> PMID: 24895994
34. Morrison TE, Diamond MS. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. *J Virol*. 2017; 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00009-17> PMID: 28148798
35. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2012. pp. 62–82. <https://doi.org/10.3390/v4010062> PMID: 22355452
36. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe*. 2016; <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009> PMID: 27212660
37. Nikolay B, Weidmann M, Dupressoir A, Faye O, Boye CS, Diallo M, et al. Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *J Virol Methods*. 2014; 197: 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.039> PMID: 24036076
38. Simonin Y, Loustalot F, Desmetz C, Foulongne V, Constant O, Fournier-Wirth C, et al. Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine*. 2016; 12: 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.020> PMID: 27688094
39. Ramos HJ, Lanteri MC, Blahnik G, Negash A, Suthar MS, Brassil MM, et al. IL-1 $\beta$  Signaling Promotes CNS-Intrinsic Immune Control of West Nile Virus Infection. *PLoS Pathog*. 2012; 8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003039> PMID: 23209411
40. Shrivastava G, León-Juárez M, García-Cordero J, Meza-Sánchez DE, Cedillo-Barrón L. Inflammasomes and its importance in viral infections. *Immunol Res*. 2016; 64: 1101–1117. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8873-z> PMID: 27699580
41. Michlmayr D, Lim JK. Chemokine receptors as important regulators of pathogenesis during arboviral encephalitis. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00264> PMID: 25324719
42. Sui Y, Stehno-Bittel L, Li S, Loganathan R, Dhillon NK, Pinson D, et al. CXCL10-induced cell death in neurons: Role of calcium dysregulation. *Eur J Neurosci*. 2006; 23: 957–964. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04631.x> PMID: 16519660
43. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009; 21: 317–37. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp017> PMID: 19246554
44. Mustafá YM, Meuren LM, Coelho SVA, De Arruda LB. Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00525> PMID: 30984122
45. Salinas S, Constant O, Desmetz C, Barthelemy J, Lemaitre J-M, Milhavel O, et al. Deleterious effect of Usutu virus on human neural cells. Beasley DWC, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e0005913. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005913> PMID: 28873445
46. Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, et al. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One*. 2014; 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099733> PMID: 24936790
47. Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, et al. PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation. *Front Immunol*. 2019; 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00711> PMID: 31024547
48. Loureiro JA, Andrade S, Duarte A, Neves AR, Queiroz JF, Nunes C, et al. Resveratrol and grape extract-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*. 2017; 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22020277> PMID: 28208831
49. London A, Benhar I, Schwartz M. The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders. *Nat Rev Neurol*. 2013; 9: 44–53. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.227> PMID: 23165340
50. Merle H, Donnio A, Jean-Charles A, Guyomarch J, Hage R, Najioullah F, et al. Ocular manifestations of emerging arboviruses: Dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. *J Fr Ophthalmol*. 2018; 41: e235–e243. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2018.05.002> PMID: 29929827
51. de Andrade GC, Ventura C V, Mello Filho PA de A, Maia M, Vianello S, Rodrigues EB. Arboviruses and the eye. *Int J Retin Vitre*. 2017; 3: 4. <https://doi.org/10.1186/s40942-016-0057-4> PMID: 28163928
52. Reyes NJ, O'Koren EG, Saban DR. New insights into mononuclear phagocyte biology from the visual system. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2017. pp. 322–332. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.13> PMID: 28345586
53. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med*. 2010; 10: 802–23. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21091424> <https://doi.org/10.2174/156652410793937813> PMID: 21091424
54. Detrick B, Hooks JJ. Immune regulation in the retina. *Immunol Res*. 2010; 47: 153–61. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8146-1> PMID: 20082152

55. Cereso N, Pequignot MO, Robert L, Becker F, De Luca V, Nabholz N, et al. Proof of concept for AAV2/5-mediated gene therapy in iPSC-derived retinal pigment epithelium of a choroideremia patient. *Mol Ther—Methods Clin Dev.* 2014; 1: 14011. <https://doi.org/10.1038/mtm.2014.11> PMID: 26015956
56. Simonin Y, Erkilic N, Damodar K, Clé M, Desmetz C, Bolloré K, et al. Zika virus induces strong inflammatory responses and impairs homeostasis and function of the human retinal pigment epithelium. *EBio-Medicine.* 2019; 39: 315–331. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.010> PMID: 30579862
57. Swanson PA, McGavern DB. Viral diseases of the central nervous system. *Curr Opin Virol.* 2015; 11: 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.009> PMID: 25681709
58. Cheeran MC-J, Hu S, Sheng WS, Rashid A, Peterson PK, Lokensgard JR. Differential responses of human brain cells to West Nile virus infection. *J Neurovirol.* 2005; 11: 512–24. <https://doi.org/10.1080/13550280500384982> PMID: 16338745
59. Garcia-Tapia D, Hassett DE, Mitchell WJ, Johnson GC, Kleiboeker SB. West Nile virus encephalitis: Sequential histopathological and immunological events in a murine model of infection. *J Neurovirol.* 2007; 13: 130–138. <https://doi.org/10.1080/13550280601187185> PMID: 17505981
60. Tobler LH, Cameron MJ, Lanteri MC, Prince HE, Danesh A, Persad D, et al. Interferon and Interferon-Induced Chemokine Expression Is Associated with Control of Acute Viremia in West Nile Virus-Infected Blood Donors. *J Infect Dis.* 2008; 198: 979–983. <https://doi.org/10.1086/591466> PMID: 18729779
61. Quick ED, Leser JS, Clarke P, Tyler KL. Activation of Intrinsic Immune Responses and Microglial Phagocytosis in an Ex Vivo Spinal Cord Slice Culture Model of West Nile Virus Infection. *J Virol.* 2014; 88: 13005–13014. <https://doi.org/10.1128/JVI.01994-14> PMID: 25165111
62. Columba-Cabezas S, Griguoli M, Rosicarelli B, Magliozzi R, Ria F, Serafini B, et al. Suppression of established experimental autoimmune encephalomyelitis and formation of meningeal lymphoid follicles by lymphotoxin  $\beta$  receptor-Ig fusion protein. *J Neuroimmunol.* 2006; 179: 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.06.015> PMID: 16870269
63. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2011. pp. 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001> PMID: 21802343
64. Scagnolari C, Caputo B, Trombetti S, Cacciotti G, Soldà A, Spano L, et al. Usutu virus growth in human cell lines: Induction of and sensitivity to type I and III interferons. *J Gen Virol.* 2013; <https://doi.org/10.1099/vir.0.046433-0>
65. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol.* 2004; 78: 2701–10. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990690> <https://doi.org/10.1128/JVI.78.6.2701-2710.2004> PMID: 14990690
66. Samuel MA, Diamond MS. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol.* 2005; 79: 13350–61. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13350-13361.2005> PMID: 16227257
67. Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine.* 2013; 31: 461–471. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.015> PMID: 23153447
68. Best SM. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. 2017; e01970–16. <https://doi.org/10.1128/jvi.01970-16> PMID: 27881649
69. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* Cell Press; 2014. pp. 1013–1022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007> PMID: 24855941
70. He Z, Chen J, Zhu X, An S, Dong X, Yu J, et al. NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Zika Virus-Associated Inflammation. *J Infect Dis.* 2018; 217: 1942–1951. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy129> PMID: 29518228
71. Khan RA, Afroz S, Minhas G, Battu S, Khan N. Dengue virus envelope protein domain III induces pro-inflammatory signature and triggers activation of inflammasome. *Cytokine.* 2019; 123: 154780. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154780> PMID: 31344594
72. Kumar M, Roe K, Orillo B, Muruve DA, Nerurkar VR, Gale M, et al. Inflammasome Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD (ASC) Is Critical for the Immune Response and Survival in West Nile Virus Encephalitis. *J Virol.* 2013; 87: 3655–3667. <https://doi.org/10.1128/JVI.02667-12> PMID: 23302887
73. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 2004; 10: 1366–1373. <https://doi.org/10.1038/nm1140> PMID: 15558055
74. Verma S, Lo Y, Chapagain M, Lum S, Kumar M, Gurjav U, et al. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules:

- Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology*. 2009; 385: 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.047> PMID: [19135695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19135695/)
75. Lebrun Frenay C. Infectious myelitis. *Rev Neurol (Paris)*. 2019; <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.07.001> PMID: [31375285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31375285/)
  76. Gamino V, Escribano-Romero E, Gutiérrez-Guzmán A V, Blázquez AB, Saiz JC, Höfle U. Oculopathologic Findings in Flavivirus-Infected Gallinaceous Birds. *Vet Pathol*. 2014; 51: 1113–1116. <https://doi.org/10.1177/0300985813516640> PMID: [24395913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24395913/)
  77. Manangeeswaran M, Kielczewski JL, Sen HN, Xu BC, Ireland DDC, McWilliams IL, et al. ZIKA virus infection causes persistent chorioretinal lesions article. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0096-z> PMID: [29802245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29802245/)
  78. Nawaz MI, Van Raemdonck K, Mohammad G, Kangave D, Van Damme J, Abu El-Asrar AM, et al. Auto-crine CCL2, CXCL4, CXCL9 and CXCL10 signal in retinal endothelial cells and are enhanced in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*. 2013; 109: 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.01.008> PMID: [23352833](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23352833/)
  79. Verhagen F, Kuiper J, Nierkens S, Imhof SM, Radstake T, de Boer J. Systemic inflammatory immune signatures in a patient with CRB1 linked retinal dystrophy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016; 12: 1359–1362. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1241709> PMID: [27690673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27690673/)
  80. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch für Exp Pathol und Pharmakologie*. 1931; 162: 480–483. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>
  81. Hwang SY, Hertzog PJ, Holland KA, Sumarsono SH, Tymms MJ, Hamilton JA, et al. A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons  $\alpha$  and  $\beta$  and alters macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 11284–11288. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11284> PMID: [7479980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7479980/)
  82. Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, et al. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res*. 2015; 1594: 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.047> PMID: [25451130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25451130/)
  83. Torriano S, Erkilic N, Faugère V, Damodar K, Hamel CP, Roux A-F, et al. Pathogenicity of a novel missense variant associated with choroideremia and its impact on gene replacement therapy. *Hum Mol Genet*. 2017; 26: 3573–3584. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx244> PMID: [28911202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28911202/)

## **b. Conclusion**

Nous avons ici caractérisé la neuropathogénicité d'USUV en utilisant des modèles *in vivo* et *in vitro*. L'infection du SNC est associée à divers effets délétères et à une inflammation drastique. *In vitro*, dans des modèles cellulaires complexes humains (BHE et RPE), l'USUV peut infecter et se répliquer sans perturber leur intégrité. Cette étude suggère que l'infection d'USUV entraîne une réponse inflammatoire importante qui permet le recrutement des cellules du système immunitaire au sein du SNC. Ces réponses immunitaires peuvent de ce fait participer aux pathologies neurologiques observées pour l'USUV. Ces travaux permettent d'aider à mieux caractériser la physiopathologie liée à l'infection par l'USUV.



### **3. Article III (en soumission)**

## ***Differential neurovirulence of Usutu isolates in mice and neuronal cells***

### **a. But de l'étude**

Une des complexités majeures d'USUV est la présence d'une grande diversité de lignées : 3 africaines et 5 européennes. Ces différentes lignées peuvent co-circuler sur un même territoire, au même moment, comme cela a été décrit en Allemagne, en Italie et en France<sup>190,192,205,221,238,271</sup>. De plus, il a été rapporté dans la littérature que sur les 24 personnes infectées par l'USUV développant des complications neurologiques, 13 étaient infectées par la lignée Europe 2, 1 par la lignée Europe 1 et 1 par la lignée Africa 2, les autres n'étant pas séquencées. De même, les personnes infectées par l'USUV mais ne développant pas de complications neurologiques étaient infectées par ces lignées, mais également d'autres telles que Europe 3, Europe 4 et Africa 3. Ces descriptions de cas mettent en évidence que les différentes lignées d'USUV peuvent infecter l'Homme et potentiellement varier en terme de virulence. Mais il reste à déterminer si elles peuvent être associées ou non à une virulence différentielle. De ce fait, dans cette étude, nous avons utilisé les 6 principales lignées circulantes en Europe d'USUV afin de déterminer et de comparer leur virulence en étudiant notamment leur capacité répliquative et l'induction de cytokines. Nous avons pour répondre à ces questions, utilisé un modèle de souris sensibles aux infections flavivirales ainsi que des cultures de cellules cérébrales humaines primaires et murines.

Chez des souris swiss immunocompétentes âgées d'une semaine, nous avons observé que l'infection des 6 lignées circulantes d'USUV étaient neuroinvasives puisqu'elles étaient toutes retrouvées dans le cerveau des souris infectées, qu'elles entraînaient des troubles moteurs et une mortalité mais avec des profils différents. Nous avons observé que les souris infectées par la lignée Europe 2 développaient des crises de type épileptique que ne nous retrouvions pas avec les autres lignées. Suivant la souche étudiée, l'infection était associée à une augmentation différentielle de l'expression des molécules inflammatoires ainsi qu'au recrutement des cellules du système immunitaire.

En parallèle, les cultures de cellules du SNC telles que les péricytes, les astrocytes et les cellules endothéliales humaines ainsi que les neurones et les microglies murines ont montré une permissivité différentielle aux lignées d'USUV. A l'exception des péricytes, l'infection avec la lignée Europe 2 a entraîné un effet cytopathogène spécifique et une production virale persistante dans le temps. Les astrocytes et les microglies infectés par les différentes lignées d'USUV ont mis en place des profils d'expression et de sécrétion de cytokines et de chimokines inflammatoires qui varient selon les lignées. Dans le modèle de BHE *in vitro*, nous avons observé que les souches Europe 2 et Africa 3 infectaient les cellules endothéliales de la BHE et libéraient des particules virales du côté apical et basolatéral sans induire de perturbation de l'intégrité de celle-ci. Enfin, un alignement de séquence a permis de mettre en évidence une mutation spécifique à la lignée USUV Europe 2 au niveau de la polymérase virale NS5 qui a été précédemment retrouvée également dans une souche Europe 2 isolée d'un patient atteint d'une méningo-encéphalite.

1 **Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal**  
2 **cells.**

3

4 Marion Clé<sup>a&</sup>, Orianne Constant<sup>a&</sup>, Jonathan Barthelemy<sup>a</sup>, Caroline Desmetz<sup>b</sup>, Marie France Martin<sup>c</sup>,  
5 Lina Lapeyre<sup>c</sup>, Daniel Cadar<sup>d</sup>, Giovanni Savini<sup>e</sup>, Liana Teodori<sup>e</sup>, Federica Monaco<sup>e</sup>, Jonas Schmidt-  
6 Chanasit<sup>d,f</sup>, Juan-Carlos Saiz<sup>g</sup>, Gaëlle Gonzales<sup>h</sup>, Sylvie Lecollinet<sup>h</sup>, Cécile Beck<sup>h</sup>, Fabien Gosselet<sup>i</sup>,  
7 Philippe Van de Perre<sup>a,j</sup>, Vincent Foulongne<sup>a,j</sup>, Sara Salinas<sup>a</sup> and Yannick Simonin<sup>a#</sup>

8

9

10 <sup>a</sup>Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Université de Montpellier, INSERM, EFS,  
11 Montpellier, France.

12 <sup>b</sup>BioCommunication en CardioMétabolique (BC<sup>2</sup>M), Montpellier University, Montpellier, France.

13 <sup>c</sup>Université de Montpellier, CNRS, Viral Trafficking, Restriction and Innate Signaling,  
14 Montpellier, France.

15

16 <sup>d</sup>Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and  
17 Haemorrhagic Fever Reference and Research, Hamburg, 20359 Germany.

18

19 <sup>e</sup>OIE Reference Centre for West Nile Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale",  
20 46100 Teramo, Italy.

21

22 <sup>f</sup>Universität Hamburg, Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences, 20148 Hamburg,  
23 Germany

24

25 <sup>g</sup>Department of Biotechnology, INIA, Madrid, Spain.

26

27 <sup>h</sup>UPE, Anses Animal Health Laboratory, UMR1161 Virology, INRA, Anses, ENVA, Maisons-Alfort,  
28 France.

29

30 <sup>i</sup>University of Artois, Blood-Brain Barrier Laboratory (BBB Lab), UR2465, F-62300 Lens, France.

31 <sup>j</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France

32

33 #Correspondence: yannick.simonin@umontpellier.fr

34 Tel: +33 (0)4 34 35 91 07

35 <sup>&</sup>Author contributed equally

36

37

38

39

## 40 **Abstract**

41 **Background.** Usutu virus (USUV) is an emerging neurotropic arthropod-borne virus recently involved  
42 in massive die offs of wild birds predominantly reported in Europe. Although primarily asymptomatic  
43 or presenting mild clinical signs, humans infected by USUV can develop neuroinvasive pathologies  
44 (including encephalitis and meningoencephalitis). Similar to other flaviviruses, such as West Nile virus,  
45 USUV is capable of reaching the central nervous system. However, the neuropathogenesis of USUV is  
46 still poorly understood and the virulence of the specific USUV lineages is currently unknown. One of  
47 the major complexities of the study of USUV pathogenesis is the presence of a great diversity of lineages  
48 circulating at the same time and in the same location. **Methods.** The aim of this work was to determine  
49 the neurovirulence of isolates from the six main lineages circulating in Europe using mouse model and  
50 several neuronal cell lines (neurons, microglia, pericytes, brain endothelial cells, astrocytes and *in vitro*  
51 Blood Brain Barrier model). **Results.** Our results indicate that all strains are neurotropic but have  
52 different virulence profiles. The Europe 2 strain, previously described as being involved in several  
53 clinical cases, induced the shortest survival time and highest mortality *in vivo* and appeared to be more  
54 virulent and persistent in microglial, astrocytes, and brain endothelial cells, while also inducing an  
55 atypical cytopathic effect. Moreover, an amino acid substitution (D3425E) was specifically identified  
56 in the RNA-dependent RNA polymerase domain of the NS5 protein of this lineage. **Conclusions.**  
57 Altogether, these data show a broad neurotropism for USUV in the central nervous system with lineage-  
58 dependent virulence. Our results will help to better understand the biological and epidemiological  
59 diversity of USUV infection.

60

61 **Keywords:** Usutu virus, arbovirus, flavivirus, neurotropism, central nervous system.

62

63

64

65

## 66 **Background**

67           Usutu virus (USUV) is an arbovirus of the genus *Flavivirus* from the *Flaviviridae* family. It  
68 belongs to the Japanese encephalitis virus (JEV) antigenic complex isolated for the first time in 1959 in  
69 South Africa from a *Culex neavei* mosquito [1–4]. Over recent years, this emerging virus has dispersed  
70 out of Africa mainly into Europe [5]. It was presumably carried by migratory birds and their associated  
71 mosquitoes, such as *Culex pipiens* [6–9]. Similar to other flaviviruses, USUV is an icosahedral-  
72 enveloped with a single-stranded positive sense RNA of 11 kb, with a 5' cap structure and one open  
73 reading frame (ORF) encoding a polyprotein of 3434 amino acids. The USUV polyprotein is post-  
74 translationally processed by cellular and viral proteases into three structural proteins: capsid (C), pre-  
75 membrane/membrane (prM/M), envelope (E), and seven non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b,  
76 NS3, NS4a, NS4b, and NS5) [10]. Its natural life cycle mainly involves birds (*Strigiformes* or  
77 *Passeriformes*) and mosquitoes (mainly *Culex*) [11].

78           USUV infection of birds is frequently characterized by encephalitis, myocardial degeneration,  
79 and necrosis of the brain, liver, and spleen [6,12]. Humans and others mammals, such as horses, rodents,  
80 dogs, and wild boars, are considered as accidental hosts [13–17]. The first two cases of USUV infection  
81 in humans were described in Africa, precisely in Central African Republic (1981) and Burkina Faso  
82 (2004), with mild symptoms such as fever and rash [18]. In Europe, USUV infection was reported for  
83 the first time in 2009 in two patients in Italy [19–21]. Since then several studies have reported human  
84 infections in Italy associated with neurological damages [22–27]. In 2013 and 2018, six patients with  
85 neuroinvasive symptoms (meningitis and meningoencephalitis) were diagnosed in Croatia, and a patient  
86 with aseptic meningitis in Hungary [28–30]. In 2016, USUV infection was reported in France in a patient  
87 with idiopathic facial paralysis [31]. In addition, USUV was detected in asymptomatic human blood  
88 donors in Austria, Germany, and the Netherlands [32–36]. To date, 100 cases of acute human infection  
89 have been described, mainly in Europe including patients with neurological symptoms (Table 1). Major  
90 USUV epizootics affecting avifauna, associated with a large epidemic of West Nile virus (WNV), were  
91 demonstrated in Europe in 2016 and in 2018 [37].

92 Isolates of USUV are currently classified into eight different genetic lineages which are divided  
93 in two major African or European groups: Africa (AF) 1, 2, 3, and Europe (EU) 1, 2, 3, 4, 5 [38].  
94 Although the great USUV evolutionary diversity in Europe appears to have emerged in the last decade,  
95 phylogeny analyses suggest relatively long-term circulation of USUV in Europe. As shown in Table 1,  
96 human cases of USUV infection are associated with different lineages. However, it is interesting to note  
97 that the majority of patients developing neurological symptoms are related to the EU2 strain, which is  
98 actively circulating in several European countries including Italy. It has been reported in the literature  
99 that among 24 patients presenting neurological symptoms, 13 cases were infected with EU2  
100 [20,27,28,30], one with AF2 [31], and one with EU1 [19], while for the other cases the strains involved  
101 were not characterized. USUV isolates have also been identified in asymptomatic infected patients or  
102 infected patients with mild clinical signs, such as AF3 [18,33], EU1 [24], EU2 [26,32,33], EU3  
103 [26,34,36], and EU4 [26]. Complete genome sequencing and phylogenetic analyses of African and  
104 European lineages have shown overall limited genetic diversity among all USUV strains analyzed [39].  
105 The pathogenicity of USUV strains currently circulating in Europe still remains to be investigated in  
106 order to understand the epidemiology and evolution of USUV. It has been well described that the  
107 neuroinvasive potential of many flaviviruses is strain dependent [40,41]. This the case for WNV which  
108 shares a lot of similarities with USUV [42]. However, little is known with respect to the neurovirulence  
109 of USUV lineages, and it could be hypothesized that the lineages currently circulating in Europe differ  
110 according to their virulence profiles.

111 The aim of this present study was to characterize the viral neurotropism and neuropathogenicity  
112 of six USUV strains (EU1, EU2, EU3, EU5, AF2, and AF3 lineages) using a suckling immunocompetent  
113 mouse model and both murine and human brain cells. Despite the fact that all USUV strains were  
114 neurotropic and lethal *in vivo*, we observed different rates of replication, cytokine induction, and  
115 mortality between the different lineages. The EU2 isolate was the most virulent, with 100% mortality  
116 *in vivo* and induction of symptoms comparable to epileptic seizures. These symptoms were not observed  
117 among the other strains. *In vitro*, we found all isolates infected cerebral cells types, such as murine  
118 neurons and microglia, human pericytes, brain endothelial cells, and astrocytes. However, *in vitro*  
119 infection showed that USUV isolates gave rise to different growth dynamics. Interestingly, the EU2

120 lineage exhibited the highest cell infection level, with both higher and more persistent replication rates,  
121 while also inducing an atypical cytopathic effect (CPE) characterized by dark cell clusters that detached  
122 from the cell mat.

123

## 124 **Materials and methods**

### 125 **USUV strains and cellular infection**

126 Europe 1 strain was from INIA Madrid (Spain), Europe 2 was provided from Istituto Zooprofilattico  
127 Sperimentale, Emilia Romagna (Italy), Europe 3, Africa 2 and Africa 3 strains were from ANSES  
128 (National Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety, France) and the Europe 5  
129 strain was coming from Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg (Germany) (Table  
130 2). The virus lineages were amplified no more than four times on Vero cells (ATCC CCL-81). Viral  
131 stocks were prepared by infecting 80% confluent Vero cells and cellular supernatants were collected 5  
132 to 7 days after infection. Viral titres were determined by TCID<sub>50</sub>/ml, which were calculated using the  
133 Spearman-Kärber method [43]. For infections, cells at sub confluence were rinsed once with PBS and  
134 USUV was added in a small volume of medium for 2 hours at 37°C with constant agitation before to  
135 remove the inoculum.

136

### 137 **Mouse experiments**

138 Six days neonatal swiss mice (Janvier Laboratories, Saint-Berthevin Cedex, France) were inoculated  
139 intraperitoneally with 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/mice of USUV. Cervical dislocation was used to euthanize mice at  
140 the end of the experiment or if mice presented general deterioration in their condition. Tissues were  
141 snap frozen in liquid nitrogen for the determination of the viral burden or fixed in 4% paraformaldehyde  
142 (PFA) and cut using a microtome (3 µm sections) at the RHEM facilities (Montpellier) for histological  
143 analysis.

144

### 145 **Histology and immunostaining**

146 Briefly, samples were collected and fixed 24h in neutral buffered formalin 10% and embedded in  
147 paraffin. Tissues were cut into 3- $\mu$ m-thick sections, mounted on slides, then dried at 37°C overnight and  
148 stained as previously described [44]. The slides were incubated at 37°C for 60 min with a rat anti-CD45  
149 antibody (14-0451, Bioscience) or a rabbit anti-Cleaved caspase 3 antibody (9671, Cell signaling). For  
150 viral antigen immunostaining, the slides were incubated at 37°C for 32 min with a mouse anti-flavivirus  
151 group antigen monoclonal antibody (Millipore, MAB10216). A scanner (Hamamatsu NanoZoomer 2.0-  
152 HT) was used to analyse the slides. Staining cells were quantified with the QuPath bioimage analysis  
153 software.

154

### 155 **Viral quantification for *in vivo* experiments**

156 Organs were crushed with zirconia beads (Fastprep apparatus, MP Biomedicals) in 500  $\mu$ L PBS before  
157 RNA extraction (RNA RNeasy Mini Kit, Qiagen). Urine and bloods RNAs were extracted with the EZ1  
158 DSP virus kit (Qiagen) and viral RNA levels were quantified by a one-step quantitative reverse  
159 transcriptase PCR assay (RT-qPCR) (Light Cycler 480, Roche) as previously described [45]. Viral load  
160 was reported as TCID<sub>50</sub> equivalents per gram using a standard curve.

161

### 162 **Cells**

163 Vero cells (ATCC, USA) and immortalised murine microglial cell line BV-2 (generated by Dr.  
164 Elisabetta Blasi [46]) were cultured in DMEM medium containing 10% of fetal bovine serum (FBS).  
165 C636 cells were grown in RPMI medium with 10% of FBS. Human pericytes and astrocytes cells  
166 (ScienCell™) were cultured on poly-L-lysine coated plates. Human endothelial cells were purchased  
167 from ScienCell™ and cultured on fibronectin-coated plates. Mouse hippocampal neurons (E18) were  
168 obtained and plated using standard procedures as previously described [44].

169

### 170 **Immunofluorescence assays**

171 Cells were fixed with 4% PFA and permeabilized for 5 min at room temperature with 0.1% Triton X-  
172 100. After a blocking step for 30 min to 1h at RT with 2% bovine serum albumin (BSA) an incubation



173 step with primary and secondary antibodies was performed. Cells were then fixed and incubated during  
174 5 min with Hoechst (Sigma) and mounted with fluorescent mounting medium (Prolongold,  
175 Thermofischer). Samples were imaged by the Zeiss SP85 confocal microscope, Infected cells were  
176 quantified by counting 10 fields per conditions per experiments ( $\geq 1000$  cells, n=3).

177

### 178 **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

179 At various days' post infection ELISA assays for human CCL5, IL6, and CXCL10 were performed in  
180 mock- and USUV-infected supernatants from microglia cells, and astrocytes cells (R&D systems). Data  
181 were analysed on a spectrophotometer (ThermoFischer Scientifics). Mean concentrations (pg/mL) of  
182 cytokines were all superior to the detection limits, defined as the mean background value plus two  
183 standard deviations (stddev).

184

### 185 **RT-qPCR assays**

186 USUV-or mock- infected cells (microglia and astrocytes) or mouse brain homogenized were harvested  
187 in RLT buffer (Qiagen) and RNA was extracted using RNeasy mini-kit (Qiagen). cDNA was  
188 synthesized (Omniscript reverse transcriptase, Life Technologies) and then analysis was done with a  
189 LC480 real time PCR instrument (Roche). HPRT gene was used to normalize gene expression.

190

### 191 **BrdU Test**

192 Cell proliferation was evaluated by enclosing 5000 cells in 96-well plates. Astrocytes cells were infected  
193 with six USUV lineages at a MOI 0.1. At 7 dpi, a bromodeoxyuridine ELISA test was performed  
194 (Calbiochem BrDU cell proliferation test) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was  
195 measured using a spectrophotometer at 450 nm (TECAN).

196

### 197 **MTT Test**

198 Cellular apoptosis was evaluated by enclosing 5000 cells in 96-well plates. Astrocytes cells were  
199 infected with six USUV lineages at a MOI 0.1. At 4 dpi the test was performed according to the

200 manufacturer's instructions (Calbiochem, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium  
201 Bromide, Thiazole Blue, MTT - CAS 298-93-1). Absorbance at 570 nm was measured using a plate  
202 reader.

203

#### 204 ***In vitro* BBB model**

205 Briefly the *in vitro* human BBB models consists in CD34<sup>+</sup> blood cord-derived endothelial cells (CD34<sup>+</sup>-  
206 EC) that have been differentiated and cultured in transwell filters (Costar) on top of bovine pericytes  
207 [47]. Medium was changed every 2 days. Lucifer Yellow (LY, 20 μM; Life Technologies) was used to  
208 test the endothelial permeability (Pe) by calculating the concentration-independent parameter and the  
209 fluorescence was detected at 432/538 nm [47,48]. If the barrier is impermeable ( $Pe \leq 1 \times 10^{-3}$  cm/min)  
210 this model was infected with USUV at the MOI of 0,1. After 2h, the inoculum was removed and 500  
211 μL of fresh medium was added. The medium was also changed at 4, 7 or 10 dpi.

212

#### 213 **Transendothelial electrical resistance (TEER) measurements**

214 According to the manufacturer's instructions the TEER was evaluated with the Epithelial Volt/Ohm  
215 Meter EVOM2 (World Precision Instruments, Hertfordshire). Electrodes were equilibrated in media and  
216 placed in the upper and lower chambers. Background measurement of a Matrigel-coated insert (with no  
217 cells) was subtracted from the reading and the value was multiplied by the growth surface area, to  
218 determine the TEER values (Ohms.cm<sup>2</sup>),

219

#### 220 **Ethics statement**

221 According to European institutional guidelines (appendix A STE n°123) and the French Ministry of  
222 Agriculture, mice were bred and maintained. Experiments were approved by French ethics committee  
223 (approval N° 6773–201609161356607). The *in vitro* human BBB model requires the use of human cells  
224 obtained from donors. All parents signed an informed consent form, according to the French legislation  
225 (CODECOH Number DC2011-1321).

226

## 227 **Determination of neuropathogenicity markers**

228 Neurovirulence and neuroinvasiveness markers such as predicted N-linked glycosylation sites or the  
229 occurrence of certain amino acids described to be associated with increased virulence were determined  
230 as described previously. Amino acid sequences of each viral strains were aligned using MUSCLE  
231 (MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation, EMBL-EBI). A percent identity matrix was  
232 generated aside with the alignment (Figure 8A). Some N-linked glycosylation sites as well as specific  
233 mutations were highlighted (Figure 8B).

234

## 235 **Statistical Analyses**

236 A least three independent experiments were done for each experiments. Student's t-test and the Mann-  
237 Whitney (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) were used to analyze unpaired with GraphPad Prism software.

238

## 239 **Results**

240

### 241 **USUV Isolates are Neurotropic but Exhibit Different Virulence Profiles in Suckling** 242 **Immunocompetent Mice.**

243 It remains to be described whether all USUV strains can enter the central nervous system (CNS)  
244 and cause similar damage to the brain parenchyma or whether lesions are strain-specific. To better  
245 characterize the neurovirulence of USUV isolates, we first evaluated the susceptibility of mice to six  
246 different USUV lineages (EU1, EU2, EU3, EU5, AF2, and AF3). These isolates were at low passage  
247 numbers in order to avoid accumulation of mutations owing to extensive passaging (Table 2,  
248 Supplemental Figure 1). There are a limited number of experimental models that enable the study of  
249 flavivirus virulence because wild-type adult mice are resistant to infection by many of these viruses,  
250 including Dengue virus (DENV), USUV, and Zika virus (ZIKV) [49,50]. To overcome this problem, it  
251 is possible to use transgenic mouse models. Mice lacking the interferon type 1 receptor (*Ifnar1*<sup>-/-</sup>) display  
252 enhanced susceptibility to infection by flaviviruses [51,52] and immunocompetent suckling mice are

253 susceptible to viral infection given they have not yet fully developed a functional interferon (IFN)  
254 response [49].

255 To compare strain virulence *in vivo*, study, neonatal immunocompetent Swiss mice were  
256 intraperitoneally (i.p.) infected with different USUV strains at  $10^3$  tissue culture infectious dose 50%  
257 (TCID<sub>50</sub>) per mouse. Symptoms and mortality were monitored for 20 days. The EU2 strain exhibited  
258 the most virulent phenotype as all mice infected by this strain died 10 days post infection (dpi), whereas  
259 the mortality rates for mice infected by EU5, AF3, EU1, EU3, and AF2 strains were 85%, 80%, 56%,  
260 54%, and 53% respectively at 20 dpi, the end of the experiment (Figure 1A). The mean time-to-death  
261 was also different between the strains. EU2- and AF2-infected mice died more quickly (8–9 dpi) versus  
262 the EU3-, EU5- and, EU1-infected mice (10, 11, and 13 dpi respectively), whereas AF3-infected mice  
263 had a delayed time-to-death with an average of 16 dpi (Figure 1B). Among infected mice, lethargy and  
264 inactivity, limb weakness, and paralysis of the hind limbs appeared on average between 4 and 8 dpi for  
265 all strains, except for AF3 for which symptoms appeared later (Figure 1B). The PBS-inoculated control  
266 groups exhibited no signs of disease throughout the experiment. It is interesting to note the induction of  
267 convulsive seizures in mice infected with the EU2 strain. These were observed at times of behavioural  
268 changes after induction of stress (such as cage changing) and were associated with the epileptiform  
269 activities of freezing, tremor, and tail erection. These convulsive seizures were not observed following  
270 infection by the other strains, even at later times.

271 We next investigated the viral burden in the blood and brain of infected mice. In the blood, the  
272 viral copy number was higher at 6 dpi in EU2- and EU5-infected mice (Figure 1C). All strains tested  
273 were neuroinvasive given that we detected the virus in the brains of all infected mice. However, brain  
274 viral burden at 6 dpi was lower in EU1-, EU3-, EU5-, AF2-, and, AF3-infected mice compared to EU2-  
275 infected mice (Figure 1C). EU2-infected brains also showed the presence of more viral antigen by  
276 immunohistochemistry staining compared to the other strains, such as AF3-infected mice, presenting  
277 less viral antigen (Figure 1D).

278 Overall, our observations suggest that despite the fact all strains appear neurotropic and induce  
279 neurological impairment in mice, they also have different virulence profiles, particularly the EU2 isolate  
280 which appears more pathogenic in this mouse model.

### 281 **USUV Strains Differentially Induce Brain Inflammation**

282 As suggested by previous studies [15,44,53] and clinical signs observed in our infected mice in  
283 this study (such as epilepsy, hind-limb paralysis, limb weakness, and lethargy), USUV infects,  
284 replicates, and damages the brain, in turn causing functional abnormalities. To better describe the brain  
285 infection profile following infection by the different isolates, we performed immunohistochemistry in  
286 infected brains at 6 dpi. Brain sections were stained with an anti-CD45, which labels all lymphoid cells.  
287 We observed USUV-induced recruitment of CD45<sup>+</sup> cells for all isolates (Figure 2A). Cellular infiltration  
288 was higher in EU1, EU2 and EU5 infected mice compared to the other groups. Caspase-3 staining  
289 showed minimal apoptosis, but still more cell death was observed in EU1 and EU2-infected mice (Figure  
290 2A). To evaluate whether the recruitment of inflammatory cells was correlated with the overexpression  
291 of inflammatory cytokines, we analyzed the inflammatory profiles of infected brains at 6 dpi by RT-  
292 qPCR (Figure 2B). We chose markers that have already been associated with viral encephalitis and  
293 neurodegenerative diseases, including tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin 6 (IL6), and  
294 interleukin 1  $\beta$  (IL1 $\beta$ ). We detected a strong increase in expression of *Tnfa*, *Il6*, *Il1 $\beta$* , but also interferon  
295 beta (*Inf $\beta$* ) in all mouse USUV-infected brains. Increases in expression were generally smaller for  
296 African isolates compared to European isolates, except for *Il1 $\beta$*  expression with varying expressions  
297 between strains.

### 298 **USUV Isolates Differentially Infect and Replicate in Primary Human Astrocytes and** 299 **Induce Deleterious Effects on Cellular Proliferation and Apoptosis**

300 To better understand the capacity of USUV to infect the brain, we compared USUV isolate  
301 virulence in various cell types of the CNS. Firstly, we infected primary human astrocytes with all isolates  
302 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. Surprisingly, an atypical CPE was observed at 7 dpi following  
303 infection by the EU2 isolate (Figure 3A). USUV-induced CPE are often characterized by cells rounding

304 up during necrosis, apoptosis, or pyroptosis [54]. Here, CPE induced by EU2 was characterized by dark  
305 clusters of cells that detached from the cell mat whereas the other isolates demonstrated typical CPE. In  
306 order to determine whether this CPE was characteristic of the EU2 lineage, we analyzed another EU2  
307 isolate. We observed the same atypical CPE, suggesting that this observation could be lineage-dependent  
308 rather than strain-dependent (Supplemental Figure 2A).

309         Since the replicative capacity of a virus is considered to be a marker for virulence, we studied  
310 the replicative capacity of the different USUV strains in astrocytes. This approach is based on the fact  
311 that the most virulent viral strains produce more progeny, which can lead to higher viral densities and  
312 therefore greater levels of virulence. Astrocytes infected with the EU1 and EU2 strains released more  
313 infectious viral particles at 2 dpi than astrocytes infected with the other strains (Figure 3A). At later  
314 times of infection (until 7 dpi), EU2 produced higher titers than the other strains as the production of  
315 viral particles further increased while decreasing for all the other strains (Figure 3A). A similar trend  
316 was observed for the other EU2 strain (Supplemental Figure 2B). This is a surprising result because  
317 even with CPE the production of viral particles continued to increase over time, suggesting that the virus  
318 is persistent and the remaining cells produce a significant amount of infectious viral particles.

319         To measure the viability of infected astrocytes we performed MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-  
320 yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tests at 4 dpi. Results showed more cell death following infection  
321 by EU1, EU2, EU3, and AF3 strains compared to EU5 and AF2 strains (Figure 3B). Given bright-field  
322 microscope images of USUV-infected astrocytes seemed to indicate a defect in cellular proliferation,  
323 we next explored whether cell division was affected by USUV infection. Astrocytes infected or not by  
324 USUV strains were incubated in the presence of the nucleotide analog BrdU and then quantified at 7 dpi  
325 by ELISA (Figure 3B). Compared to non-infected cells, all USUV-infected astrocytes, except those  
326 infected by EU5 and AF2 isolates, showed a decrease in proliferation at 7 dpi. Pan-flavivirus  
327 immunofluorescence staining showed very few positive cells but we clearly observed more infected  
328 cells after EU2 infection (Figure 3C). The pattern of antigen staining was characteristic of antigen  
329 distribution in the endoplasmic reticulum, a classical site for flavivirus replication (Figure 3C). Double-  
330 stranded RNA staining also indicated an efficient EU2 replication in astrocytes (Figure 3C). Altogether,

331 these results suggest that the EU2 strain targets primary human astrocytes more efficiently than the other  
332 USUV lineages and replicates for longer time.

### 333 **Variation of Chemokine and Cytokine Secretion, and Gene Expression Levels in Primary** 334 **Human Astrocytes Between Different USUV Isolates**

335 Astrocytes, along with microglia, are the predominant source of cytokines and chemokines of  
336 CNS resident cells, and thus may act as important processors of neuroinflammation and  
337 neurodegeneration [55]. Astrocytes are key players in the inflammatory response during neural  
338 infections caused by flavivirus [56,57]. Consequently, we investigated the mechanisms of induction of  
339 the inflammatory signaling elicited by the different USUV isolates in these cells. We first analyzed the  
340 modulation of expression of several genes involved in pro-inflammatory cytokine release. We collected  
341 mRNAs from USUV- or control-infected human astrocytes at 2 dpi and we performed RT-qPCR to  
342 quantify gene transcript levels of selected cytokines (*TNF $\alpha$* , *CXCL10*, *CCL5*, and *IL6*) (Figure 4A). We  
343 are interested in these cytokines because innate immunity is generally required for clearance of viral  
344 infection, and when clearance is ineffective, excessive cytokine release can occur. This can be  
345 detrimental and associated with adverse effects, such as CNS disorders. Thus, the main risk during  
346 neuroinvasive viral infection is the dispersion of the virus in the CNS, causing induction of inflammatory  
347 responses and destruction of neuronal cells. At 2 dpi, we observed a strong upregulation of cytokine  
348 mRNA in infected human astrocytes, mainly for the EU1, EU2 and AF3 isolates (Figure 4A). In parallel,  
349 we used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to investigate the secretion of CXCL10, CCL5,  
350 and IL6 chemokines/cytokines into the culture medium of USUV- and control-infected astrocytes  
351 (Figure 4B). The amount of soluble CXCL10, CCL5, and IL6 was increased in the supernatant of  
352 infected astrocytes at 2 dpi, but it varies depending in the isolates used for infection similarly to the  
353 results obtained by RT-qPCR (Figure 4B). Increased expression of CCL5 and CXCL10 could enhance  
354 recruitment and activation of immune cells and resident neuronal cells at the site of infection, thereby  
355 promoting the clearance of free virus as well as of infected cells in the CNS. Indeed, CCL5 has been  
356 reported to have both neuroprotective [58] and direct antiviral activities [59]. Moreover, during the  
357 inflammatory response astrocytes may influence the balance between host protection and neurotoxicity.

358 Considering this, we next investigated the antiviral response. We analyzed the effects of USUV strains  
359 on the mRNA level of *Infβ* and several cellular pattern recognition receptors (PRRs), as well as some  
360 effectors involved in their signaling pathway, including interferon regulatory factor 3 (*IRF3*) and  
361 myeloid differentiation primary response 88 (*MYD88*). We observed increased expressions of retinoic  
362 acid-inducible gene I (*RIG-I*), melanoma differentiation-associated antigen 5 (*MDA5*), and toll-like  
363 receptor 3 (*TLR3*), known to be activated by double-stranded viral RNA during viral replication and  
364 involved in IFN-β induction [60]. These genes all exhibited USUV strain-dependent expression levels.  
365 We did not observe a significant increase in toll-like receptor 7 (*TLR7*) expression (Figure 4C). In the  
366 literature, PRR expression levels generally increase in concert with ascending responses to viral  
367 infection, and suchlike increases are considered to reflect pathway activation [60]. Accumulation of  
368 these RNA sensors was accompanied by upregulated mRNA expression levels of IFN signaling pathway  
369 components, such as *IFNβ* itself, but also *MYD88* and to a lower extent *IRF3* (Figure 4C).

370 Altogether, the gene induction profiles were heterogeneous between the strains. These results  
371 suggest that USUV isolates differentially affect cytokine/chemokine production and anti-viral responses  
372 in primary astrocytes.

### 373 **USUV Strains Differentially Infect and Replicate in Microglial Cells**

374 Microglia represents the resident immune cells of the CNS. During brain infection, they have a  
375 critical role in host defense against invading viruses. We previously described that USUV efficiently  
376 infects microglia *ex vivo* in organotypic murine brain slices [44] and the hippocampal area of USUV-  
377 infected mice [54]. To determine if USUV isolates can infect microglial cells *in vitro* we infected the  
378 immortalized murine microglial cell line BV-2 at an MOI of 0.1 [61]. Comparable to our results obtained  
379 with astrocytes, we observed an atypical CPE at 5 dpi in microglia infected with the EU2 lineage (Figure  
380 5A) but not with the other lineages, even at later times (Supplemental Figure 3A). This suggested that  
381 this atypical CPE is not a specific feature of infected astrocytes. At 2 dpi, microglia infected by EU1,  
382 EU2, and AF3 showed increased replication (between  $10^3$  and  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL) compared to microglia  
383 infected by the other isolates (between  $10^0$  and  $10^1$  TCID<sub>50</sub>/mL) (Figure 5A). At 5 dpi, viral titer  
384 continued to increase for the EU2 lineage while it decreased for all other isolates. Moreover, we detected



385 by pan-*flavivirus* immunofluorescence staining that approximately 50% of cells were EU2-infected,  
386 23% were EU1-infected, and less than 10% were infected by the other strains at 2 dpi (Figure 5B).

387 We then investigated the effect of USUV infection on the mRNA expression of key pro-  
388 inflammatory cytokines. To compare pro-inflammatory cytokine gene induction between the several  
389 isolates in microglia, we collected mRNAs at 2 dpi and performed RT-qPCR to quantify gene transcript  
390 levels of *Tnfa*, *Cxcl10*, *Ccl5*, *Il6*, and *Infb*. We observed a strong upregulation of these cytokine mRNAs,  
391 with the exception of *Tnfa*, primarily in EU2- and AF3-infected microglia (Figure 5C). These data  
392 highlight the induction of cytokine signaling by USUV in microglia, particularly by the EU2 and AF3  
393 isolates. This was unexpected given that at 2 dpi the AF3 strain infected a very small percentage of cells  
394 (3%, Figure 5B). On the other hand, the AF3 strain ultimately induced efficient replication and a strong  
395 inflammatory response, suggesting that the few infected cells present produced a substantial amount of  
396 infectious viral particles. CXCL10 protein secretion measured by ELISA was also significantly  
397 increased in microglia infected by both EU2 and AF3 to a lower extent in comparison to the control and  
398 other strains (Figure 5D).

399 Our results provide evidence that USUV isolates differentially infect and replicate in murine  
400 microglial cells. Microglia appear to be more permissive to the EU2 isolate, which also persists longer  
401 in this neuronal cell type as we already observed in astrocytes.

## 402 **All USUV Lineages Infect Pericytes, Neurons, and Brain Endothelial Cells, but the EU2** 403 **Isolate Appears More Virulent**

404 Next, we compared the replication of the six circulating USUV strains in other CNS cell types:  
405 neurons, pericytes, and brain endothelial cells. Brain endothelial cells are highly specialized cells and  
406 form the BBB isolating the CNS parenchyma from the blood. The BBB regulates the flow of solutes,  
407 cells, and pathogens [62]. Infection and/or disruption of this barrier might be a key event preceding viral  
408 invasion. Pericytes are present on the abluminal surface of brain microvessels and they have a regulatory  
409 effect on BBB formation and permeability [63]. Although USUV is currently described as a neurotropic  
410 virus and we previously reported that it can effectively replicate in murine neurons, the relative ability

411 of USUV to replicate in cells of the BBB, such as pericytes and brain endothelial cells, is unknown [54].  
412 Similar to our results obtained with astrocytes and microglia, the EU2 strain induced an atypical CPE  
413 both in neurons (4 dpi) and in brain endothelial cells (6 dpi) (Figure 6A, 6C, Supplemental Figure 3B  
414 and 4B). Pericytes on the contrary did not demonstrate any CPE following infection by any of the strains  
415 (4 dpi) (Figure 6B, Supplemental Figure 4A). Moreover, it is noteworthy that neuronal damage was  
416 observed at 4 dpi, showing principally neurite destruction in EU1, EU2, EU3, and AF3-infected neurons  
417 (Figure 6A and Supplemental Figure 3B). Productive USUV replication in neuronal, pericyte, and  
418 endothelial cell cultures was observed for all strains (Figure 6A-C). Viral production in murine neurons  
419 and in human pericytes at 4 dpi was higher for the European strains, especially the EU2 isolate (Figure  
420 6A-B). In human brain endothelial cells, we showed that the EU2 strain replicated strongly and was  
421 persistent over time (Figure 6C). Indeed, the viral titer was very comparable between the different  
422 lineages at 2 dpi, but at 6 dpi the quantity of EU2 viral particles increased, while it decreased over time  
423 from 4 dpi for EU1 and from 2 dpi for the other isolates.

424 Altogether, our results show that neurons, pericytes, and brain endothelial cells are all  
425 permissive to infection by the different USUV strains, but only the EU2 isolate appears again be persistet  
426 in these cell types.

#### 427 **USUV EU2 and AF3 Infect and Replicate in Human Brain-like Endothelial Cells** 428 **(hBLEC) Without Perturbation of Endothelial Integrity**

429 The BBB is very effective in protecting the brain from viruses circulating in the blood. However,  
430 neuroinvasive viruses have developed a variety of mechanisms to pass through the BBB and reach the  
431 CNS. Several arboviruses, such as WNV and JEV, lead to endothelial integrity impairment and  
432 inflammatory molecule production that can disrupt BBB integrity and in turn allow access of the virus  
433 to the CNS [64–66]. In this study we used an human *in vitro* BBB model which recapitulates the essential  
434 characteristics of the endothelial barrier. To acquire BBB characteristics, human CD34<sup>+</sup> cord blood-  
435 derived hematopoietic stem cells were cultivated on culture inserts, in co-culture with pericytes for 6–7  
436 days (Figure 7A). These hBLEC can form tight junctions and express specific transporters [47] which  
437 can allow the study of drug or cell passage through the BBB [67,68]. We have previously shown that

438 USUV AF2 can replicate in hBLEC and cross the BBB without barrier breakdown [44]. Since  
439 replication in brain endothelial cells is sufficient to allow viral transport through BBB; we investigated  
440 whether both EU2 (particularly virulent) and AF3 (less virulent) strains could infect and disrupt integrity  
441 of the BBB *in vitro*. Following, hBLEC were infected by USUV on the apical side at an MOI of 0.1.  
442 Supernatants were collected at 4, 7, and 10 dpi from the apical (equivalent to blood vessel lumens side)  
443 and basolateral (CNS parenchymal side) compartments, and cells were fixed to analyze localization of  
444 tight junction proteins, regulating BBB integrity. Thus, endothelial permeability coefficient (Pe)  
445 consisting to evaluate the clearance principle of Lucifer Yellow (LY) and transendothelial electrical  
446 resistance (TEER) were also measured. Figure 7B shows viral titers in apical and basolateral  
447 compartments at 4 dpi (corresponding to the production between 0 and 4 days), 7 dpi (production  
448 between 4 and 7 days), and 10 dpi (production between 7 and 10 days). For the EU2 strain, weak viral  
449 production was detected at 4 and 7 dpi in the basolateral compartment, but production then increased at  
450 10 dpi. On the other hand, in the apical compartment the viral production was high at 4 dpi and decreased  
451 at 7 dpi, and then increased again at 10 dpi (Figure 7B). These results suggested an overall efficient  
452 production. The AF3 isolate presented a different profile, with no efficient production at 4, 7 or 10 dpi,  
453 both in the apical and basolateral compartments (Figure 7B). Pe of LY appeared not significantly altered  
454 by either EU2 or AF3 strains at 10 dpi, both control and infected endothelia displayed permeability  
455 coefficients of  $\sim 0.8 \times 10^{-3}$  cm/min, consistent with a “tight” BBB endothelium (inferior to 1.0) (Figure  
456 7C). We observed no significant variation in TEER values after infection (Figure 7C) and the  
457 endothelium remained impermeable with no manifestation of architectural disturbance (Figure 7D).

458 Our results suggest that despite USUV EU2 being the most virulent strain among the strains  
459 tested in this study, EU2 infects the BBB from the luminal side without deleterious effects on BBB  
460 integrity.

#### 461 **Genome Analysis highlights mutation in NS5 EU2 strains potentially correlated with** 462 **virulence**

463 By comparing the differences at protein level we found that among USUV strains, the amino  
464 acid average pairwise identity was between 98,57% and 99,77% (Figure 8A). Mutations predicted to

465 influence virulence, pathogenicity or neuroinvasiveness were then analyzed. USUV strains were  
466 compared to a WNV lineage 2 strain (WNV L2): WNV-6125 France 2018 (P2018-3687). Flaviviruses  
467 are described to have N-linked glycosylation sites on their envelope proteins. Glycosylated E protein  
468 interacts with cell surface lectins, facilitating attachment and infectivity [69]. As expected USUV strains  
469 have not N-linked glycosylation site at position N67 known to be unique to DENV whereas in all strains  
470 we observed glycosylation at N154 (motif NYS) that is highly conserved among flaviviruses. All strains  
471 exhibited also the potentially more virulent proline at position NS1-250. As shown on the Figure 8B the  
472 three potential N-linked glycosylation sites at positions 130, 175, and 207 within the NS1 protein, all  
473 molecular determinants of neuroinvasiveness, could be identified in all strains as well. Concerning NS5,  
474 we observed, specifically in USUV EU2, an amino acid substitution at position 3425 of the polyprotein,  
475 which correspond to the residue position 835 of the NS5 protein (E3425D/E835D-NS5) (Figure 8B).  
476 We also found this mutation in the second EU2 strain that we used in our study (data not shown).  
477 Interestingly, this mutation was previously described for an EU2 strain isolated from a patient with  
478 neuroinvasive disease [21]. More precisely, this mutation is localized in the RNA-dependent RNA  
479 polymerase domain of the NS5 protein that codes for the viral RNA polymerase. We also identified  
480 other inique mutations for EU2 strain (NS1: E36G, R57X, L85, NS2A: 108T, NS4B: 133S, K349R ,  
481 T325X, NS5 : 55I).

482

## 483 **Discussion**

484 USUV is classified into eight distinct lineages, which can circulate simultaneously in certain  
485 areas, especially in Europe. USUV has been repeatedly introduced into Europe from Africa over the last  
486 50 years [70]. Our observations suggest that different isolates from the 6 main USUV lineages can  
487 efficiently infect suckling immunocompetent Swiss mice and they all have the ability to access and  
488 replicate in the brain parenchyma. However, we reported different virulence profiles between the strains.  
489 In particular, the EU2 isolate appeared more pathogenic, whereas the AF3 strain had a significant delay  
490 in appearance of symptoms and mortality. One of our striking results is that the EU2 isolate, unlike the  
491 other isolates, induced symptoms similar of epileptic seizure including freezing, tremor, and tail  
492 erection. Seizures are commonly reported consequences of infection by several neurotropic viruses that

493 can induce neuroinflammatory responses, leading to enhanced neuronal excitability and ultimately  
494 contributing to epileptogenesis. For example, another flavivirus ZIKV is known for its induction of  
495 epileptic seizures in neonatal infected mice [71]. Exacerbated inflammation could be a consequence as  
496 well as a cause of epilepsy, and several inflammatory mediators, such as IL1 $\beta$ , TNF, and IL6, have been  
497 detected in surgically resected brain tissue from epileptic patients [72]. The major role of brain  
498 inflammation in the development of seizures has also been demonstrated in several models of infectious  
499 diseases [73]. However, given the fairly similar inflammatory profiles between the different European  
500 isolates in infected mice, exacerbated inflammation does not seem to be the only cause of the convulsive  
501 seizures observed following EU2 strain infection.

502         Viral infections of the CNS are dependent upon viral replication characteristics as well as  
503 immune responses to the virus. Once in the brain, neurotropic arboviruses can infect a variety of cells  
504 and lead to general neuroinflammation and eventually BBB impairment if cells of the neurovascular  
505 unit (NVU) as pericytes, or endothelial cells are targeted, as already described for JEV [74,75] or DENV  
506 [76]. The concept of the NVU was defined by Harder [77] as a structure formed by neurons, astrocytes,  
507 pericytes, microglia, oligodendrocytes, and endothelial cells. Interactions occur between neural, glial,  
508 and vascular components of the NVU in response to physiological stimuli or neuroimmune responses.  
509 Overall, these interactions maintain CNS homeostasis. NVU cells are direct or indirect targets of  
510 neurotropic flaviviruses. Infection of these cells can induce the release of soluble mediators that are  
511 involved in neuroinflammation and, in some cases, disruption of the blood-brain barrier (BBB).  
512 However, CNS resident cells have developed innate antiviral immune strategies to defend against  
513 neurotropic viruses. If neurons are a major target, others cells types such as astrocytes, microglia,  
514 pericytes, and endothelial cells can also become infected and participate to the resolution of infection  
515 by generating immune responses. Microglia and astrocytes are the main cells in the CNS responsible  
516 for initiating, regulating, and maintaining neuroimmune responses to viral infections. Activated glial  
517 cells are known to produce numerous mediators, including cytokines and chemokines, that orchestrate  
518 both the defense against and the pathogenicity of CNS viral infections [78]. Astrocytes can be infected  
519 by different flaviviruses, including ZIKV, WNV, JEV, or tick-borne encephalitis virus (TBEV)  
520 [57,79,80], as well as USUV [54]. Interestingly, as observed in suckling immunocompetent Swiss mice,

521 the EU2 USUV isolate also resulted in higher viral infection/replication in a large panel of neuronal  
522 cells. In this regards, EU2 infection resulted in higher susceptibility and proportion of infected cells in  
523 astrocytes, where we observed increased virulence with two different strains, suggesting that the effect  
524 is potentially lineage dependent rather than strain dependent. The ability of the USUV strains to  
525 differentially replicate in NVU cells may favor the capacity of the virus to undergo a second round of  
526 infection into the CNS. Thus, NVU cells may play not only a central role in the initial dissemination of  
527 different USUV strains to the CNS, but also in secondary waves of spread, both likely to exacerbate  
528 USUV-mediated neuropathology.

529 CNS cells express a number of PRRs and are able to respond to pathogen-associated molecular  
530 patterns (PAMPs, derived from pathogens) and to damage-associated molecular patterns (DAMPs,  
531 released upon CNS damage). USUV appears to induce a different cytokine response depending on the  
532 cell type and the strain. For example, the EU2 isolate replicated more efficiently and induced stronger  
533 cytokine responses in microglia, one of the main effector cells in neuroinflammation. The AF3 strain  
534 had a similar profile, nevertheless it replicated for a shorter time in these cells. The fact that the EU2  
535 strain replicates more and for longer than the other strains in several CNS cells could help to amplify  
536 the strongest deleterious effect of the infection observed *in vivo*. The host innate antiviral response plays  
537 a central role in controlling viral replication. Following USUV infection, the inflammatory context is  
538 associated with an important antiviral response, as observed by up-regulation of  $INF\beta$  in the infected  
539 brain and in neuronal cells. In infected astrocytes there was increased expression of genes involved in  
540 the antiviral response, such as  $IFN\beta$  and IRF3, mainly for EU1 and EU2 strain infections. Nonetheless,  
541 replication was also highest for these two strains. These results suggest that the IRF3-dependent arm of  
542 the host antiviral response does not differentially restrict USUV strain replication within infected cells.  
543 Moreover, the host antiviral response appears to play a minimal role in the differential susceptibility of  
544 astrocytes to different USUV strains. The absence of an efficient protective effect of type 1 IFNs has  
545 been demonstrated for numerous other neurotropic flaviviruses, such as DENV and WNV [81]. Previous  
546 studies have shown the induction of anti-viral responses despite USUV replication, suggesting that  
547 USUV does not harbor mechanisms that efficiently interfere with IFN induction [54]. The mechanisms  
548 used by USUV to interfere with this IFN response in order to establish a productive infection are

549 currently not known. RIG-I, TLR3, and MDA5 are well-conserved cytoplasmic PRRs that detect viral  
550 RNAs during infection and activate the type I IFN-mediated antiviral immune response. RNA levels of  
551 PRRs generally increase in concert with viral infection and is considered to reflect pathway activation.  
552 While RIG-I or TLR3 were overexpressed following USUV infection and this did not vary strongly  
553 between different strains, MDA5 overexpression was greater in isolates with strong IFN $\beta$  induction,  
554 including the EU1, EU2 and AF3 strains.

555 Host innate responses leading to pro-inflammatory cytokine and chemokine production are  
556 thought to modulate BBB integrity and enable viruses to access the brain [82]. The brain endothelium  
557 constitutes a primary barrier to virus neuroinvasion. Using an *in vitro* BBB model that exhibits the  
558 physiological characteristics of the brain endothelium [47], we demonstrated that the EU2 isolate, the  
559 most virulent strain we tested, can infect and replicate in hBLEC. Here, viral particles were released in  
560 the basolateral compartment (which would correspond to the parenchymal side) for a prolonged time  
561 (unlike the AF3 strain), potentially increasing the capacity of the EU2 strain to cross the BBB. However,  
562 this isolate did not disturb endothelial integrity. It is generally suggested that for viral invasion BBB  
563 disruption is a pivotal event. Yet, numerous studies show that neurotropic flaviviruses can reach the  
564 CNS by crossing the BBB without breaking the barrier, allowing free virus to spread in the CNS. Our  
565 findings are consistent with reports that the capacity of virus to cross the BBB to reach the CNS is not  
566 systematically the determining factor for neuropathogenicity. Increasing evidence suggests that viral  
567 entry into the CNS is often a multistep process that can occur through one of several routes. Some  
568 neurotropic viruses can directly infect the endothelial cells of the brain and release viral particles into  
569 the parenchyma. Viral neuroinvasion can thus occur *via* replication of the virus within NVU cells prior  
570 to the breakdown of the BBB. This mechanism thought to be shared by neuroinvasive viruses, including  
571 the closely related flavivirus WNV, and enhances dissemination within the CNS [83]. Our results  
572 suggest that the differential invasion of the brain by the several different USUV strains does not seem  
573 to be linked to strain-dependent BBB disturbance, but rather to a different capacity to infect and replicate  
574 in the cells forming the BBB.

575 Another interesting observation is the presence of a specific and atypical CPE following EU2  
576 lineage infection in all CNS components (with the exception of pericytes). The characteristics of CPE

577 caused by flaviviruses vary according to the host cell and involved in various factors, including viral  
578 receptors, host genetics, defective viral particles and immune response [84]. CPE induced by USUV is  
579 usually characterized by a diffuse CPE corresponding to cell rounding, shrinkage, and lysis. The atypical  
580 CPE we observed with two different isolates of EU2 was characterized by the presence of dead cells  
581 floating in clusters, and could potentially be correlated with the higher virulence of this lineage. We  
582 could expect a relation between viral infectivity and virulence, CPE thus being unique to specific USUV  
583 lineages. Cellular and/or viral factors involved in this specific CPE induced by EU2 strains remain to  
584 be determined.

585         Virulence is an adaptive process and the result of interactions between numerous factors,  
586 involving both viral and host cell factors. These could include for example tropism, induction of  
587 neuronal apoptosis, resistance to interferon, regulation of cytokines and chemokines, induction of matrix  
588 metalloproteinase, quasi-species generation, or upregulation of major histocompatibility complex class  
589 I expression. It is therefore clear that virulence is a multifactorial process and many aspects need to be  
590 studied in order to elucidate viral pathogenicity. For example, the neuroinvasive potential of WNV is  
591 strain-dependent, but mainly due to differential strain ability to reach the CNS [42]. In some cases, this  
592 difference could also be due to different replication capacities in BBB cells or directly in neurons, as  
593 already demonstrated for WNV [57] and Semliki Forest Virus [85]. It is documented that there is a close  
594 relationship between European USUV strains (nucleotide identity 99%) while there is a greater  
595 divergence between African USUV isolates (nucleotide identity 96%). Several structural and  
596 nonstructural genes (prM, E, NS1, NS3, and NS5) have exhibited greater nucleotide than amino acid  
597 divergence [70]. The virulence of flaviviruses has often been associated with E protein glycosylation  
598 [69] and glycosylation of the NS1 protein [86]. One possible viral factor of virulence is the presence of  
599 specific N-linked glycans on the E protein, correlating thus with the ability to invade the CNS  
600 [42,69,87]. All strains analyzed exhibited classical markers of neurovirulence previously described,  
601 which is consistent with the fact that all of our strains are able to invade the brain. Nevertheless, we  
602 identified specific mutations in EU2 strain (NS1: E36G, R57X, L85, NS2A: 108T, NS4B: 133S,  
603 K349R, T325X, NS5: 55I, E835D). The discovery of amino acid substitution in the RdRp domain of  
604 the NS5 protein (E3425D/E835D-NS5) in both EU2 strains is particularly interesting, as this substitution



605 is not seen in the other strains from other lineages. In addition, by analyzing other EU2 sequences  
606 available online we found this mutation in 14/15 isolates (except for JF 266698). This suggests that this  
607 substitution could be a characteristic mutation of EU2 lineage. For instance, this aa change was also  
608 found in WNV and in other neurovirulent flaviviruses (JEV, WNV and Kunjin virus (KUNV), Murray  
609 Valley encephalitis virus (MVEV)), and have been suggested to be related with viral neuroinvasiveness  
610 [21]. Furthermore, substitutions in virtually equivalent positions were associated with variation in the  
611 capacity of WNV to invade the CNS [21]. This mutation was previously described in an EU2 strain  
612 isolated from a patient with neuroinvasive disease and was suggested to impact the efficiency of viral  
613 replication and virulence which our results seem to corroborate. Indeed, NS5 protein may have an effect  
614 on the efficiency of viral replication as it codes for the RNA-dependent RNA polymerase involved in  
615 the replication complex [21]. Association of these several mutations with virulence remains to be  
616 elucidated. For this, reverse genetic systems will be helpful to allow the identification of the molecular  
617 and cellular mechanisms involved in USUV pathogenicity.

618         There is a strong probability that the strains used in this study were not derived due to extensive  
619 passaging (no more than 5 passages for all strains), so altogether our data indicate that there are intrinsic  
620 differences in the pathogenicity/virulence of USUV isolates *in vivo* and *in vitro* as previously described  
621 for other flaviviruses, such as ZIKV and WNV [40,41]. Recent studies in rodents [88],  
622 immunocompetent mice [89], and chicken embryos [90] also demonstrate different results depending  
623 on the strain used. For this reason, it is important to investigate whether the differences in virulence  
624 observed in our models have clinical relevance. As reported in the literature, neurological complications  
625 are mainly described after infection with EU2 strains, which is also a lineage frequently circulating in  
626 the south of Europe. It can consequently be hypothesized that the USUV EU2 lineage, characterized by  
627 a higher infection and viral production, longer persistence, and induction of an atypical CPE, could be  
628 more pathogenic for humans and/or birds and likely better adapted to the vector hosts.

629

## 630 **Conclusion**

631         In conclusion, our study on the pathogenic properties of USUV strains circulating in Europe  
632 contributes to a better understanding of USUV pathogenesis. To define the host and viral factors

633 involved in pathogenesis, the naturally occurring diversity in virulence among viral strains provides a  
634 robust model system. Monitoring the global diversity and distribution of circulating USUV strains, as  
635 well as characterizing their neurotropism, will aid in threat assessment and epidemiological modeling if  
636 future USUV outbreaks occur.

637

### 638 **List of abbreviations**

639 AF : Africa

640 BBB : Blood-brain barrier

641 BRDU : Bromodeoxyuridine

642 C : Capsid

643 CNS : Central nervous system

644 CPE : Cytopathic effect

645 DAMPs : Damage-associated molecular patterns

646 DENV : Dengue virus

647 Dpi : Days post infection

648 E : Envelope

649 ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

650 Eu : Europe

651 hBLEC : Human Brain-like Endothelial Cells

652 IFN : Interferon

653 Ifnar1<sup>-/-</sup> : Lacking the interferon type 1 receptor

654 IL1 $\beta$  : Interleukin 1  $\beta$

655 IL6 : Interleukin 6

656 I.p. : Intraperitoneally

657 IRF3 : Interferon regulatory factor 3

658 JEV : Japanese encephalitis virus

659 KUNV : Kunjin virus

660 LY : Lucifer Yellow

661 MDA5 : Melanoma differentiation-associated antigen 5  
662 MVEV : Murray Valley encephalitis virus  
663 MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
664 MYD88 : Myeloid differentiation primary response 88  
665 NVU : Neurovascular unit  
666 ORF : Open reading frame  
667 PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns  
668 PFA : Paraformaldehyde  
669 prM/M : Pre-membrane/membrane  
670 PRRs : Pattern recognition receptors  
671 RHEM : Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier  
672 RIG-I : Retinoic acid-inducible gene I  
673 RT-qPCR : Quantitative reverse transcriptase PCR assay  
674 TBEV : Tick-borne encephalitis virus  
675 TCID<sub>50</sub> : Tissue culture infectious dose 50%  
676 TEER : Transendothelial electrical resistance  
677 TLR : Toll-like receptor  
678 TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha  
679 USUV : Usutu virus  
680 WNV : West Nile virus  
681 ZIKV : Zika virus

682

### 683 **Acknowledgments**

684 We thank the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” (RHEM) histology facility for their  
685 histology technics and expertise, and we thank Morgane Broyon and Aurélie Covinhes for their technical  
686 assistance. We thank also, the Montpellier Rio Imaging facility for microscope imaging as well as  
687 Elisabetta Blasi and Hélène Hirbec for providing the BV2 microglia cell line.

688

689 **Funding resources**

690 This work was funded by REACTing (reference: YY/FC/2018-032) and Montpellier University of  
691 Excellence (MUSE) through ANR (the French National Research Agency) with the reference ANR-16-  
692 IDEX-0006 and the Labex EpiGenMed “Investissements d’avenir”, program “ANR-10-LABX-12-01”,

693

694 **References**

- 695 1. McIntosh BM. Usutu (SAAr 1776); nouvel arbovirus du groupe B. *Int Cat Arboviruses*.  
696 1985;3:1059–60.
- 697 2. Woodall J. The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the  
698 26 years ending December 1963. *Proc E Afr Acad*. 1964. p. 141–146.
- 699 3. Calisher CH, Gould EA. Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res*. 2003;59:1–19.
- 700 4. POIDINGER M, HALL RA, MACKENZIE JS. Molecular Characterization of the Japanese  
701 Encephalitis Serocomplex of the Flavivirus Genus. *Virology*. 1996;218:417–21.
- 702 5. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu  
703 virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe.  
704 *Emerg Infect Dis* [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention; 2002 [cited 2018 Mar  
705 2];8:652–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095429>
- 706 6. Chvala S, Kolodziejek J, Nowotny N, Weissenböck H. Pathology and viral distribution in fatal  
707 Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. *J Comp Pathol*. 2004;
- 708 7. Becker N, Jöst H, Ziegler U, Eiden M, Höper D, Emmerich P, et al. Epizootic emergence of Usutu  
709 virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS One*. 2012;7.
- 710 8. Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csörgo T, Lussy H, et al. Emergence of usutu virus in  
711 Hungary. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3870–4.
- 712 9. Calzolari M, Gaibani P, Bellini R, Defilippo F, Pierro A, Albieri A, et al. Mosquito, Bird and  
713 Human Surveillance of West Nile and Usutu Viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010.  
714 Coffey LL, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2018 Nov 20];7:e38058. Available from:  
715 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666446>
- 716 10. Bakonyi T, Gould EA, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N. Complete genome analysis

717 and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the  
718 South African Strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology*. 2004;328:301–10.

719 11. Pfeffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites  
720 and Vectors*. BioMed Central; 2010. p. 35.

721 12. Publicité et circulation motorisée dans les espaces naturels.

722 13. Lelli R, Savini G, Teodori L, Filipponi G, Di Gennaro A, Leone A, et al. Serological evidence of  
723 USUTU virus occurrence in north-eastern Italy. *Zoonoses Public Health*. 2008;

724 14. Cadar D, Becker N, de Mendonca Campos R, Börstler J, Jöst H, Schmidt-Chanasit J. Usutu virus  
725 in bats, Germany, 2013. *Emerg. Infect. Dis*. 2014. p. 1771–3.

726 15. Blázquez AB, Escribano-Romero E, Martín-Acebes MA, Petrovic T, Saiz JC. Limited  
727 susceptibility of mice to Usutu virus (USUV) infection and induction of flavivirus cross-protective  
728 immunity. *Virology* [Internet]. 2015 [cited 2018 Apr 26];482:67–71. Available from:  
729 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682215001567>

730 16. Durand B, Haskouri H, Lowenski S, Vachiery N, Beck C, Lecollinet S. Seroprevalence of West  
731 Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: Dog as an alternative  
732 WNV sentinel species? *Epidemiol Infect* [Internet]. 2016 [cited 2018 Aug 18];144:1857–64. Available  
733 from: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S095026881600011X](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S095026881600011X)

734 17. Bournez L, Umhang G, Faure E, Boucher J-M, Boué F, Jourdain E, et al. Exposure of Wild  
735 Ungulates to the Usutu and Tick-Borne Encephalitis Viruses in France in 2009-2014: Evidence of  
736 Undetected Flavivirus Circulation a Decade Ago. *Viruses* 2020 [Internet]. 2019 [cited 2020 May  
737 20];12:10. Available from: [www.mdpi.com/journal/viruses](http://www.mdpi.com/journal/viruses)

738 18. Nikolay B, Diallo M, Boye CSB, Sall AA. Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne Zoonotic Dis*  
739 [Internet]. 2011 [cited 2018 Mar 8];11:1417–23. Available from:  
740 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767160>

741 19. Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grottola A, Sabbatini AMT, Tagliazucchi S. Rapid  
742 communications First human case of usutu virus neuro invasive infection , italy , august - september  
743 2009. 2009;5–6.

744 20. Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P, et al. Usutu virus infection in a

745 patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. Euro Surveill  
746 [Internet]. 2009 [cited 2018 Apr 2];14. Available from:  
747 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/20070935/?i=3&from=cavrini 2009 eurosurveillance](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/20070935/?i=3&from=cavrini+2009+eurosurveillance)  
748 21. Gaibani P, Cavrini F, Gould EA, Rossini G, Pierro A, Landini MP, et al. Comparative Genomic  
749 and Phylogenetic Analysis of the First Usutu Virus Isolate from a Human Patient Presenting with  
750 Neurological Symptoms. PLoS One. 2013;  
751 22. Cavrini F, Pepa ME Della, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, et al. A rapid and  
752 specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal  
753 fluid. J Clin Virol [Internet]. 2011 [cited 2018 Apr 2];50:221–3. Available from:  
754 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653210004592>  
755 23. Grottola A, Marcacci M, Tagliazucchi S, Gennari W, Di Gennaro A, Orsini M, et al. Usutu virus  
756 infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. Clin Microbiol  
757 Infect. 2017;23:33–7.  
758 24. Caracciolo I, Mora-Cardenas E, Aloise C, Carletti T, Segat L, Burali MS, et al. Comprehensive  
759 response to Usutu virus following first isolation in blood donors in the Friuli Venezia Giulia region of  
760 Italy: Development of recombinant NS1-based serology and sensitivity to antiviral drugs. Bowen RA,  
761 editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. Public Library of Science; 2020 [cited 2020 May  
762 18];14:e0008156. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0008156>  
763 25. Percivalle E, Cassaniti I, Sarasini A, Rovida F, Adzasehoun KMG, Colombini I, et al. West nile or  
764 usutu virus? A three-year follow-up of humoral and cellular response in a group of asymptomatic  
765 blood donors. Viruses. MDPI AG; 2020;12.  
766 26. Carletti F, Colavita F, Rovida F, Percivalle E, Baldanti F, Ricci I, et al. Expanding usutu virus  
767 circulation in italy: Detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. Eurosurveillance.  
768 European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); 2019;24.  
769 27. Pacenti M, Sinigaglia A, Martello T, De Rui E, Franchin E, Pagni S, et al. Clinical and virological  
770 findings in patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018. Eurosurveillance [Internet]. 2019  
771 [cited 2019 Nov 28];24. Available from: [https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-](https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900180)  
772 [7917.ES.2019.24.47.1900180](https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900180)

773 28. Nagy A, Mezei E, Nagy O, Bakonyi T, Csonka N, Kaposi M, et al. Extraordinary increase in West  
774 Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Eurosurveillance*.  
775 European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC); 2019;24.

776 29. Santini M, Vilibic-Cavlek T, Barsic B, Barbic L, Savic V, Stevanovic V, et al. First cases of  
777 human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August–September 2013: clinical and  
778 laboratory features. *J Neurovirol*. 2014;

779 30. Vilibic-Cavlek T, Savic V, Sabadi D, Peric L, Barbic L, Klobucar A, et al. Prevalence and  
780 molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the ‘One health’  
781 context, 2018. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2019 [cited 2020 May  
782 18];66:1946–57. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.13225>

783 31. Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, Gutierrez S, Gil P, Constant O, et al. Human Usutu Virus  
784 Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg Infect Dis*  
785 [Internet]. 2018 [cited 2018 Apr 5];24. Available from: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/5/17-](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/5/17-1122_article.htm)  
786 [1122\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/5/17-1122_article.htm)

787 32. Bakonyi T, Jungbauer C, Aberle SW, Kolodziejek J, Dimmel K, Stiasny K, et al. Usutu virus  
788 infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – Raising awareness for diagnostic  
789 challenges. *Eurosurveillance*. 2017;22.

790 33. Aberle SW, Kolodziejek J, Jungbauer C, Stiasny K, Aberle JH, Zoufaly A, et al. Increase in human  
791 West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Eurosurveillance* [Internet]. 2018 [cited 2018  
792 Nov 1];23:1800545. Available from: [https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-](https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545)  
793 [7917.ES.2018.23.43.1800545](https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545)

794 34. Cadar D, Maier P, Müller S, Kress J, Chudy M, Bialonski A, et al. Blood donor screening for West  
795 Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016.  
796 *Eurosurveillance* [Internet]. 2017 [cited 2018 Apr 2];22:30501. Available from:  
797 <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22764>

798 35. Domanović D, Gossner CM, Lieshout-Krikke R, Mayr W, Baroti-Toth K, Dobrota AM, et al. West  
799 Nile and usutu virus infections and challenges to blood safety in the European Union. *Emerg Infect*  
800 *Dis*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2019;25:1050–7.

801 36. Zaaijer HL, Slot E, Molier M, Reusken CBEM, Koppelman MHGM. Usutu virus infection in  
802 Dutch blood donors. *Transfusion*. Blackwell Publishing Inc.; 2019;59:2931–7.

803 37. Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, et al. Usutu virus: A new  
804 threat? *Epidemiol Infect* [Internet]. 2019 [cited 2019 Aug 29];147:e232. Available from:  
805 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31364580>

806 38. Cadar D, Lühken R, van der Jeugd H, Garigliany M, Ziegler U, Keller M, et al. Widespread  
807 activity of multiple lineages of Usutu virus, Western Europe, 2016. *Eurosurveillance*. 2017;22:1–7.

808 39. Nikolay B, Dupressoir A, Firth C, Faye O, Boye CS, Diallo M, et al. Comparative full length  
809 genome sequence analysis of usutu virus isolates from Africa. *Virology Journal*;  
810 2013;10:1. Available from: *Virology Journal*

811 40. Pérez-Ramírez E, Llorente F, Del Amo J, Fall G, Sall AA, Lubisi A, et al. Pathogenicity  
812 evaluation of twelve west nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse  
813 model: Discrimination between three pathogenicity categories. *J Gen Virol*. Microbiology Society;  
814 2017;98:662–70.

815 41. Simonin Y, van Riel D, Van de Perre P, Rockx B, Salinas S. Differential virulence between Asian  
816 and African lineages of Zika virus. Rico-Hesse R, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 [cited  
817 2018 Feb 21];11:e0005821. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28934211>

818 42. Beasley DWC, Li L, Suderman MT, Barrett ADT. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile  
819 virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology*. Elsevier; 2002;296:17–23.

820 43. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn*  
821 *Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol*. Springer-Verlag; 1931;162:480–3.

822 44. Clé M, Barthelemy J, Desmetz C, Foulongne V, Lapeyre L, Bolloré K, et al. Study of Usutu virus  
823 neuropathogenicity in mice and human cellular models. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of  
824 Science (PLoS); 2020;14:e0008223.

825 45. Nikolay B, Weidmann M, Dupressoir A, Faye O, Boye CS, Diallo M, et al. Development of a  
826 Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa  
827 and Europe. *J Virol Methods* [Internet]. 2014 [cited 2018 Apr 2];197:51–4. Available from:  
828 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093413003868>



829 46. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells  
830 by a v-raf / v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* [Internet]. *J Neuroimmunol*; 1990 [cited 2020  
831 Jun 23];27:229–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2110186/>

832 47. Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, et al. A stable and reproducible  
833 human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One*. Public Library of  
834 Science; 2014;9.

835 48. Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, et al. In vitro  
836 discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells  
837 and brain pericytes. *Brain Res*. Elsevier; 2015;1594:15–26.

838 49. Morrison TE, Diamond MS. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity.  
839 *J Virol* [Internet]. 2017 [cited 2019 Sep 13];91. Available from:  
840 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28148798>

841 50. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. *Viruses*. Multidisciplinary Digital  
842 Publishing Institute (MDPI); 2012. p. 62–82.

843 51. Samuel MA, Diamond MS. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection  
844 by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol*. 2005;79:13350–61.

845 52. Johnson AJ, Roehrig JT. New Mouse Model for Dengue Virus Vaccine Testing. *J Virol*. American  
846 Society for Microbiology (ASM); 1999;73:783.

847 53. Weissenböck H, Bakonyi T, Chvala S, Nowotny N. Experimental Usutu virus infection of suckling  
848 mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination. *Acta Neuropathol*. 2004;108:453–60.

849 54. Salinas S, Constant O, Desmetz C, Barthelemy J, Lemaitre J-M, Milhavet O, et al. Deleterious  
850 effect of Usutu virus on human neural cells. Beasley DWC, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet].  
851 2017 [cited 2018 Feb 21];11:e0005913. Available from:  
852 <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005913>

853 55. Ramesh G, Maclean AG, Philipp MT. Cytokines and Chemokines at the Crossroads of  
854 Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators Inflamm* [Internet].  
855 Hindawi Publishing Corporation; 2013;2013:20. Available from: <http://dx>.

856 56. Bhowmick S, Duseja R, Das S, Appaiahgiri MB, Vrati S, Basu A. Induction of IP-10 (CXCL10) in

857 astrocytes following Japanese encephalitis. *Neurosci Lett* [Internet]. 2007 [cited 2018 Nov  
858 30];414:45–50. Available from: [https://ac.els-cdn.com/S0304394006012341/1-s2.0-](https://ac.els-cdn.com/S0304394006012341/1-s2.0-S0304394006012341-main.pdf?_tid=4afa2554-27ce-455e-8e74-231abed7812&acdnat=1543584302_702a5eb0d51f4ece8af4fd34033dbf29)  
859 [S0304394006012341-main.pdf?\\_tid=4afa2554-27ce-455e-8e74-](https://ac.els-cdn.com/S0304394006012341-main.pdf?_tid=4afa2554-27ce-455e-8e74-231abed7812&acdnat=1543584302_702a5eb0d51f4ece8af4fd34033dbf29)  
860 [231abed7812&acdnat=1543584302\\_702a5eb0d51f4ece8af4fd34033dbf29](https://ac.els-cdn.com/S0304394006012341-main.pdf?_tid=4afa2554-27ce-455e-8e74-231abed7812&acdnat=1543584302_702a5eb0d51f4ece8af4fd34033dbf29)

861 57. Hussmann KL, Samuel MA, Kim KS, Diamond MS, Fredericksen BL. Differential Replication of  
862 Pathogenic and Nonpathogenic Strains of West Nile Virus within Astrocytes. *J Virol*. American  
863 Society for Microbiology; 2013;87:2814–22.

864 58. Bruno V, Copani A, Besong G, Scoto G, Nicoletti F. Neuroprotective activity of chemokines  
865 against N-methyl-D-aspartate or  $\beta$ -amyloid-induced toxicity in culture. *Eur J Pharmacol*. Elsevier;  
866 2000;399:117–21.

867 59. Nakayama T, Shirane J, Hieshima K, Shibano M, Watanabe M, Jin Z, et al. Novel antiviral activity  
868 of chemokines. *Virology*. Academic Press; 2006;350:484–92.

869 60. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, et al. Cutting Edge: Influenza  
870 A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in  
871 Human Lung Epithelial Cells. *J Immunol*. The American Association of Immunologists;  
872 2007;178:3368–72.

873 61. Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as  
874 alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain  
875 inflammation. *ALTEX*. ALTEX; 2009. p. 83–94.

876 62. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2003  
877 [cited 2020 May 26];196:430–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.10333>

878 63. Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J*  
879 *Neurosci Res*. John Wiley & Sons, Ltd; 1998;53:637–44.

880 64. Wang K, Wang H, Lou W, Ma L, Li Y, Zhang N, et al. IP-10 promotes blood-brain barrier damage  
881 by inducing tumor necrosis factor alpha production in Japanese encephalitis. *Front Immunol*. 2018;9.

882 65. Spindler KR, Hsu TH. Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends Microbiol* [Internet].  
883 Elsevier Ltd; 2012;20:282–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2012.03.009>

884 66. Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S, Nerurkar VR. Reversal of West Nile virus-induced blood-

885 brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor.  
886 *Virology*. 2010;397:130–8.

887 67. Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, et al. PECAM-1 stabilizes  
888 blood-brain barrier integrity and favors paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier  
889 during neuroinflammation. *Front Immunol*. Frontiers Media S.A.; 2019;10.

890 68. Loureiro JA, Andrade S, Duarte A, Neves AR, Queiroz JF, Nunes C, et al. Resveratrol and grape  
891 extract-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of Alzheimer’s disease. *Molecules*. MDPI  
892 AG; 2017;22.

893 69. Carbaugh DL, Lazear HM. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection  
894 and Pathogenesis. *J Virol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2020 [cited 2020 Jun 23];94.  
895 Available from: <https://jvi.asm.org/content/94/11/e00104-20>

896 70. Engel D, Jöst H, Wink M, Börstler J, Bosch S, Garigliany MM, et al. Reconstruction of the  
897 evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and  
898 Africa. *MBio*. 2016;7:1–12.

899 71. De Oliveira Souza IN, Frost PS, França J V., Nascimento-Viana JB, Neris RLS, Freitas L, et al.  
900 Acute and chronic neurological consequences of early-life zika virus infection in mice. *Sci Transl Med*  
901 [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2018 [cited 2020 Jun 23];10.  
902 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29875203/>

903 72. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat. Rev.*  
904 *Neurol*. *Nat Rev Neurol*; 2011. p. 31–40.

905 73. Kirkman NJ, Libbey JE, Wilcox KS, White HS, Fujinami RS. Innate but not adaptive immune  
906 responses contribute to behavioral seizures following viral infection. *Epilepsia* [Internet]. *Epilepsia*;  
907 2010 [cited 2020 Jul 1];51:454–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19845729/>

908 74. Chen C-J, Ou Y-C, Li J-R, Chang C-Y, Pan H-C, Lai C-Y, et al. Infection of Pericytes In Vitro by  
909 Japanese Encephalitis Virus Disrupts the Integrity of the Endothelial Barrier. *J Virol*. 2014;88:1150–  
910 61.

911 75. Chang CY, Li JR, Chen WY, Ou YC, Lai CY, Hu YH, et al. Disruption of in vitro endothelial  
912 barrier integrity by Japanese encephalitis virus-infected astrocytes. *Glia*. John Wiley and Sons Inc.;

913 2015;63:1915–32.

914 76. Bhatt RS, Kothari ST, Gohil DJ, D’Souza M, Chowdhary AS. Novel evidence of microglial  
915 immune response in impairment of Dengue infection of CNS. *Immunobiology*. Elsevier GmbH;  
916 2015;220:1170–6.

917 77. Harder DR, Zhang C, Gebremedhin D. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic  
918 activity. *News Physiol Sci*. *News Physiol Sci*; 2002;17:27–31.

919 78. Rock B, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, et al. Role of Microglia in  
920 Central Nervous System Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:942–64.

921 79. Palus M, Bílý T, Elsterová J, Langhansová H, Salát J, Vancová M, et al. Infection and injury of  
922 human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol*. *Microbiology Society*; 2014;95:2411–  
923 26.

924 80. Simonin Y, Loustalot F, Desmetz C, Foulongne V, Constant O, Fournier-Wirth C, et al. Zika Virus  
925 Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine*.  
926 Elsevier B.V.; 2016;12:161–9.

927 81. Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine*. 2013. p.  
928 461–71.

929 82. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3  
930 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med*. 2004;10:1366–73.

931 83. Morrey JD, Olsen AL, Siddharthan V, Motter NE, Wang H, Taro BS, et al. Increased blood-brain  
932 barrier permeability is not a primary determinant for lethality of West Nile virus infection in rodents. *J*  
933 *Gen Virol*. *J Gen Virol*; 2008;89:467–73.

934 84. Virology DB-IF, 2001 undefined. *Flaviviruses*. *ci.nii.ac.jp* [Internet]. [cited 2020 Jun 23];  
935 Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012861997/>

936 85. Fazakerley J. Pathogenesis of Semliki Forest Virus Encephalitis. *Artic J NeuroVirology* [Internet].  
937 2003 [cited 2020 May 18]; Available from: <https://www.researchgate.net/publication/10983327>

938 86. Whiteman MC, Wicker JA, Kinney RM, Huang CYH, Solomon T, Barrett ADT. Multiple amino  
939 acid changes at the first glycosylation motif in NS1 protein of West Nile virus are necessary for  
940 complete attenuation for mouse neuroinvasiveness. *Vaccine* [Internet]. *Vaccine*; 2011 [cited 2020 Jun

941 23];29:9702–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21945257/>

942 87. Botha EM, Markotter W, Wolfaardt M, Paweska JT, Swanepoel R, Palacios G, et al. Genetic  
943 determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerg Infect Dis* [Internet].  
944 Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2008 [cited 2020 Jun 23];14:222–30. Available  
945 from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18258114/>

946 88. Diagne M, Ndione M, Di Paola N, Fall G, Bedekelabou A, Sembène P, et al. Usutu Virus Isolated  
947 from Rodents in Senegal. *Viruses* [Internet]. 2019 [cited 2019 Feb 25];11:181. Available from:  
948 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30795524>

949 89. Benzarti E, Sarlet M, Franssen M, Desmecht D, Schmidt-Chanasit J, Garigliany MM. New  
950 insights into the susceptibility of immunocompetent mice to Usutu virus. *Viruses*. MDPI AG;  
951 2020;12.

952 90. Benzarti E, Rivas J, Sarlet M, Franssen M, Moula N, Savini G, et al. Usutu virus infection of  
953 embryonated chicken eggs and a chicken embryo-derived primary cell line. *Viruses*. 2020;12.

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965 **Figures Legends**

966

967 **Table 1. Description of human cases of USUV infection worldwide**

968 This table summarizes acute human cases of USUV infection described in the literature and the viral  
969 strains involved. CAR = Central African Republic.

970

971 **Table 2. Country, year of isolation, host source and passage history of the USUV strains used in**  
972 **the study**

973

974 **Figure 1. Clinical signs of USUV infection in suckling immunocompetent mice according to strains**

975 (A) Survival rates of neonatal Swiss mice (6 days old) intraperitoneally inoculated with  $10^3$   
976 TCID<sub>50</sub>/mouse of six different USUV lineages. CT = control mice. EU2 strain appears to be the most  
977 lethal strain while the mortality is delayed for the AF3 strain. (B) Onset date of symptoms in USUV-  
978 infected suckling mice. Mice were monitored daily until clinical signs of disease were displayed and  
979 then were euthanized. Symptoms appeared at around 5 dpi for all strains excepted for AF3 (9 dpi).  
980 Epilepsy is observed only in mice infected by EU2. n = 6 for each group. (C) Viral burden in blood and  
981 brain was measured by RT-qPCR assay at 6 dpi and indicated by TCID<sub>50</sub> equivalent per mL or per  
982 gram. (D) Transverse sections of the brain (cerebellum) of USUV-infected mice at 6 dpi showing the  
983 presence of viral antigen after pan flavivirus staining (associated with luxol blue).

984

985 **Figure 2. USUV isolates differentially induce cellular infiltration, apoptosis and inflammation in**  
986 **the mice brain**

987 (A) Left panel. Immunohistochemical CD45 staining (associated with luxol blue) showing inflammatory  
988 infiltrates in the infected brain (brown staining) at 6 dpi. Some cells present caspase 3 staining after  
989 immunohistochemistry. Right panel. Quantification of CD45 positive cells and caspase 3 positive cells  
990 in USUV-infected brain compared to CT. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01. (B) qRT-PCR analysis of TNF $\alpha$ , IL6,  
991 IFN $\beta$ , and IL1 $\beta$  mRNA from brain collected at 6 dpi. Each histogram represents the mean  $\pm$  SEM from  
992 6 independent mice normalized to CT.

993

994 **Figure 3. Comparative virulence between USUV strains in primary human astrocytes**

995 Primary human astrocytes were infected with the six lineages of USUV at a MOI of 0,1. (A) Left panel.  
996 Bright light images of CT- and USUV-infected astrocytes showing at 7 dpi an atypical CPE which  
997 appeared specifically with the EU2 strain. This CPE is characterized by dark clustered cells that detach  
998 from the cell mat. Right panel. Supernatants from infected cells were collected at 2 and 7 dpi and  
999 subjected to TCID50 measurement on Vero cells. EU2 strain replicates longer in astrocytes. Results are  
1000 expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiment. (B) Apoptosis (4 dpi) and cellular proliferation  
1001 (7dpi) measured by MTT and BrDU are affected by USUV infection. (C) Left panel. Mock and EU2  
1002 USUV-infected cells were fixed at 2 dpi and labeled with the pan-flavivirus antibody (in green) or  
1003 double stranded-RNA antibody (in green) by indirect immunofluorescence. Nuclei are labeled with  
1004 Hoechst (in blue) immunofluorescence (x20 and x40). The white square represents a zoom on infected  
1005 cells. Scale bar = 50  $\mu$ m. Right panel. Quantification of infected cells at 2 dpi (using pan flavivirus  
1006 antibody) showing more infected cells with the EU2 strain (3 independent replicates).

1007

1008 **Figure 4. Infection of astrocytes by USUV strains leads to different profiles in the secretion and**  
1009 **expression of pro-inflammatory cytokines**

1010 (A) qRT-PCR analysis of TNF $\alpha$ , CXCL10, CCL5, and IL6 mRNA collected at 2 dpi from human  
1011 astrocytes cells infected or not by USUV. Results are expressed as means of the fold regulation. (B)  
1012 ELISA analyses of CXCL10, CCL5, and IL6 (pg/mL) at 2 dpi. Each histogram represents the  
1013 mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments. (C) qRT-PCR analysis of RIG-1, MDA-5, TLR3, TLR7,  
1014 INF- $\beta$ , MYD88, and IRF3 mRNA collected at 2 dpi from human infected-astrocytes. Results are  
1015 expressed as means of the fold regulation normalized to CT. \*\* p <0.01 compared to CT.

1016

1017 **Figure 5. USUV strains replicate differentially in murine microglia and EU2 strains persist longer**

1018 Murine microglia were infected with USUV strains at a MOI of 0,1. (A) Left panel. Bright light images  
1019 of control and USUV-infected microglia at 5 dpi. We observe an atypical CPE in EU2 infected cells.  
1020 Right panel. Supernatants from infected cells (MOI 0,1) were collected at 2, 5, and 7dpi, and subjected

1021 to TCID50 measurement. Viral production in USUV-infected microglia shows difference in term of  
1022 replication and persistence between strains, with greater virulence for EU2. (B) Left panel. USUV-  
1023 infected cells were fixed at 2 dpi and labeled with the pan-flavivirus antibody (in red) as showed for  
1024 EU2 strain. Scale bar = 50  $\mu$ m. The corresponding quantification is indicated on the right panel. (C) RT-  
1025 qPCR analysis of TNF $\alpha$ , CXCL10, CCL5, IL6, and IFN $\beta$  of mRNA collected at 2 dpi from infected and  
1026 non-infected (CT) microglial cells. (D) Analyses of CXCL10 by ELISA in the supernatants of CT- or  
1027 USUV-infected microglia at 2 dpi. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05, and \*\* p <0.01  
1028 compared to CT.

1029

1030 **Figure 6. EU2 USUV strain is more virulent and persistent longer in different brain cells**

1031 Murine neuronal (A), human pericyte (B), and human endothelial (C) cells cultures were infected with  
1032 USUV at a MOI of 0,1. Bright light images of CT- and USUV-infected neuron at 4 dpi (A) and  
1033 endothelial cells at 6 dpi (C) show atypical CPE in EU2 condition while infection induces no CPE in  
1034 pericytes at 4 dpi (B). Viral quantification for each cells type are expressed in TCID50/mL. Results are  
1035 expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiment.

1036

1037 **Figure 7. USUV efficiently replicates in a human model of the blood-brain barrier without**  
1038 **inducing alteration of endothelium integrity**

1039 (A) Human *in vitro* BBB model composed by CD34<sup>+</sup> blood cord-derived endothelial cells cultured on  
1040 transwell filters and placed on top of pericytes. (B) hBLECs were infected with USUV EU2 and AF3 at  
1041 MOI 0.1. Viral titers from both compartments are indicated at 4, 7 and 10 dpi. (\*p<0.05). (C)  
1042 Permeability (Pe) of the Lucifer Yellow (LY) paracellular marker and transendothelial electrical  
1043 resistance (TEER) was measured at 10 dpi. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 3 independent  
1044 experiment. NS = not significant. (D) Immunofluorescence of actin and Zonula occludens (Zo)-1  
1045 staining showing no perturbation of endothelium structure (10 dpi). Scale bar = 50  $\mu$ m.

1046

1047

1048



1049 **Figure 8. Genetic diversity of USUV strains**

1050 (A) Amino acid % identity of the viral polyprotein (MUSCLE, EMBL-EBI). Viral strains and associated  
1051 lineage are indicated in the table. (B) Annotated viral genome and subsequent viral proteins are shown.  
1052 A zoom on specific known virulence motifs is presented with amino acid position in the relative viral  
1053 protein (up) or in the polyprotein (down). Each amino acid is highlighted with a specific color.  
1054

Country	Year	Number	Sample	Clinical signs	Studied population	Identified strains	Ref
CAR	1981	1	Blood	Eruptive fever	Clinical case	Africa 3	18
Burkina Faso	2004	1	Blood	Fever and jaundice	Clinical case	?	18
Italy	2009	1	CSF	Meningoencephalitis	Clinical case	Europe 1	19
	2009	1	Blood	Encephalitis	Clinical case	Europe 2	20-21
	2008-2009	3/44	CSF	Meningoencephalitis	Meningoencephalitis patients	?	22
	2008-2011	8/306 + 2/609	CSF / Blood	Meningoencephalitis / Healthy	Meningoencephalitis patients (CSF), various healthy and sick subjects (serum)	?	23
	2018	1/44	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 1	24
	2016-2018	25/73964	Blood	Healthy	Blood donors	?	25
	2017-2018	9	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 2, Europe 3 and Europe 4	26
	2017-2018	8/1967	Blood / Urine	Neuroinvasive diseases / Fever / Arthralgia / Myalgia	Patients with suspected arboviral infection	Europe 2	27
Croatia	2013	3/95	Blood	Meningoencephalitis	Meningoencephalitis patients	?	29
	2018	3/178	Blood / Urine	Neuroinvasive diseases	Neuroinvasive cohort	Europe 2	30
Germany	2016	1	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 3	34
Netherlands	2018	7/12040	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 3	36
France	2016	1/166	CSF	Idiopathic facial paralysis	Patients with infection and/or neurological signs	Africa 2	31
Austria	2017	6/12047	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 2	32
	2018	18/31598	Blood	Healthy / Rash	Blood donors	Europe 2 and Africa 3	33
Hungary	2018	1	Blood	Aseptic meningitis	Clinical case	Europe 2	28

Table 1

Lineage	Country of isolation	Year of isolation	Isolation source	Number of passages	Ref/accession number
Europe 1	Austria	2001	Avian	4	AY453411.1
Europe 2	Italy	2017	Avian	3	TE20421
Europe 3	France	2015	Avian	4	KX601690
Europe 5	Germany	2016	Avian	3	KY113091
Africa 2	France	2015	Avian	3	KX601692
Africa 3	France	2018	Avian	4	AF4997

Table 2

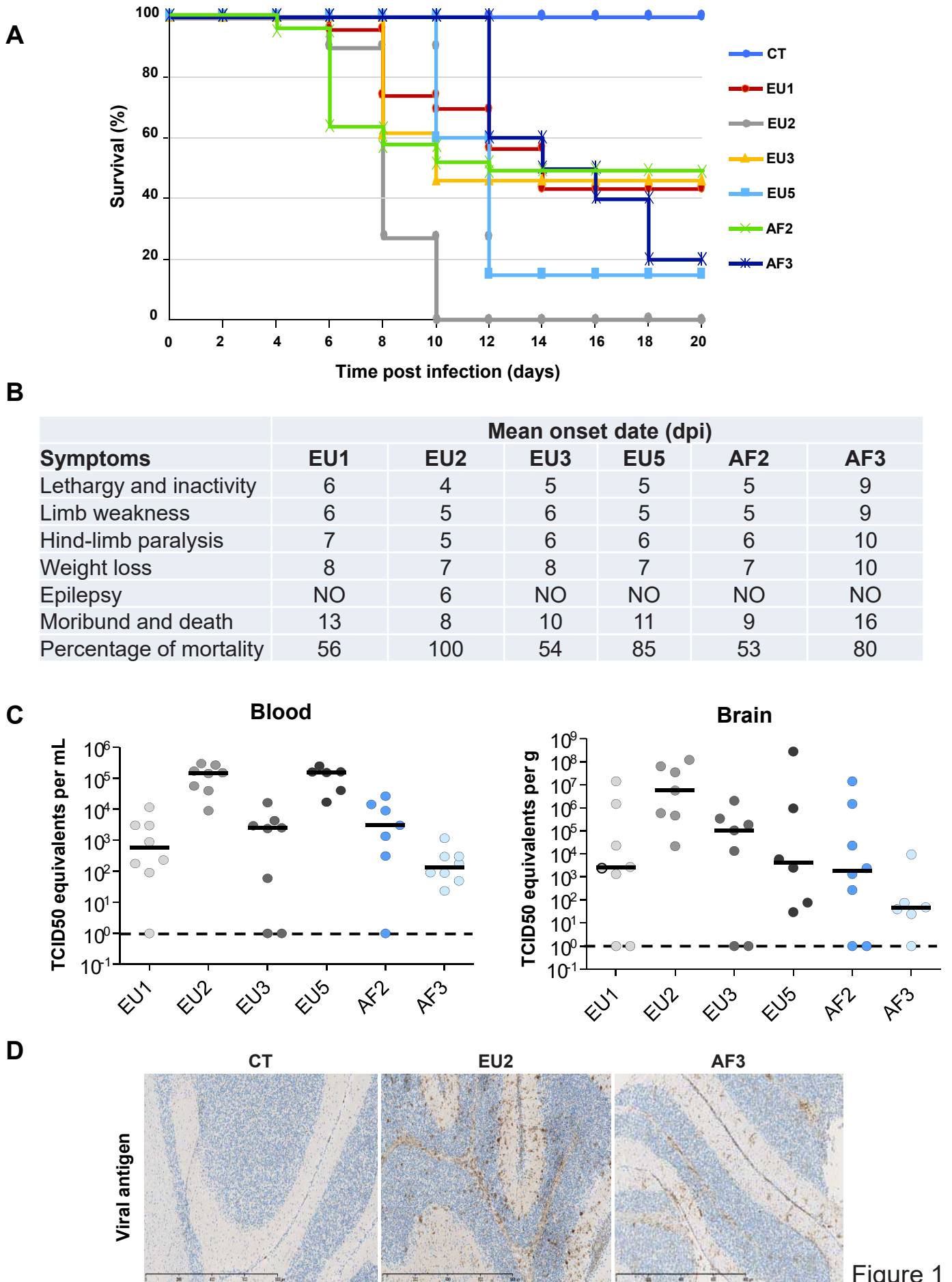
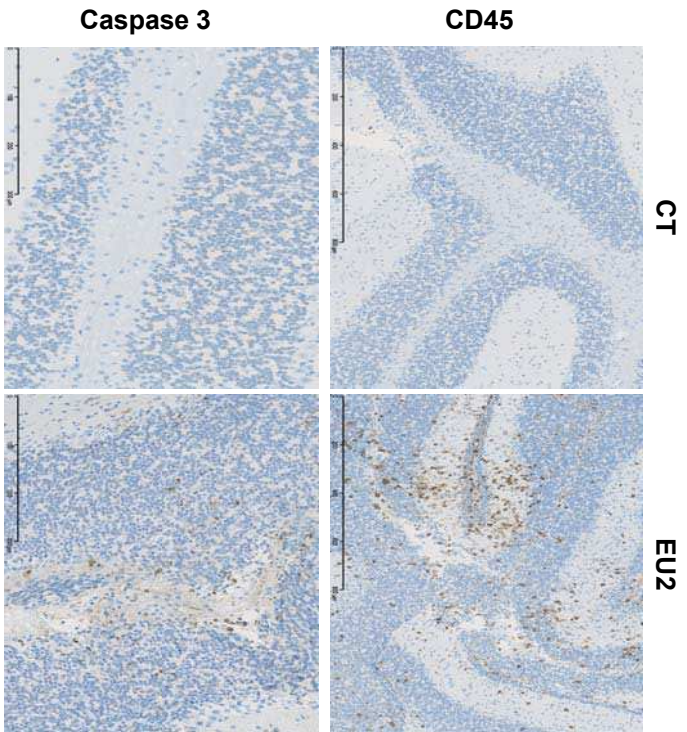
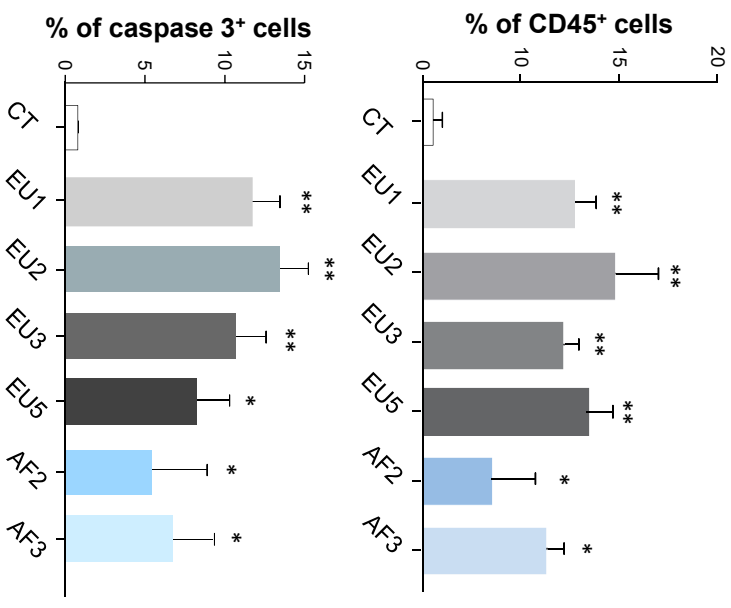
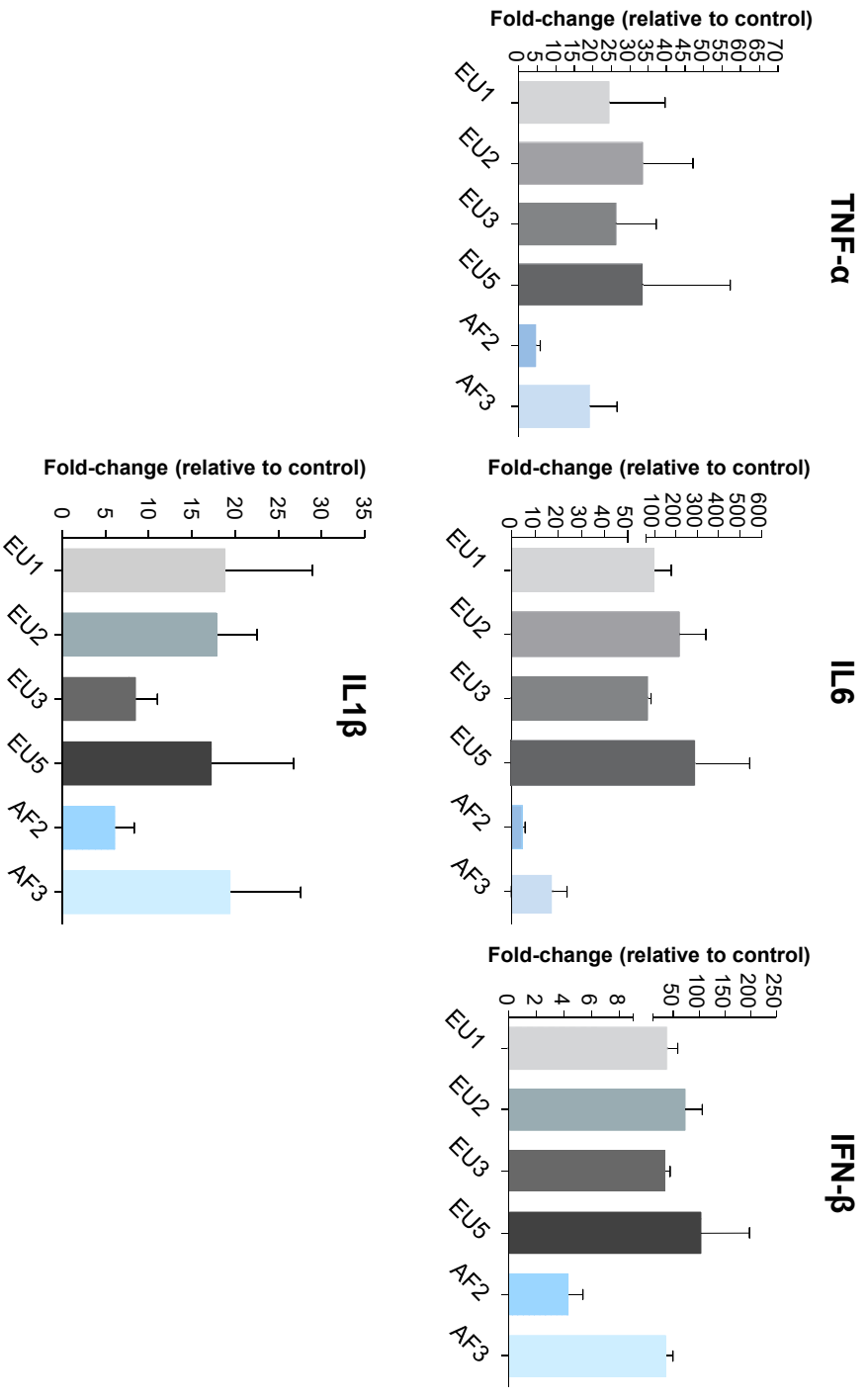


Figure 1

**A****Cerebellum****B****Figure 2**

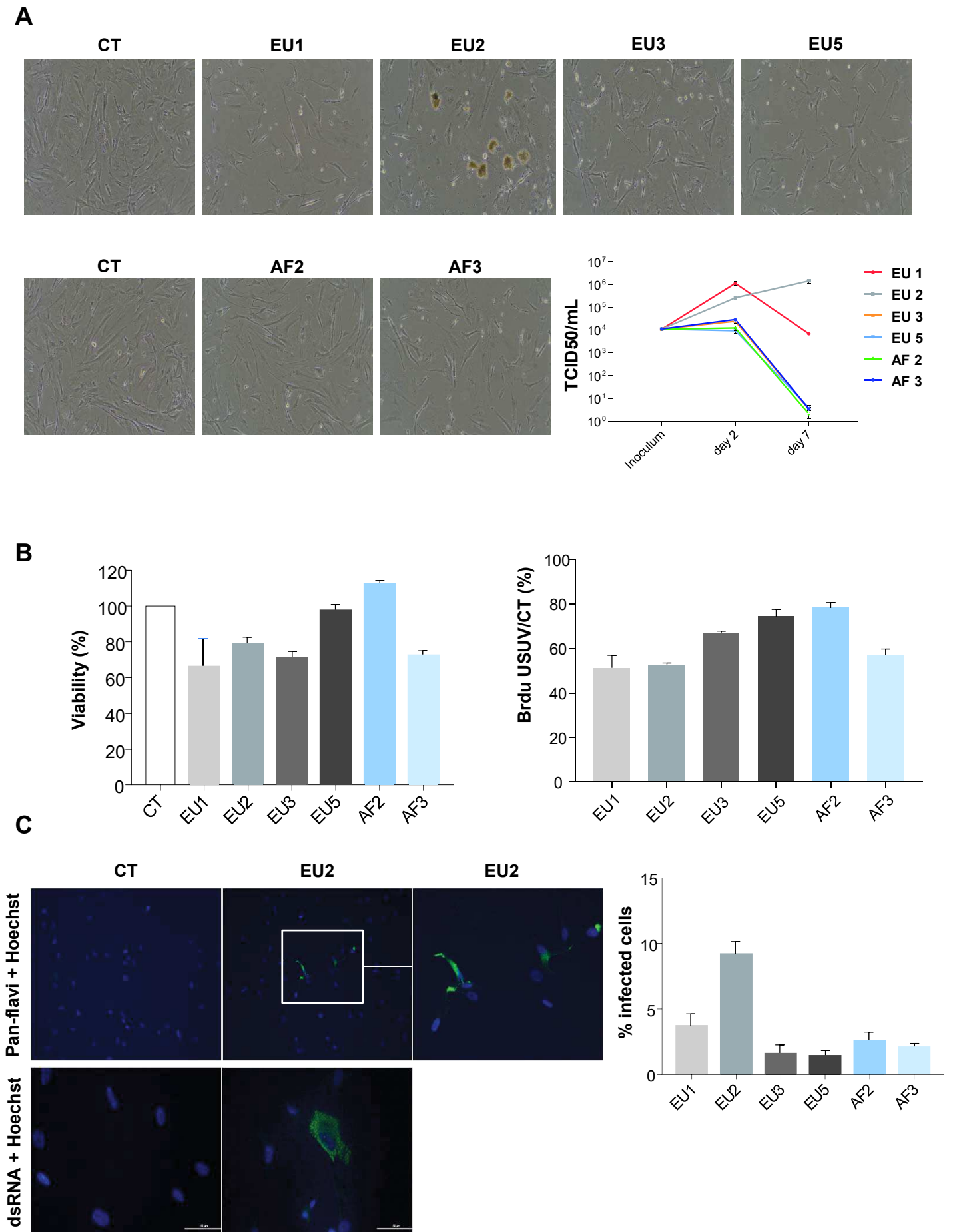


Figure 3

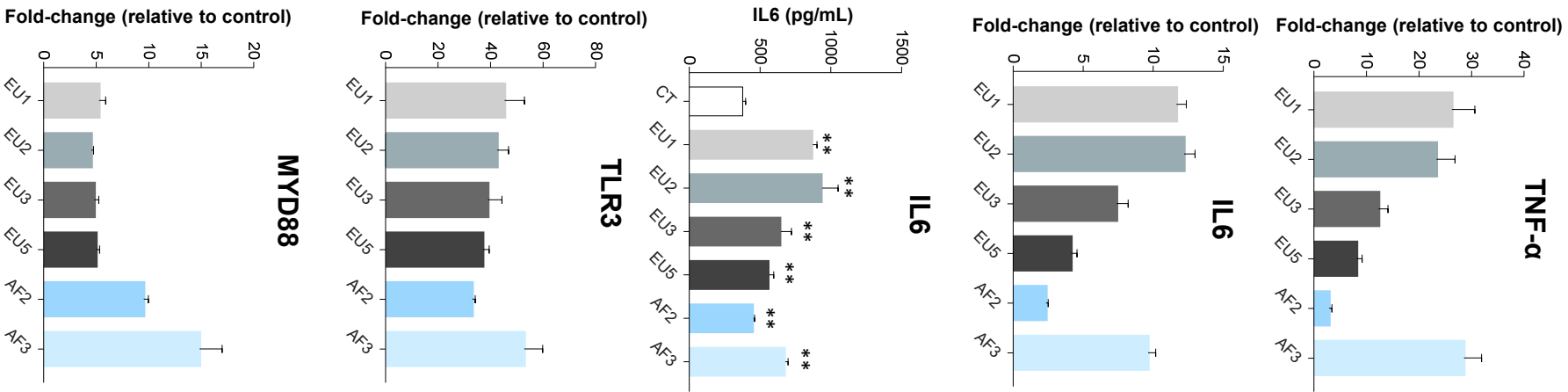
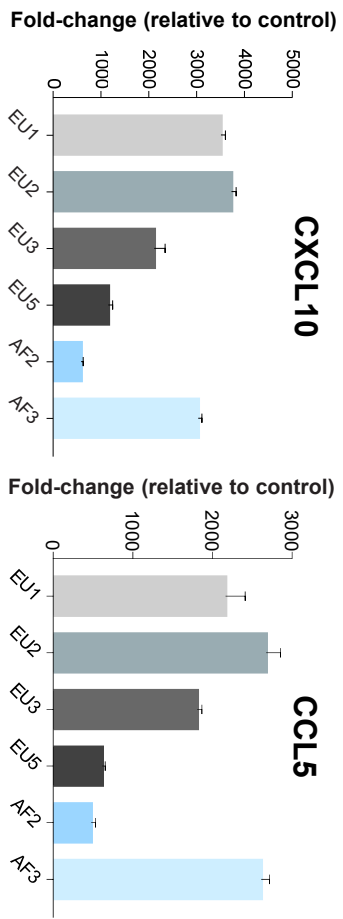
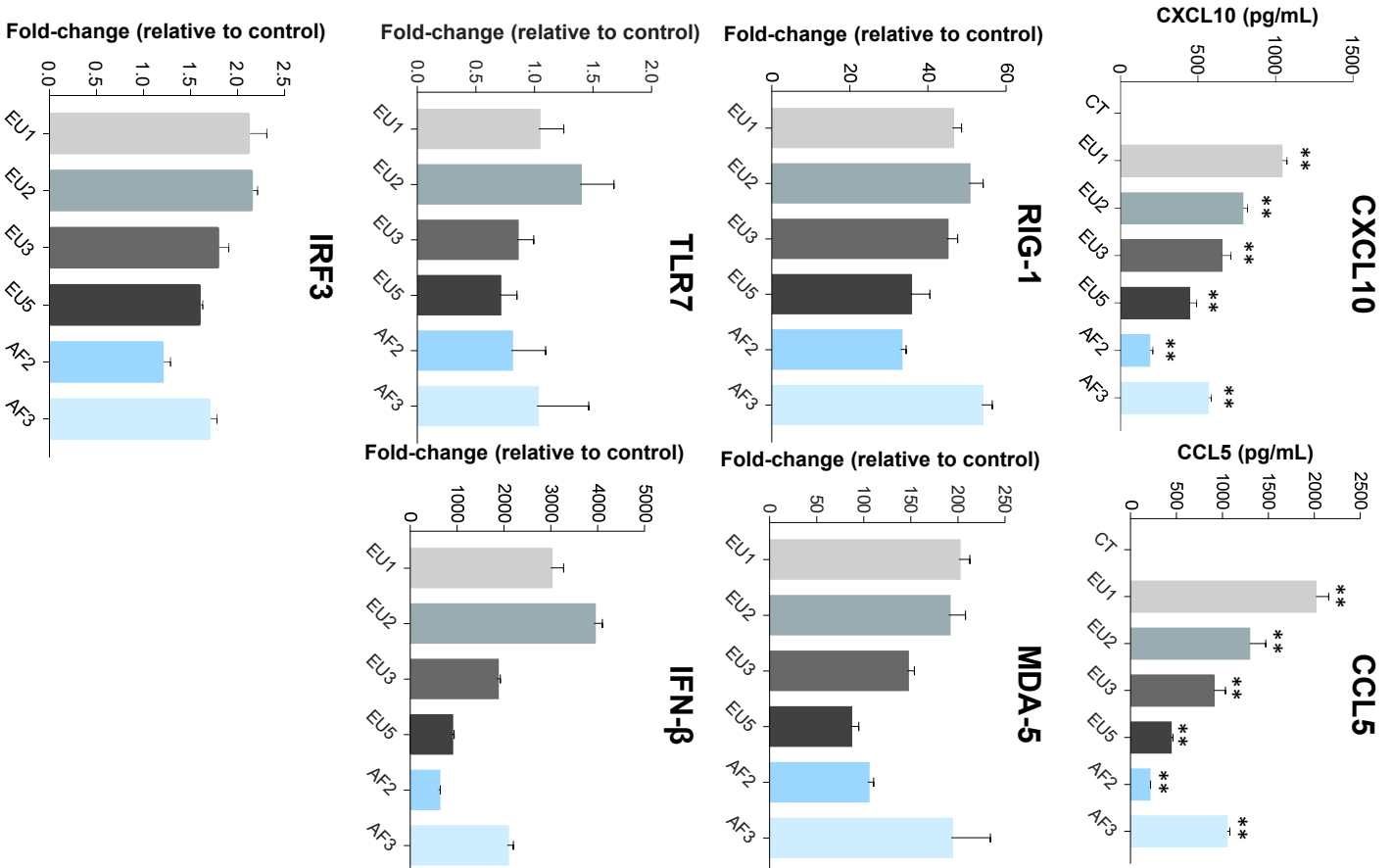
**A****B****C**

Figure 4

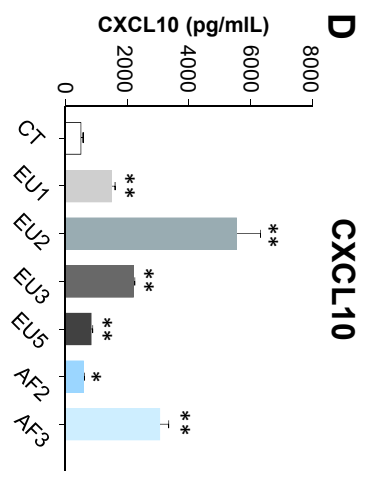
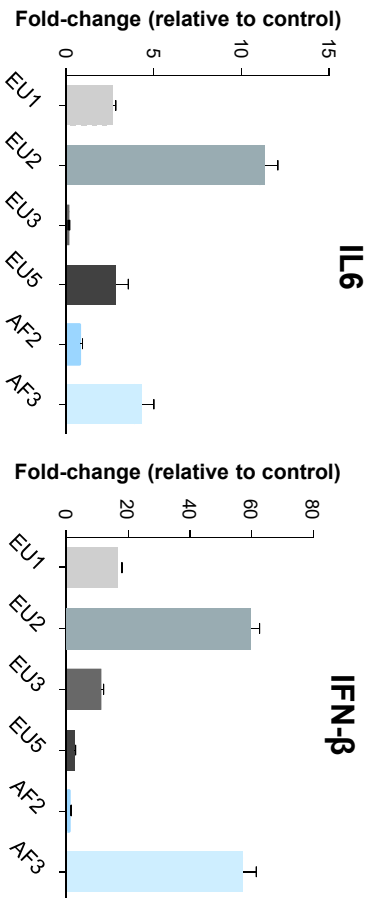
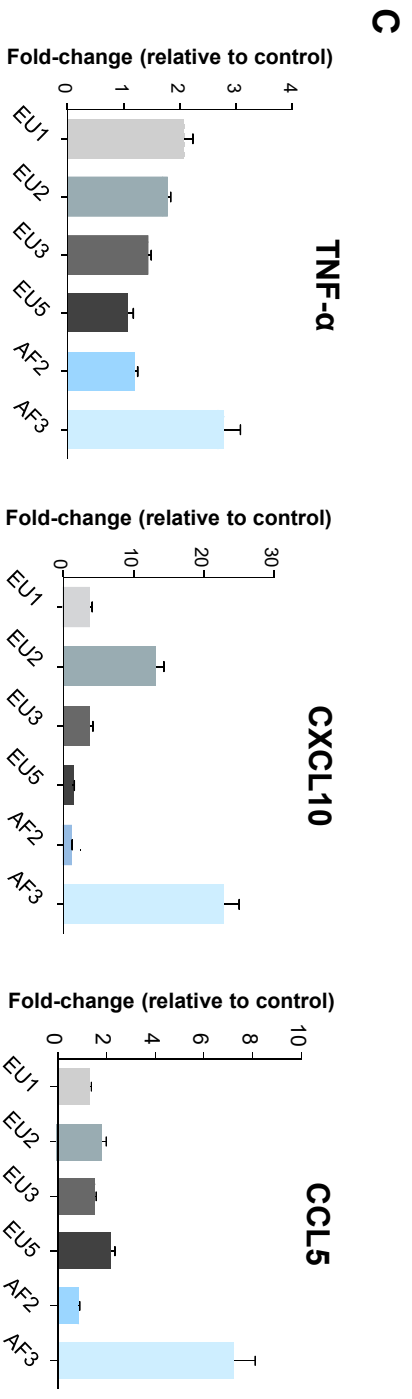
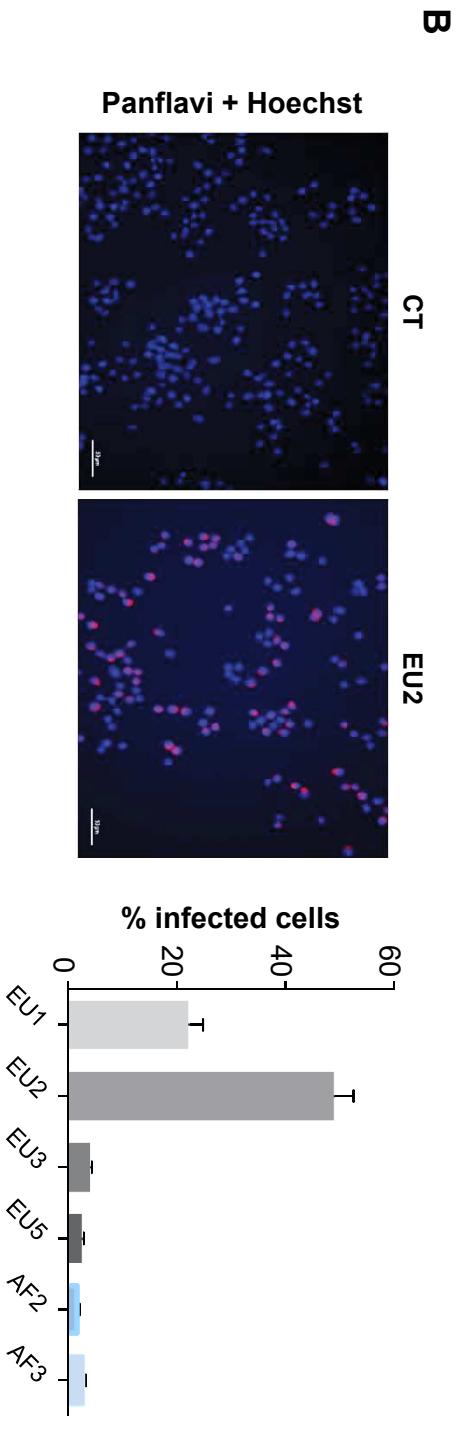
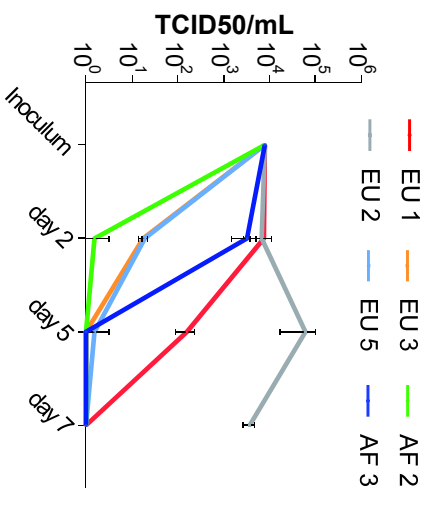
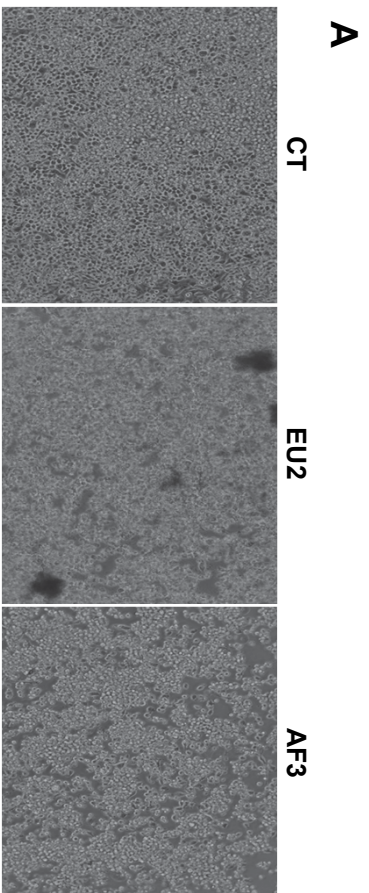


Figure 5



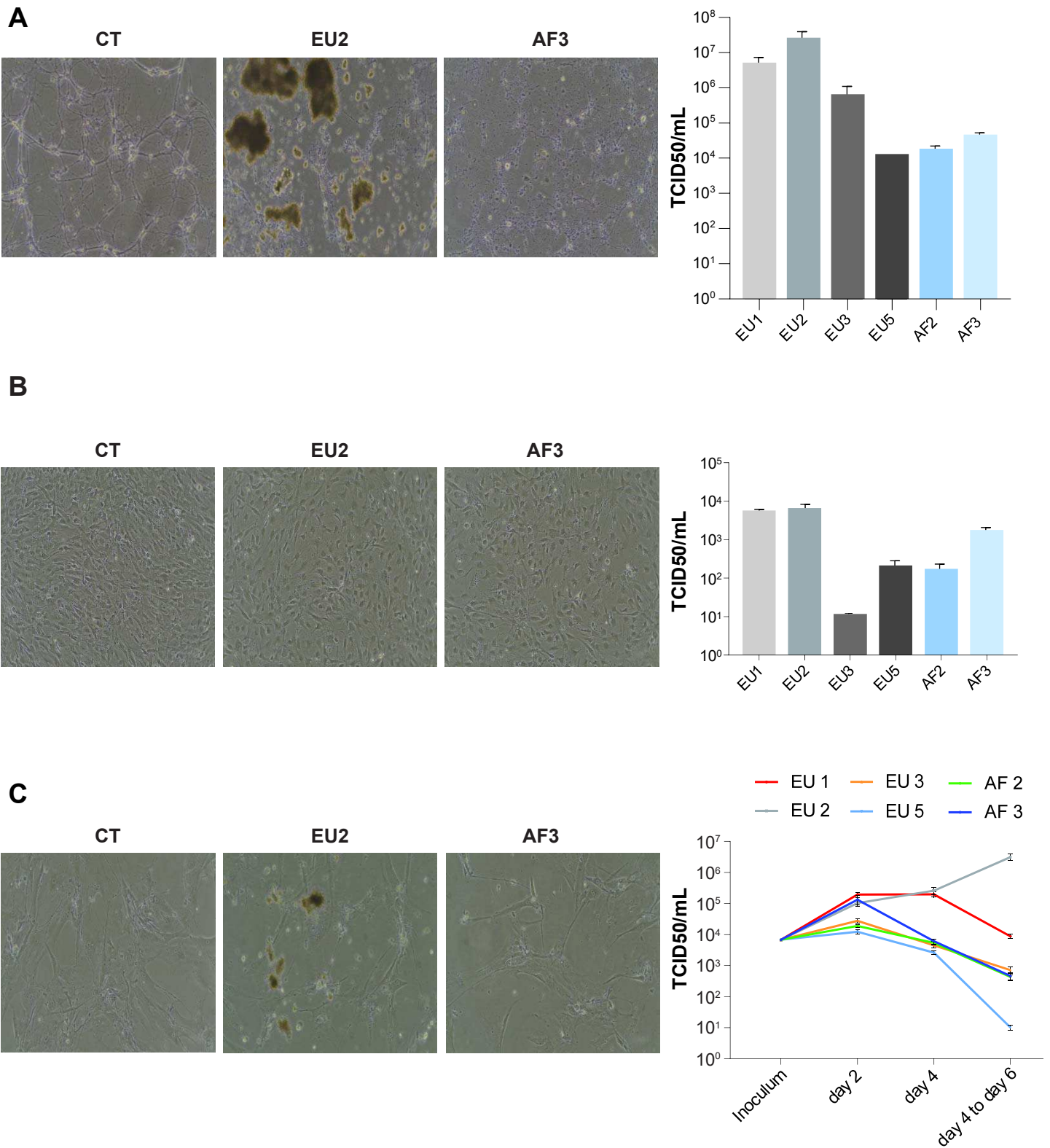


Figure 6

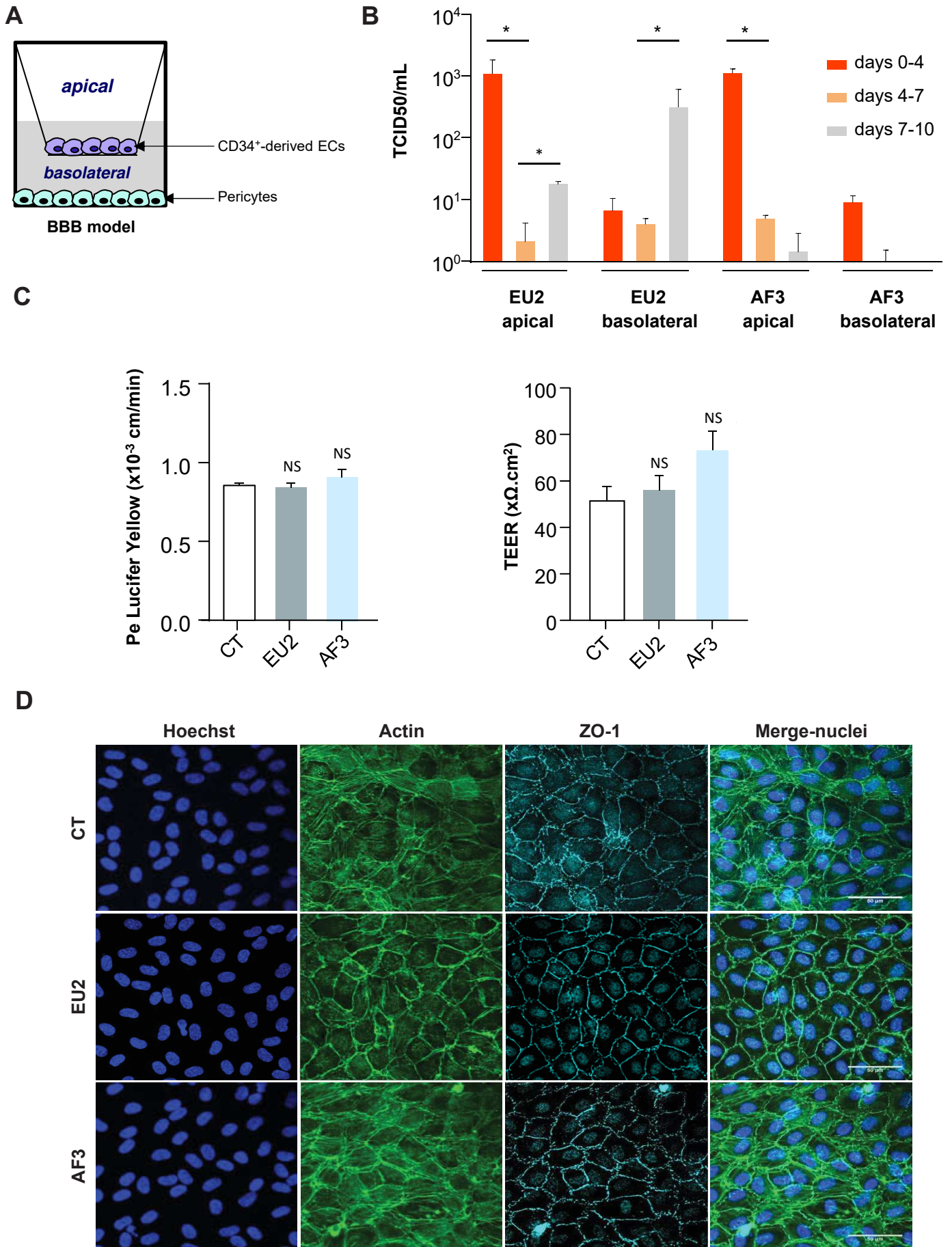
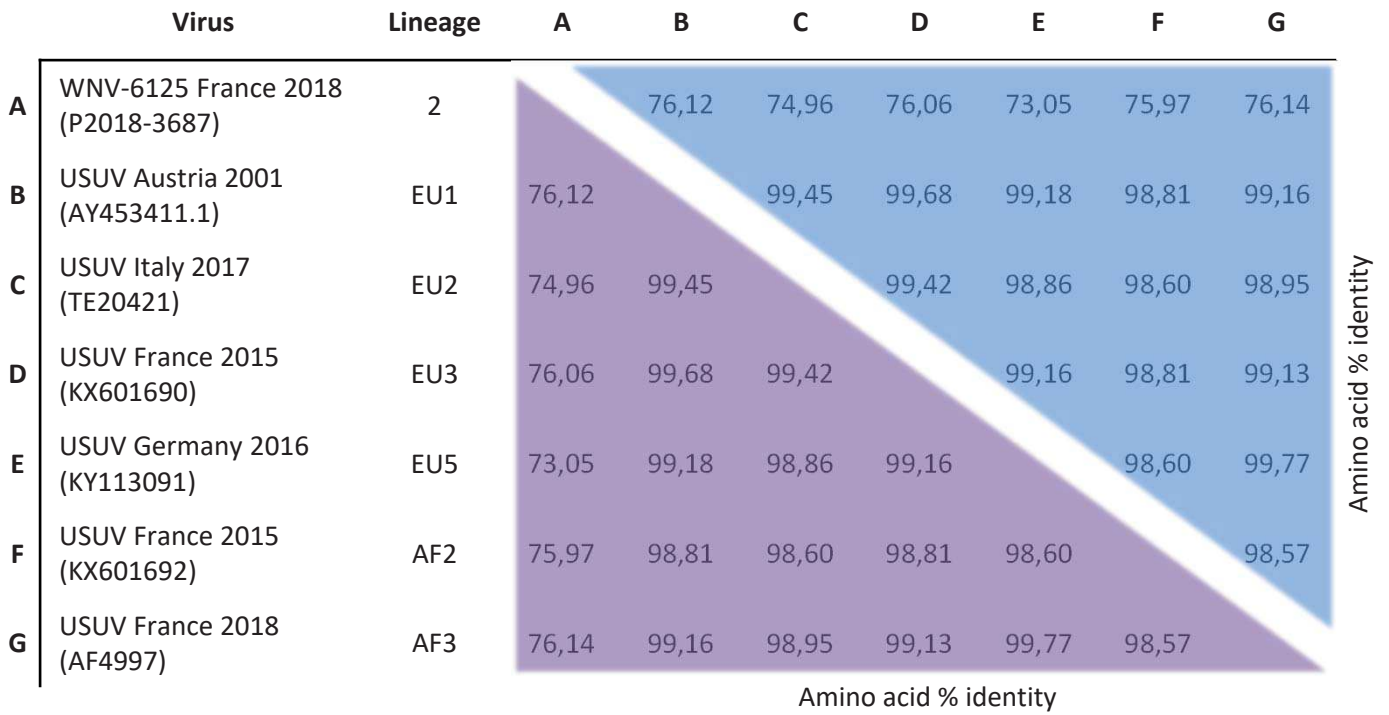


Figure 7

**A**



**B**

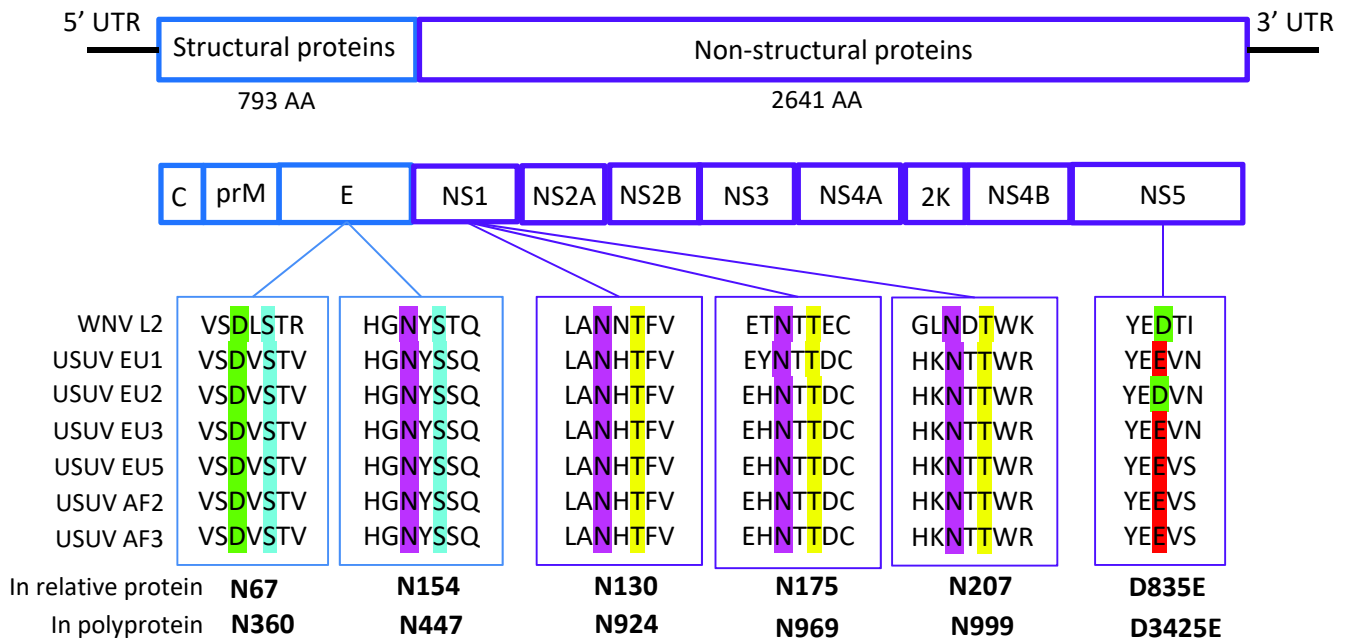


Figure 8

## **b. Conclusion**

Prises ensemble, nos données mettent en évidence que les 6 lignées d'USUV étudiées ont la capacité d'infecter, d'envahir le SNC et de se répliquer au sein de celui-ci mais que la souche Europe 2 est la plus virulente et la plus persistante. Nos résultats suggèrent que les réponses des cellules du SNC peuvent également influencer la neuropathogénèse de l'infection par l'USUV et que certaines lignées semblent être plus neuroinvasives que d'autres. Enfin, il est intéressant de noter que la lignée la plus virulente dans notre étude, Europe 2, est la lignée qui est responsable de la grande majorité des infections neuroinvasives chez l'Homme.

## Chapitre III. Discussion générale et perspectives

Ces dernières années ont été marquées par de multiples émergences et réémergences de maladies vectorielles, soulignant les risques sanitaires de virus non connus ou mal caractérisés, comme ce fut le cas en 2016 avec le ZIKV. Le DENV est actuellement à l'origine d'environ 390 millions d'infections totales, 100 millions de cas cliniquement apparents et 500 000 cas de dengue graves par an dans le monde, avec au moins 2,5 milliards de personnes à risque <sup>558</sup>. WNV, a été signalé en 2018 dans un nombre inhabituellement élevé d'infections chez les chevaux et les humains dans les régions du sud de l'Europe <sup>559</sup>. La circulation de ces virus peut entraîner une épidémie comme cela été le cas à l'île française de La Réunion en 2005-2006 où le CHIKV a touché jusqu'à un tiers de la population et a eu un coût énorme pour la société <sup>560</sup> ou circuler à bas bruit comme c'est le cas avec l'USUV. Toutes ces données suggèrent l'importance de caractériser la virulence et la neuropathogénicité des arbovirus circulants.

### **1. Accès au système nerveux central**

#### **a. Infection du système nerveux central par transcytose ou infection directe des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique**

Un trait assez commun parmi les *flavivirus* est leur capacité à accéder au SNC et à causer des perturbations de la fonction neuronale <sup>76</sup>. Dans la littérature, chez l'Homme, l'infection du ZIKV a été associée à une altération du SNC incluant des microcéphalies et des anomalies neurologiques après une infection congénitale chez l'enfant et chez l'adulte à des méningo-encéphalites, des encéphalites et des SGB. Le ZIKV a été détecté dans le cerveau de nourrissons atteints de microcéphalies ou dans le LCR d'adultes atteints d'encéphalite indiquant que le ZIKV peut envahir le SNC <sup>91,561</sup>. Cependant, le mécanisme par lequel le virus atteint le cerveau n'a pas encore été complètement caractérisé. Pour l'USUV, encore très peu de choses sont connues. Même si chez l'Homme l'USUV peut être responsable de maladies neuroinvasives, les mécanismes d'accès au SNC sont inconnus. Comme les USUV et ZIKV infectent tout un panel de cellules du SNC nous avons décidé d'étudier l'accès au SNC de ces virus en utilisant un modèle de BHE *in vitro* en co-culture <sup>556</sup> (cellules endothéliales et péricytes) ou en tri-culture <sup>562</sup> (cellules endothéliales, péricytes et astrocytes) qui reproduit les principales propriétés et caractéristiques de la BHE *in vivo*. Bien

qu'élaboré, ce modèle ne peut à lui seul retranscrire toute la complexité de la BHE chez les vertébrés. Pour cette raison nous avons également utilisé des modèles de souris où la susceptibilité aux infections a déjà été décrite, à savoir les souris *ifnar*<sup>-/-</sup> adultes et des souris immunocompétentes âgées d'une semaine.

Des preuves antérieures ont suggéré que les cellules endothéliales de la BHE sont permissives pour la réplication de différentes souches du ZIKV et que le virus peut traverser la barrière endothéliale <sup>437,538–540,551</sup>. Comme décrit avec d'autres souches, nos résultats mettent en évidence que les souches Africaines et Asiatiques du ZIKV utilisées dans notre étude infectent et se répliquent efficacement dans les hBLEC de notre modèle de BHE en co-culture et en tri-culture. Pour l'USUV, nous avons testé la capacité de la lignée Europe 2, la souche la plus virulente de nos études ainsi que la capacité des lignées Africa 3 et Africa 2 à passer la BHE afin d'atteindre le parenchyme. Nous avons mis en évidence que les 3 lignées d'USUV infectent peu et se répliquent peu dans les hBLEC. Quand nous comparons les résultats obtenus *in vitro* avec les ZIKV et USUV, nous pouvons voir que les lignées du ZIKV se répliquent mieux que les lignées d'USUV à une multiplicité d'infection de 0.1 et de 1 (**Table 3**).

	Réplication						Perturbation
	Apical			Basolatéral			
	J4	J7	J10	J4	J7	J10	
ZIKV Afrique (MOI 1)	+++++	+++++	+++++	+++	+++	+++	+
ZIKV Asie (MOI 1)	+++++	++++	++++	+++	++	+	+
ZIKV Afrique (MOI 0,1)	+++++	+++++	NA	+++	+++	NA	-
ZIKV Asie (MOI 0,1)	+++++	++++	NA	-	-	NA	-
USUV Europe 2 (MOI 0,1)	+++	+	+	+	+	++	-
USUV Europe 2 (MOI 1)	+++	+	+++	+++	++	+++	+
USUV Africa 2 (MOI 0,1)	+++	+	-	-	+	+	-
USUV Africa 3 (MOI 0,1)	+++	+	+	+	-	-	-

**Table 3. Récapitulatif des résultats obtenus avec le modèle de barrière hémato-encéphalique *in vitro* en co-culture.**

Plus il y a de + plus la réplication est forte. Le – signifie qu'il n'y a pas de réplication. Pour la perméabilité le + correspond à une perturbation de l'endothélium alors que le – correspond à aucune perturbation de l'endothélium. Les données n'ont obtenues sont écrites par NA, cases grises résultats préliminaires obtenus par Oriane Constant.

Abréviation: MOI, multiplicité d'infection.

Dans notre modèle de BHE *in vitro*, nous avons mis en évidence des perturbations subtiles de l'intégrité de l'endothélium lors de l'infection avec le ZIKV ainsi qu'une diminution de l'expression des jonctions serrées et adhérentes et des gènes de la physiologie de la BHE. Nos résultats de perméabilité obtenus pour le ZIKV sont novateurs dans la littérature, puisque jusqu'à présent toutes les études *in vitro* s'intéressant à la perturbation de la perméabilité du ZIKV concluent qu'il n'y a pas de perturbation de celle-ci. Une des raisons est que les études ont été faites à des temps précoces suite à l'infection alors que nos études ont été effectuées à des temps tardifs. De plus, pour étudier la perméabilité de l'endothélium nous avons utilisé une petite molécule fluorescente, le jaune de Lucifer, une molécule d'environ 400 daltons qui est un marqueur robuste de la perméabilité paracellulaire <sup>563</sup>. Ce n'est pas le cas de la plupart des études qui utilisent des molécules de haut poids moléculaires (en kDa) ou la mesure du TEER qui correspond à la résistance électrique fournie par les cellules. L'utilisation de grosses molécules ne permet pas de mettre en évidence des perturbations locales et subtiles de l'intégrité de l'endothélium et la technique de TEER pour l'endothélium cérébrale est peu reproductible et les résultats obtenus dépendent également de l'appareil utilisé et du manipulateur <sup>564</sup>.

*In vivo*, les résultats décrits dans la littérature pour le ZIKV sont controversés. Suivant la souche étudiée, il peut y avoir des modifications de l'intégrité de la BHE ou non. Après quelques jours d'infection, les souris infectées par la lignée Africaine présentent des points hémorragiques dans le cerveau ce qui laisse suggérer que ce sont des lésions prolongées qui sont induites par le virus qui peuvent contribuer à la perturbation de la BHE <sup>437</sup>. Après infection des souris avec le ZIKV, le virus pénètre très rapidement dans le cerveau et à des temps un peu plus tardifs, avec certaines souches, des altérations des protéines de jonctions serrées ainsi qu'une perturbation de la perméabilité dépendante de la souche utilisée sont observées <sup>541</sup>. Ces conclusions confortent nos résultats. En effet, dans nos animaux, nous montrons que le virus est présent dans le cerveau 6 jours après l'infection, que le cerveau des souris infectées est permissif à l'Evans Blue à certains endroits ce qui suggère qu'il n'y a pas de perturbation majeure de l'endothélium mais que les perturbations sont plutôt localisées. Notre analyse de l'expression des protéines des jonctions serrées et adhérentes ne montre pas de modifications majeures, ce qui peut être expliqué par le fait que nous avons analysé le cerveau entier et non exclusivement les vaisseaux sanguins. Pour l'USUV, les résultats sont différents, nous avons montré que le génome

viral est présent en quantité dans les tissus nerveux (cerveau et moelle épinière) mais que l'Evans Blue ne pénètre pas dans le cerveau de souris infectées avec USUV Africa 2 suggérant que la barrière endothéliale n'est pas perturbée par cette souche. Cependant, les 6 lignées étudiées ont un potentiel neuroinvasif puisqu'à 6 jours post infection une charge virale pour toutes les lignées est détectée dans le cerveau. L'infection de nos souris par l'USUV peut être létale ou bien aboutir à des déficits neurologiques comme des déficits moteurs ou des crises convulsives de type épileptique suivant la lignée étudiée. L'infection par l'USUV induit contrairement à ZIKV une apoptose cellulaire dans le cerveau des souris, bien qu'elle ne soit pas massive. L'apoptose est un type de mort cellulaire programmée qui régule l'homéostasie cellulaire. En effet, si l'apoptose est déclenchée précocement suite à une infection virale, elle peut limiter la propagation du virus, par contre si elle est déclenchée tardivement elle peut mener à une meilleure propagation des particules virales comme suggéré pour le VIH<sup>565</sup>. La compréhension actuelle de l'apoptose pendant l'infection par les *flavivirus* n'est pas totalement élucidée. Les études futures devraient viser à découvrir la fonction des protéines virales individuelles et la régulation des ARN non codants dans l'infection virale.

### **b. Infection du système nerveux central et leucocytes**

Pour compléter ces données, sachant qu'une des complications neurologiques suite à l'infection par le ZIKV est l'encéphalite, c'est-à-dire une inflammation de l'encéphale, nous nous sommes intéressés au recrutement des lymphocytes et des monocytes au sein de notre modèle de BHE *in vitro* infecté par le ZIKV. Nous avons montré que le recrutement de ces cellules est augmenté et que les lymphocytes présentent un changement de morphologie. En effet, ils sont plus étendus/étalés, ce qui laisse suggérer qu'ils étaient en cours d'infiltration au travers de l'endothélium. Ces résultats ont également été confirmés *in vivo* avec la présence d'une infiltration de cellules immunitaires dans les cerveaux de souris infectées. Des co-marquages panflavivirus/CD45<sup>+</sup> sur des coupes de cerveaux de souris infectées par le ZIKV proches des vaisseaux sanguins laissent suggérer que des leucocytes infectés peuvent accéder au SNC. Les souris infectées avec l'USUV présentent également une infiltration massive des cellules du système immunitaire mais nous n'avons pas observé de co-marquages comme pour le ZIKV. Une étude vient de mettre en évidence que les monocytes infectés par le ZIKV présentent une plus grande



expression des CAM et une plus grande capacité à se fixer sur la paroi des vaisseaux et à migrer à travers les endothéliums <sup>542</sup>. Les cellules endothéliales vasculaires cérébrales et les CAM sont impliquées dans la facilité de la migration des cellules immunitaires à travers les jonctions serrées de la BHE. Dans la littérature, il a été décrit que la sur-régulation d'ICAM-1 sur l'endothélium vasculaire du SNC est caractéristique de diverses inflammations cérébrales, en particulier dans les lésions de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale <sup>566</sup>. Des études portant sur la migration des lymphocytes à travers la BHE ont montré qu'ICAM-1 sur l'endothélium du cerveau du rat entraînait la phosphorylation de protéines de liaison à l'actine comme l'activation de la petite protéine de liaison au GTP, Rho, ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette endothélial de l'actine pour former des fibres de stress <sup>567</sup>. L'expression d'ICAM-1 est essentielle pour l'adhésion, la migration paracellulaire et transcellulaire des neutrophiles <sup>568</sup> et l'interaction de ces cellules avec l'endothélium peut augmenter la perméabilité vasculaire <sup>569</sup>. Par conséquent, une augmentation de l'expression d'ICAM-1 pourrait contribuer à l'altération endothéliale médiée par les cellules polynucléaires. En effet, le recrutement de neutrophiles a été clairement démontré dans un modèle expérimental *in vivo* de la dengue et semble être un marqueur de maladie grave <sup>570</sup>. En résumé, le rôle de l'ICAM-1 est central dans la liaison ferme des leucocytes à l'endothélium du cerveau et dans la transmigration mais les rôles supplémentaires de VCAM-1, d'E-selectine et des intégrines dans ces événements sont également importants. Nous nous sommes de ce fait intéressés pour le ZIKV aux molécules d'adhésion cellulaire au sein de notre modèle de BHE *in vitro*, dans le cerveau de nos souris ainsi que dans le plasma de patients infectés lors d'une épidémie aux Antilles. Nous avons démontré que les molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-selectine ont une expression génique augmentée, qu'ICAM-1 et VCAM-1 ont une expression protéique et une sécrétion qui est augmentée lorsque l'endothélium est infecté. D'autres *flavivirus* comme le DENV entraîne également l'augmentation de ces protéines <sup>502</sup>. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire suggèrent également que l'USUV induit à la hausse l'expression des CAM. *In vivo*, chez les souris infectées avec le ZIKV, les CAM (ICAM-1 et E-selectine) sont également régulées à la hausse mais comme pour l'étude des protéines de jonctions, nous avons analysé le cerveau entier. Ce mécanisme a été mis en évidence dans le cerveau des souris infectées par WNV <sup>495</sup>. Nous avons aussi montré que dans notre modèle de BHE, suite à l'infection des cellules endothéliales avec le ZIKV, l'apparition

de fibres de stress comme décrit pour le DENV <sup>571</sup>. En effet, nous observons une réorganisation de l'actine avec une augmentation de l'expression d'ICAM-1. Dans le SNC, la perturbation du cytosquelette d'actine résulte d'un défaut de la BHE ce qui facilite l'infection par des virus neurotropes <sup>572</sup>, ce qui corrèle avec nos résultats obtenus avec le ZIKV. Enfin, des formes circulantes de molécules d'adhésion ou de récepteurs solubles peuvent être libérées des cellules à la suite de leur activation et peuvent être des marqueurs utiles de l'inflammation dans le SNC. Ces formes circulantes pourraient être des outils utiles pour évaluer la progression de la maladie <sup>573</sup>, c'est le cas par exemple d'ICAM-1 soluble (sICAM-1) <sup>574</sup>. En effet, les enfants infectés par le VIH par rapport aux témoins en bonne santé ont des niveaux de sICAM-1 significativement augmentés. Une autre étude a mis en évidence que non seulement la sICAM-1 mais aussi la sVCAM-1 et la sE-selectine étaient significativement élevées dans le sérum de patients atteints de sclérose en plaques <sup>575</sup>. Les patients atteints de DENV, par rapport aux individus sains ont également une augmentation significative des niveaux plasmatiques de sICAM-1 et de sVCAM-1 <sup>505</sup>. Nos résultats vont dans le même sens pour le ZIKV, pour lequel nous avons mis en évidence chez les patients infectés, une augmentation de la circulation de ces formes solubles dans le plasma.

Enfin, récemment, une étude vient compléter les résultats concernant l'accès au SNC par le ZIKV. Les auteurs montrent que le ZIKV pourrait entrer dans le SNC par la barrière hémato-LCR en exploitant les péricytes autour des capillaires fenestrés et des cellules épithéliales. Dans leurs modèles murins, les cellules infectées par le ZIKV sont d'abord apparues dans les régions périventriculaires du cerveau, comme le plexus choroïde et les méninges, avant l'infection du cortex <sup>550</sup>. Ils en concluent que l'effet de la perturbation de la barrière endothéliale est de ce fait, plus, dû à un environnement inflammatoire que par le virus lui-même. De plus, il a également été montré chez les macaques adultes, que le ZIKV provoque une neuroinflammation aiguë et chronique et que le ZIKV compromet l'intégrité de la BHE <sup>552</sup>. Pour compléter les données sur le ZIKV, il serait intéressant de travailler sur la transmigration des cellules du système immunitaire en utilisant un modèle de BHE infecté mais cette fois-ci avec des pores plus grands. Cette étude permettrait tout d'abord de confirmer notre hypothèse, afin de déterminer si l'augmentation de l'adhésion des monocytes et des lymphocytes se traduirait par une infiltration plus importante de ces cellules au sein du parenchyme. Par ailleurs, il serait aussi intéressant d'utiliser un cocktail de cellules immunitaires (cellules dendritiques, cellules NK, lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, lymphocytes T

CD4<sup>+</sup>, monocytes) afin de déterminer quelles cellules sont plus susceptibles de migrer à travers l'endothélium suite à une infection pour comprendre la mise en place de la réaction immunitaire. Dans ce même modèle, si ces résultats s'avèrent concluants, il serait judicieux de travailler sur le mécanisme de cheval de Troie, en utilisant un modèle de BHE infecté ainsi qu'en ajoutant des cellules du système immunitaire infectées afin de déterminer si ces cellules ont plus de potentiel de s'infiltrer comparées à des cellules non infectées comme suggéré par l'étude de *Ayala-Nunez et al*<sup>542</sup>. Dans cette même voie, il serait intéressant d'utiliser *in vivo* un cocktail d'anticorps bloquant les CAM (ICAM-1, VCAM-1 et E-selectine) afin de confirmer nos résultats *in vitro* qui montrent que l'infiltration des lymphocytes se fait en partie *via* ces molécules.

### **c. Réservoirs viraux**

D'un point de vue anatomique et développemental les yeux sont connus comme une extension du SNC et il est proposé qu'ils agissent comme un réservoir de réplication virale. En effet, l'œil est entouré d'un ensemble de barrières hémato-oculaires qui partagent des structures et des mécanismes avec le système de portes du SNC. Des particules virales infectieuses du ZIKV ont été détectées dans le liquide lacrymal chez un patient humain et dans des modèles de souris ce qui suggèrent une potentielle voie de transmission *via* le liquide conjonctival<sup>100</sup>. Chez la souris, l'infection d'USUV entraîne des déficits oculaires. Des analyses histologiques des yeux de souris ont montré une perturbation de la structure rétinienne interne et externe ainsi qu'une perte de la couche de photorécepteurs. Ces résultats confirment ce qui a déjà été vu avec les autres *flavivirus*. En effet, on sait que le ZIKV, le DENV et le WNV sont cibles des RPE et entraînent des dommages ophtalmologiques majeurs<sup>576,577</sup>. L'intégrité de l'épithélium oculaire humain *in vitro* ne semble pas être affectée par l'infection par l'USUV Africa 2 alors qu'elle l'est avec le ZIKV<sup>578</sup>. Malgré qu'USUV Africa 2 ne perturbe pas l'intégrité de l'épithélium, il peut se répliquer et entraîner une activation de l'inflammation par une réaction à médiation immunitaire. Dans les RPE humains infectés par les ZIKV et USUV, l'expression de CXCL10, CCL5 et IL6 a été augmentée. La signature inflammatoire des yeux infectés par l'USUV est quasi similaire à celle du cerveau et de la moelle épinière. De nombreuses études ont montré que la neuroinflammation est un aspect important de nombreuses maladies de l'œil<sup>579</sup>. Comme pour l'infection avec le ZIKV, CXCL10 est régulée à la hausse dans le RPE humain et dans les yeux de souris infectés par USUV Africa 2<sup>578</sup>. Ces résultats

suggèrent que les RPE sont une cible pour ces deux virus et ces données participent à la compréhension des problèmes ophtalmologiques décrits, notamment pour le ZIKV.

#### **d. Autres mécanismes d'accès au système nerveux central**

Nos résultats pour l'USUV sur la BHE, ne mettent pas en évidence une perturbation majeure de la BHE ni *in vitro* ni *in vivo*, il faudrait donc compléter ces études en déterminant si les différentes lignées du virus accèdent principalement dans le SNC par voie hématogène (transcytose/cheval de Troie) ou par d'autres modes comme il a déjà été décrit par le WNV par exemple. Le virus peut-il accéder au SNC par voie axonale ? Sachant que l'œil est un potentiel réservoir du virus, il serait intéressant de regarder si le virus peut transiter *via* le nerf optique. Voir pénétrer dans le SNC *via* le nerf olfactif, comme ça a déjà été montré pour d'autres virus<sup>580</sup>. D'autant plus que, les cellules épithéliales respiratoires humaines des fosses nasales sont des cibles pour la réplication d'USUV<sup>581</sup>. Ces résultats soulèvent la possibilité d'une transmission par contact étroit de l'USUV chez l'Homme. Pour cela, des études sur les souris devraient être mises en place en utilisant l'inoculation intranasale afin d'évaluer le potentiel de transmission par aérosol. Il serait également intéressant de continuer à investiguer à la fois la neurovirulence et la neuroinvasivité *via* l'inoculation périphérique (sous-cutanée) dans le but de déterminer la voie d'entrée des virus au SNC. En effet, l'inoculation du virus dans la peau est une étape clé dans la physiopathologie de l'infection par les arbovirus. Ainsi, la peau constitue non seulement le premier site de réplication virale chez l'hôte, mais aussi le site d'initiation de la réponse immunitaire antivirale. Il a été mis en évidence par exemple que le DENV, le CHIKV, le WNV et le ZIKV peuvent infecter et développer une réponse antivirale dans les cellules de la peau telles que dans les kératinocytes et les fibroblastes<sup>582-584</sup>.

#### **2. Infection des cellules de l'unité neurovasculaire**

Les péricytes, les astrocytes et les neurones, cellules essentielles au maintien de la BHE ainsi que les microglies principales cellules impliquées dans la défense immunitaire active du SNC peuvent être également infectées par les ZIKV et USUV. En effet, une fois que le ZIKV traverse la BHE et infecte les astrocytes, il peut alors modifier les propriétés de maintenance et de perméabilité de la BHE. Il a été montré que dans le cerveau d'embryons de souris, l'infection par le ZIKV entraîne une vascularisation anormale et une fuite de la BHE, ce qui suggère que le ZIKV a

déclenché une astrogliose progressive qui peut contribuer à modifier les propriétés de la BHE <sup>551</sup>. L'infection par les souches Africaines et Asiatiques du ZIKV déclenchent dans les astrocytes humains primaires des changements morphologiques, des ECP progressifs, entraînant une mort cellulaire étendue y compris l'apoptose plusieurs jours après l'infection ainsi qu'une production de molécules inflammatoires <sup>546,585</sup>. Par ailleurs, les péricytes également essentiels au maintien de la BHE peuvent être infectés ; comme décrit avec le JEV <sup>520</sup>. Il a également été mis en évidence que la protéine NS1 du DENV induit des dysfonctionnements au niveau des péricytes et que l'hyperperméabilité endothéliale induite par la protéine NS1 est plus prononcée en présence de péricytes <sup>586</sup>. Dans nos études, nous montrons que dans les modèles de BHE en co- et tri-culture et dans des cultures seules, les péricytes et les astrocytes infectés par le ZIKV peuvent répliquer le virus et participer à la sécrétion de molécules inflammatoires ce qui permet de renforcer le stade inflammatoire et potentiellement perturber l'homéostasie et l'intégrité de la BHE, comme décrit avec d'autres *flavivirus* <sup>493,521</sup>. Il a été mis en évidence que la culture de cellules endothéliales avec un milieu conditionné obtenu à partir d'astrocytes infectés par le JEV a induit la dégradation de la ZO-1 et de la claudine 5 ainsi que la perméabilité de l'endothélium <sup>521</sup>. C'est le cas également avec le WNV <sup>493</sup>. De plus, nos résultats *in vitro* mettent en évidence que les 6 lignées d'USUV infectent et se répliquent au sein des astrocytes, des cellules microgliales, des péricytes, des neurones et des cellules endothéliales mais avec des profils différents suivant les lignées. De plus, nous montrons que toutes les cellules infectées par la lignée Europe 2 à part les péricytes, développent un ECP spécifique à des temps tardifs (à partir de 4 jours après infection) qui persistent dans le temps. Les hypothèses que nous pouvons émettre sont que l'ECP observé pourrait par exemple être dû à une production d'ARNsf qui inhibe la réponse antivirale dans les cellules de l'hôte et qui permet au virus de se répliquer et d'induire cet effet cytopathogène. De plus, puisque nous observons cet ECP avec différentes souches d'USUV Europe 2, peut être, que la mutation spécifique observée dans la protéine NS5 peut entraîner une réplication plus importante du virus ainsi que l'induction de cet ECP.

### **3. Induction de la neuroinflammation**

La capacité à détecter un agent pathogène envahissant et à y répondre de manière appropriée est un facteur qui contribue à déterminer l'issue de l'infection virale. En effet, pour se défendre contre les virus neurotropes, les cellules résidentes

du SNC ont développé des stratégies immunitaires antivirales innées. En général, l'immunité innée est obligatoire pour éliminer les infections virales et lorsque l'élimination est inefficace, une libération exagérée de cytokines peut être nuisible et être associée à des effets indésirables. Par conséquent, le risque le plus élevé lors d'une infection virale neurotrope est la propagation du virus au SNC provoquant l'induction de réponses inflammatoires et la destruction des cellules neuronales qui induit certaines fois une sévère neuroinflammation et des troubles du SNC tels que des problèmes cognitifs ou de la neurodégénération <sup>587</sup>. L'infection d'USUV Africa 2 entraîne une forte inflammation au niveau de la moelle épinière, des yeux et du cerveau *in vivo* chez les souris. Les résultats que nous avons obtenus indiquent que l'activation de l'inflammasome contribue au développement de la réponse neuro-inflammatoire provoquée par l'USUV. NLRP3 est l'une des principales molécules de l'inflammasome impliquée dans l'identification des virus ARN simple brin et ADN double brin <sup>588</sup>. NLRP3 est un complexe multiprotéique qui sert de médiateur pour l'activation de la caspase-1 et qui favorise la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18. Divers virus peuvent activer NLRP3, notamment le virus de la grippe, le JEV, le virus de l'encéphalomyocardite, le VIH et l'entérovirus 71 <sup>589,590</sup>. *Kaushik et al* ont précédemment montré que l'expression de NLRP3 est cruciale pour induire une réponse pro-inflammatoire contre le JEV dans les cellules gliales <sup>589</sup>. Nous montrons dans notre étude que l'expression de NLRP3, de l'AIM2, de l'IL-1 $\beta$ , de la caspase-1 et de la caspase-8 diffère sensiblement entre les souris infectées par USUV Africa 2 et les contrôles. Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse qu'après l'introduction d'USUV dans les cellules du SNC il y a l'établissement d'un environnement de stress cellulaire dans le parenchyme nerveux. NLRP3 et AIM2 reconnaissent les PAMP d'USUV et induisent l'activation des inflammasomes, ce qui entraîne la libération de la caspase-1. Étant donné que la réponse neuro-inflammatoire favorise l'activation de l'inflammasome, ce complexe multiprotéique induit la voie immunitaire innée, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-18) et l'induction de la voie de la pyroptose (une forme hautement inflammatoire de mort cellulaire programmée).

Par ailleurs, il est nécessaire de distinguer une inflammation chronique, d'une inflammation aiguë. Une inflammation aiguë dans le SNC est causée par une activation rapide et immédiate des cellules en réponse à l'infection alors qu'une inflammation chronique est le résultat d'une activation soutenue des cellules gliales, du recrutement

des cellules immunitaires périphériques et d'une persistante réponse immunitaire dans le cerveau qui induit des phénomènes délétères <sup>591</sup>. La régulation globale à la hausse des cytokines et chimiokines inflammatoires dans le cerveau joue un rôle essentiel dans le recrutement des leucocytes et participe à l'infiltration générale des cellules immunitaires du SNC <sup>592</sup> comme vu par les marquages histologiques chez nos souris infectées. En effet, l'activation des lymphocytes périphériques régule davantage les protéines d'adhésion cellulaire et les récepteurs des chimiokines qui facilitent tous deux l'entrée des lymphocytes circulants dans le SNC <sup>593</sup>. Suite à une infection du SNC, l'homéostasie peut être altérée et l'inflammation peut apparaître dans des régions anatomiques distinctes et provoquer des maladies inflammatoires telles que la myélite, la méningite, l'encéphalite et la méningo-encéphalite qui peuvent avoir des impacts importants sur la santé humaine et être associées à des séquelles à long terme. Nos résultats suggèrent que ce n'est pas exclusivement le virus par lui-même qui perturbe la BHE mais plutôt en association avec la persistance de l'environnement inflammatoire. En effet, nous montrons lors de l'infection avec nos deux lignées du ZIKV une augmentation de la sécrétion de CCL5, CXCL10 et IL6 par les hBLEC infectées ainsi qu'une augmentation de l'expression de CCL5, CXCL10, IL6, IL-1 $\beta$  et IFN $\beta$  par ces mêmes cellules et dans nos modèles murins. L'infection des hBLEC avec USUV entraîne une augmentation plus faible de la sécrétion des cytokines comparé à ZIKV. Il a été décrit que ces cytokines augmentent dans le SNC durant une encéphalite arbovirale et qu'elles sont fortement induites pendant l'infection par le JEV, le WNV et le TBEV <sup>594</sup>. Nous avons également constaté que les lignées d'USUV et ZIKV induisaient de robustes réponses inflammatoires dans les astrocytes, les péricytes, et les microglies. Ces résultats sont confirmés par des études antérieures où il a été mis en évidence que les astrocytes et les microglies sécrètent CCL5 en réponse à une variété de virus <sup>595-598</sup>. Les signaux CXCL10 et CCL5 sont essentiels dans la réponse antivirale aux infections par le WNV en recrutant des cellules T spécifiques au virus <sup>599</sup>. La sécrétion de CCL5 par les cellules gliales peut amplifier la signalisation inflammatoire dans le SNC et peut jouer un rôle dans le recrutement des cellules inflammatoires de la circulation <sup>600</sup>. Il a également été démontré que la chimokine CXCL10 joue un rôle important dans le recrutement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans le cadre d'une réponse au WNV dans le SNC <sup>413</sup>. De ce fait, la sécrétion de ces molécules inflammatoires *via* toutes ces cellules pourrait contribuer aux recrutements et à l'activation des cellules immunitaires. Il a également été mis en évidence que CXCL10

favorise la perturbation de la BHE en induisant la production du TNF- $\alpha$  chez les souris infectées par le JEV <sup>480</sup>. Récemment, une importante activité antivirale de CXCL10 a été décrite contre d'autres *flavivirus*, comme le DENV <sup>601</sup>. Chez l'Homme, des taux sériques accrus de CXCL10 ont été constatés lors de manifestations cliniques graves de dengue et de fièvre jaune et chez les patients infectés par le ZIKV, ce qui est confirmé par nos résultats <sup>602,603</sup>. En effet, nous avons également montré la présence de la molécule inflammatoire CXCL10 dans le plasma des patients infectés par le ZIKV. Par ailleurs, l'infection des astrocytes avec les 6 lignées d'USUV entraînent un arrêt de la prolifération des cellules, avec un arrêt plus ou moins marqué suivant la lignée utilisée ainsi qu'une mortalité cellulaire. Ce phénotype pourrait être lié à la forte réponse immunitaire observée après l'infection par l'USUV. En effet, certaines cytokines telles que l'IFN $\beta$  et la CXCL10 sont connues pour provoquer directement la mort cellulaire ou pour inhiber la prolifération cellulaire <sup>604</sup>. Les profils d'expression et de sécrétion cytokinique que nous avons obtenus sont en accord avec cette hypothèse. Par conséquent, comme la CXCL10 peut être bénéfique ou nuisible à l'infection virale <sup>605</sup>, le rôle de cette protéine dans l'infection systémique ou plus localisée d'USUV n'est pas encore clairement établi.

Enfin, la cellule utilise des PRR pour détecter la présence de PAMP dans les produits de la réplication virale. L'activation de ces voies conduit à l'induction de l'expression d'une grande variété d'ISG qui sont impliqués dans des fonctions antiprolifératives, antivirales et pro-apoptotiques qui peuvent limiter l'infection virale. Il a été montré que RIG-1 joue un rôle essentiel dans la détection initiale de WNV <sup>606</sup>. Dans notre étude, nous montrons que les astrocytes infectés par les 6 lignées d'USUV ont une surexpression de RIG-1, de MDA5 et de TLR3. Certaines lignées entraînent aussi une surexpression de MyD88, de MAVS et d'IRF3. Les profils différents dans la sécrétion et l'expression des molécules inflammatoires entre les 6 lignées peuvent expliquer les profils différents dans la réplication virale puisqu'elles jouent un rôle dans la réponse antivirale. La réponse de l'IFN de type I peut limiter la dissémination virale par différents mécanismes : limitation de la propagation des virus de la progéniture aux cellules voisines et/ou réduction de la réplication virale globale. Cependant, nous observons dans nos résultats que la forte induction de l'IFN $\beta$  par les ZIKV et USUV, ne bloque pas la réplication du virus. Ces observations suggèrent que ces virus ne possèdent pas de mécanismes qui interfèrent avec l'induction de l'IFN comme cela a déjà été décrit dans d'autres études sur les cellules dendritiques et épithéliales <sup>607,608</sup>.



Les mécanismes utilisés pour surmonter cette réponse IFN tout en établissant une infection productive par ces deux virus restent à déterminer mais l'absence d'effet protecteur efficace de l'IFN de type 1 a été démontrée pour d'autres *flavivirus* neurotropes tels que le WNV et le DENV <sup>52,609-611</sup>. En résumé, en détectant l'agent pathogène viral, la cellule active de multiples voies de signalisation distinctes en induisant un certain nombre de facteurs de transcription latents ce qui entraîne à son tour une reprogrammation du profil d'expression génétique de la cellule (impliquée dans la réplication virale, la traduction, la transcription virale ainsi que dans les médiateurs inflammatoires) et l'induction d'une grande variété de gènes qui établissent un état antiviral. Comme il existe une forte probabilité que ces souches ne soient pas dérivées en raison de passages importants (aucun passage au-dessus de 5), nos observations suggèrent une différence potentielle dans la physiopathologie entre les lignées.

#### **4. Virulence**

Une des causes de l'émergence des virus pour les virus à ARN est leur variabilité génétique. Cette variabilité génétique découle de l'action cumulée des mutations, des recombinaisons ou des réassortiments des génomes viraux. Les mutations peuvent provenir d'une réplication qui est intrinsèquement non fidèle, ce qui entraîne des accumulations de mutations, d'autres virus vont échanger leurs matériels génétiques par recombinaison, d'autres échanges des morceaux de leur génome comme par exemple avec les virus à ARN segmenté (virus de la grippe) donc les virus ont la capacité à muter, à se répliquer et à s'adapter. L'adaptation peut être mesurée comme une augmentation de l'aptitude à la réplication, définie comme la capacité d'un virus à produire des particules virales infectieuses dans un environnement donné. En effet, ces mutations se produisant en permanence, elles maintiennent des sous populations sélectionnables lors de l'introduction d'un virus dans un nouvel hôte <sup>612</sup>. Elles permettent par exemple de faire face aux pressions de sélection qu'elles soient naturelles ou artificielles comme l'adaptation du VIH-1 aux facteurs de restrictions <sup>613</sup> ou aux antiviraux <sup>614</sup>. Il a également été mis en évidence qu'une seule substitution sérine-asparagine [Ser139→Asn139 (S139N)] dans la polyprotéine virale du ZIKV a sensiblement augmenté l'infectivité du ZIKV dans les cellules progénitrices neurales humaines et murines et a entraîné une microcéphalie plus grave chez le fœtus de souris ainsi qu'un taux de mortalité plus élevé chez les souris néonatales <sup>75</sup>. De plus,

en générant des virus chimériques, il a été montré que la région Pr de la protéine prM du ZIKV MR766 (Africaine) est responsable de la cytotoxicité induite par la prM. En effet, en introduisant quatre variantes d'acides aminés épidémiques et divergentes (A148, V153, H157 et V158) retrouvées dans la souche brésilienne BR15 (Asiatique) dans la région Pr du ZIKV MR766 de la protéine prM, par mutagenèse directe, la mort des cellules apoptotiques induite par la protéine Pr du ZIKV MR766 a été atténuée <sup>615</sup>. Cela suggère que l'acquisition de ces quatre acides aminés dans le ZIKV BR15 pourrait être responsable de son phénotype cytotoxique atténué. De plus, il a été montré que le ZIKV de lignée asiatique a acquis une mutation évolutive dans le gène de l'enveloppe virale (V473M) qui augmente la virulence, la transmission mère-foetus pendant la grossesse et la virémie chez les souris et les primates non humains, ce qui pourrait être responsable de l'émergence récente de ce virus et des maladies graves qu'il induit <sup>616</sup>.

Il a également été mis en évidence que de simples mutations dans les protéines structurales et non structurales des WNV et DENV pouvaient être impliquées dans la virulence et l'infectivité de ces virus <sup>617,618</sup>. Pour l'USUV, un séquençage complet du génome du premier isolat d'USUV identifié chez un patient présentant des symptômes neurologiques (Europe 2, en 2009) a été réalisé puis comparé avec des souches non humaines d'USUV (moustiques et oiseaux) afin de déterminer si des différences pouvaient être observées <sup>202</sup>. Cette étude a mis en évidence notamment deux substitutions d'aa, une dans le domaine III de la protéine E et une dans la protéine non structurale NS5. Les conclusions de cette étude sont que ces deux uniques substitutions pourraient jouer un rôle dans la capacité neuroinvasive et dans le tropisme des cellules neurologiques humaines. En effet, la protéine E est impliquée dans la liaison au récepteur de la cellule hôte ainsi que dans la détermination du tropisme cellulaire et la protéine NS5, elle, joue un rôle dans la réplication virale. Ces deux substitutions pourraient alors expliquer la plus forte virulence de cette lignée Europe 2 chez l'Homme. Dans notre étude, suite à l'alignement des 7 séquences d'USUV, isolées chez les oiseaux, nous retrouvons au niveau de la protéine NS5 la même substitution dans les deux souches d'USUV Europe 2, c'est-à-dire qu'Europe 2 a à la position 3425 de la polyprotéine, qui correspond à la position 835 du résidu de la protéine NS5, un acide aspartique (Asp) à la place d'un acide glutamique (Glu). Cette substitution est retrouvée dans la quasi-totalité des souches d'Europe 2 séquencées (14/15 isolats (sauf pour JF 266698)). Il est intéressant de noter qu'une

substitution d'aa similaire dans le domaine RdRp de la région NS5 a été observée chez d'autres *flavivirus* tels que le JEV, le WNV, le MVEV et le Kunjin virus qui sont associés chez l'Homme à la méningo-encéphalite <sup>202</sup>. De plus, la protéine NS5 des *flavivirus* code pour l'ARN polymérase dépendante de l'ARN qui, avec d'autres protéines non structurales et une partie des UTR sous-jacents forment un composant essentiel du complexe de réplication du virus. De ce fait, des substitutions dans le domaine conservé de cette polymérase sont susceptibles d'avoir un impact sur l'efficacité de la réplication virale par la perturbation de ce complexe. En effet, dans nos résultats la substitution observée dans les souches d'Europe 2 pourrait avoir un rôle dans la réplication et la persistance du virus. Les 6 lignées d'USUV ont des profils de virulence, de pathogénèse, de neuroinvasivité et de neuropathogénicité qui sont différents. La forte virulence observée avec les souches d'Europe 2 d'USUV chez les souris et *in vitro* (taux d'infection plus élevé, production de virus élevée, ECP spécifique et forte induction de la mort cellulaire) corrèle avec les cas d'infection observés récemment en Europe chez l'Homme.

Par ailleurs, en Europe, diverses souches d'USUV co-circulent. En effet, en Allemagne, la circulation de cinq différentes lignées d'USUV (Europe 2, Europe 3, Europe 5, Afrique 2 et Afrique 3) <sup>190,205,221,238</sup> a été décrite, en Italie deux lignées (Europe 2 et Europe 4) <sup>271</sup> co-circulaient et en France deux lignées (Afrique 2 et Afrique 3) <sup>192</sup> ont été détectées chez des moustiques de la même région. La co-circulation de différentes lignées d'USUV dans une même région soulève la crainte que des événements de recombinaison puissent se produire et accélérer la diversité des lignées d'USUV. En effet, les événements de recombinaison se produisent lorsqu'une même cellule est infectée par des virus de deux souches différentes, voire d'espèces différentes, la recombinaison entre leur ARN génomique pouvant potentiellement conduire à l'émergence de nouveaux pathogènes. Bien que ce soit rare pour les *flavivirus*, dans des conditions de laboratoire, des recombinaisons entre les génomes du complexe du virus de l'encéphalite japonaise, qui comprend également l'USUV, ont été signalées <sup>619</sup>. Pour cette raison, il est important de se concentrer sur la recombinaison intermoléculaire entre les génomes de virus à ARN étroitement apparentés car elle peut entraîner l'émergence de nouvelles souches dont la pathogénicité et l'antigénicité sont modifiées.

Bien que nous n'ayons pas caractérisé le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) responsable(s) de la différence de virulence entre les six lignées d'USUV et entre les

deux lignées du ZIKV, nos données indiquent une modulation potentielle des réponses de la cellule hôte qui varie selon la lignée USUV ou ZIKV utilisée. Nous ne savons toujours pas exactement s'il s'agit d'un événement précoce (par exemple entrée/trafic du virus), d'un événement ultérieur dans le cycle de réplication (réplication du virus et interaction avec les protéines de l'hôte) ou d'une combinaison de plusieurs mécanismes. On peut également imaginer que l'amplification des cascades pathogènes déclenchées par des souches plus virulentes peut également se produire lorsqu'un seuil dans les molécules inflammatoires ou toxiques est produit lors de l'infection. Pour cela, il serait intéressant d'utiliser des outils moléculaires et de génétiques inverses afin d'étudier les éventuels déterminants génétiques impliqués dans la pathogénèse différentielle des différentes souches. Par exemple, il serait intéressant de déterminer si la substitution observée sur la lignée Europe 2 peut être responsable du phénotype observé c'est à dire plus de réplication, plus de persistance virale et plus délétère. De plus, un des mécanismes pouvant expliquer la virulence du virus est sa capacité à échapper à la réponse immunitaire. Il faudrait comprendre et déterminer les différents mécanismes mis en place par les différentes lignées d'USUV et du ZIKV. Inhibent-ils la réponse interféron (comme pour les JEV, WNV et DENV) ? Produisent-ils des molécules qui bloquent différentes étapes de l'activation du système du complément ? Inhibent-ils des mécanismes de la présentation antigénique ? Tant de questions qui permettront de mieux élucider la différence de tropisme entre les lignées dans les différents types cellulaires. En effet, certains *flavivirus* peuvent présenter une neurovirulence dépendante de la souche. Par exemple, le potentiel neuro-invasif du WNV est dépendant de la souche mais principalement en raison de la différence dans leur capacité à atteindre le SNC <sup>620</sup>. Dans certains cas, cette différence peut également être due à des capacités de réplication différentes dans les cellules de la BHE ou directement dans les cellules nerveuses, comme cela a été démontré pour le WNV <sup>489</sup> et le virus de la forêt de Semliki <sup>621</sup>. La caractérisation phénotypique complète des lignées d'USUV comme la virulence, la pathogénèse, la neuroinvasivité et la neuropathogénicité est nécessaire pour comprendre l'épidémiologie de ce virus et pour développer des vaccins et des traitements efficaces adaptés aux souches circulantes localement. En effet, il est important de s'inquiéter et de s'intéresser à ces nouveaux virus émergents, caractérisés actuellement comme peu dangereux, pour éviter ou anticiper une éventuelle épidémie comme c'est le cas cette année avec la pandémie de Covid-19.

## **5. Limites des modèles**

Enfin, bien que nos modèles soient représentatifs des caractéristiques et du phénotype de la BHE, ils ne sont pas parfaits. En effet, dans le surnageant basolatéral du modèle de BHE *in vitro*, les cytokines ou les chimokines libérées par les péricytes sont d'origine bovine. Par conséquent lors de nos manipulations en ELISA, nous détectons essentiellement lors de l'étude des surnageants basolatéral la sécrétion des molécules inflammatoires des cellules endothéliales. Nous pouvons émettre l'hypothèse que si le modèle était constitué de péricytes humains les cytokines et chimokines libérées pourraient potentiellement aggraver l'effet sur la perméabilité et augmenter encore plus l'attractivité des lymphocytes et des monocytes. De plus, dans ces modèles les interactions cellulaires décrites *in vivo* ne sont pas toutes reproduites. De ce fait, pour mimer encore davantage les conditions physiologiques de la BHE *in vivo*, il serait intéressant d'utiliser des modèles de BHE en 3D ou des systèmes dits « fluidiques » qui miment la circulation sanguine cérébrale pour se rapprocher au maximum de ce qui est observé *in vivo*. Une autre critique que nous pouvons formuler est l'utilisation des souris *ifnar*<sup>-/-</sup> qui ne récapitule qu'imparfaitement ce que nous pouvons observer chez l'Homme sachant que chez ces souris il y a une réduction de la réponse immunitaire et une augmentation de la susceptibilité aux infections virales liés à l'invalidation de la voie IFN. De plus, il a été montré que les voies IFN sont impliquées dans la régulation de l'intégrité de la BHE ce qui suggère que chez ces souris l'homéostasie de la BHE pourrait être modulée. L'utilisation des souriceaux a aussi des contraintes du fait que leur BHE ne soit pas totalement mature. Enfin, nos modèles *in vivo* pour les USUV et ZIKV ont leurs limites dans la mesure où la souris n'est probablement pas un hôte principal d'intérêt épidémiologique malgré la récente découverte d'USUV chez les rongeurs. Le modèle d'embryon de poulet pour l'USUV permettrait d'évoluer dans un environnement aviaire, le principal hôte. Les œufs embryonnés de poulet se sont avérés utiles dans d'autres cultures virales comme pour le WNV <sup>622</sup>. Un modèle d'infection d'œuf embryonné de poulet pourrait s'avérer essentiel pour approfondir les connaissances de la physiopathologie des différentes lignées d'USUV <sup>623</sup>. Pour le ZIKV, des modèles de primates non humains seraient des modèles supérieurs pour récapituler les maladies neurologiques humaines car leur cerveau, la structure de leur système nerveux et leurs réponses immunitaires à l'infection virale sont très similaires à ceux des humains.

## CONCLUSION

Les travaux de cette thèse ont permis d'approfondir et de mieux caractériser le neurotropisme des ZIKV et USUV. Nos observations suggèrent que l'infection directe des cellules endothéliales du cerveau par le ZIKV permet la réplication du virus et sa libération dans le parenchyme cérébral. La modulation des protéines de surface telles que les molécules d'adhérence cellulaire, les modulateurs des acteurs de jonction ainsi que la sécrétion de certaines chimiokines et molécules inflammatoires aident à recruter des leucocytes qui s'engagent dans la diapédèse et s'infiltrent davantage dans le SNC, favorisant ainsi la neuroinflammation. De plus, les péricytes et les astrocytes peuvent être infectés suite à l'entrée du virus dans le parenchyme et participer à l'entretien de l'état inflammatoire, éventuellement dans une zone locale de la BHE. Pour l'USUV, nos résultats permettent une caractérisation des profils physiopathologiques, infectieux et inflammatoires des différentes lignées circulantes chez la souris ainsi que dans des modèles *in vitro*. Prise ensemble, ces études suggèrent que les symptômes et la gravité des troubles causés par le virus dépendent de plusieurs facteurs, notamment le tropisme cellulaire, la cytopathogénicité virale ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte. Le dysfonctionnement neurovasculaire et la neuroinflammation sont également des facteurs clés dans l'étiologie et la progression des pathologies du SNC, qui pourraient être à l'origine du lien entre les troubles cérébraux et les agents pathogènes neurotropes. Pour cela, il est important pour la suite de caractériser des biomarqueurs reflétant par exemple des dommages neurovasculaires et/ou de l'inflammation dans le sang et le liquide céphalo-rachidien chez les patients infectés par les arbovirus afin de concevoir des stratégies préventives.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Weaver, S. C. & Reisen, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* **85**, 328–345 (2010).
2. Troupin, A. & Colpitts, T. M. Overview of West Nile Virus Transmission and Epidemiology. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1435**, 15–18 (2016).
3. Barzon, L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *Journal of Clinical Virology* **107**, 38–47 (2018).
4. Stapleton, J. T., Fong, S., Muerhoff, A. S., Bukh, J. & Simmonds, P. The GB viruses: A review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *Journal of General Virology* **92**, 233–246 (2011).
5. Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A. & Petersen, L. R. Zika virus and birth defects - Reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1981–1987 (2016).
6. Kuhn, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**, 717–725 (2002).
7. Cleaves, G. R. & Dubin, D. T. Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology* **96**, 159–165 (1979).
8. Wengler, G., Wengler, G. & Gross, H. J. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology* **89**, 423–437 (1978).
9. Daffis, S. *et al.* 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* **468**, 452–456 (2010).
10. Avirutnan, P. *et al.* Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* **3**, 1798–1812 (2007).
11. Hamel, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* **89**, 8880–8896 (2015).
12. Meertens, L. *et al.* Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep.* **18**, 324–333 (2017).
13. Acosta, E. G., Castilla, V. & Damonte, E. B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. doi:10.1099/vir.0.83357-0
14. Chu, J. J. H. & Ng, M. L. Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated Endocytic Pathway. *J. Virol.* **78**, 10543–10555 (2004).
15. Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. & Rice, C. M. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 649–688 (1990).
16. Mori, Y. *et al.* Nuclear Localization of Japanese Encephalitis Virus Core Protein Enhances Viral Replication. *J. Virol.* **79**, 3448–3458 (2005).
17. Khromykh, A. A., Meka, H., Guyatt, K. J. & Westaway, E. G. Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication. *J. Virol.* **75**, 6719–6728 (2001).
18. Yu, L. & Markoff, L. The Topology of Bulges in the Long Stem of the Flavivirus 3' Stem-Loop Is a Major Determinant of RNA Replication Competence. *J. Virol.* **79**, 2309–2324 (2005).
19. Mackenzie, J. M. & Westaway, E. G. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J. Virol.* **75**, 10787–99 (2001).
20. Gómez-Nicola, D., Fransen, N. L., Suzzi, S. & Hugh Perry, V. Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J. Neurosci.* **33**, 2481–2493 (2013).
21. Cuadros, M. A. & Navascués, J. The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog. Neurobiol.* **56**, 173–189 (1998).
22. Sierra, A., Tremblay, M.-È. & Wake, H. Never-resting microglia: physiological roles in the healthy brain and pathological implications. (2014). doi:10.3389/fncel.2014.00240

23. McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E. & McGeer, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the: Substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* **38**, 1285–1291 (1988).
24. Jimenez-Ferrer, I., Jewett, M., Tontanahal, A., Romero-Ramos, M. & Swanberg, M. Allelic difference in Mhc2ta confers altered microglial activation and susceptibility to  $\alpha$ -synuclein-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **106**, 279–290 (2017).
25. Helmut, K., Hanisch, U. K., Noda, M. & Verkhratsky, A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* **91**, 461–553 (2011).
26. Loo, Y. M. & Gale, M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* **34**, 680–692 (2011).
27. Suthar, M. S., Aguirre, S. & Fernandez-Sesma, A. Innate Immune Sensing of Flaviviruses. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
28. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
29. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**, 317–337
30. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. doi:10.1093/intimm/dxh186
31. Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunology* **7**, 131–137 (2006).
32. Broad, A., Kirby, J. A. & Jones, D. E. J. Toll-like receptor interactions: Tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon- $\beta$  production. *Immunology* **120**, 103–111 (2007).
33. Lu, C. *et al.* The structural basis of 5' triphosphate double-stranded RNA recognition by RIG-I C-terminal domain. *Structure* **18**, 1032–1043 (2010).
34. Belgnaoui, S. M., Paz, S. & Hiscott, J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Current Opinion in Immunology* **23**, 564–572 (2011).
35. Plataniias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology* **5**, 375–386 (2005).
36. Levy, D. E., Marié, I. J. & Durbin, J. E. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Current Opinion in Virology* **1**, 476–486 (2011).
37. Liu, Y.-J. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 275–306 (2005).
38. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* **357**, 1777–1789 (2001).
39. Vilček, J. Novel interferons. *Nat. Immunol.* **4**, 8–9 (2003).
40. De Weerd, N. A., Samarajiwa, S. A. & Hertzog, P. J. Type I interferon receptors: Biochemistry and biological functions. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 20053–20057 (2007).
41. Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. G. & Silverman, R. H. Identification of genes differentially regulated by interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15623–15628 (1998).
42. Samuel, C. E. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 778–809 (2001).
43. Lazear, H. M. & Diamond, M. S. New insights into innate immune restriction of West Nile virus infection. *Current Opinion in Virology* **11**, 1–6 (2015).
44. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
45. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
46. Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**, 509–513



- (2009).
47. Kerur, N. *et al.* IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* **9**, 363–375 (2011).
  48. Walsh, J. G., Muruve, D. A. & Power, C. Inflammasomes in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience* **15**, 84–97 (2014).
  49. Sahoo, M., Ceballos-Olvera, I., Barrio, L. del & Re, F. Role of the Inflammasome, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in Bacterial Infections. *Sci. World J.* **11**, 2037 (2011).
  50. Miao, E. A., Rajan, J. V. & Aderem, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological Reviews* **243**, 206–214 (2011).
  51. He, Z. *et al.* NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Zika Virus-Associated Inflammation. *J. Infect. Dis.* @**2018**, 1942–51 (1942).
  52. Ye, J., Zhu, B., Fu, Z. F., Chen, H. & Cao, S. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine* **31**, 461–471 (2013).
  53. Lubick, K. J. *et al.* Flavivirus antagonism of type I interferon signaling reveals prolydase as a regulator of IFNAR1 surface expression. *Cell Host Microbe* **18**, 61–74 (2015).
  54. Ma, D. Y. & Suthar, M. S. Mechanisms of innate immune evasion in re-emerging RNA viruses. *Current Opinion in Virology* **12**, 26–37 (2015).
  55. Romero-Brey, I. & Bartenschlager, R. Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses* **6**, 2826–2857 (2014).
  56. Aguirre, S. *et al.* DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
  57. Överby, A. K., Popov, V. L., Niedrig, M. & Weber, F. Tick-Borne Encephalitis Virus Delays Interferon Induction and Hides Its Double-Stranded RNA in Intracellular Membrane Vesicles. *J. Virol.* **84**, 8470–8483 (2010).
  58. Uchida, L. *et al.* The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. *Sci. Rep.* **4**, (2014).
  59. Heaton, N. S. & Randall, G. Dengue virus and autophagy. *Viruses* **3**, 1332–1341 (2011).
  60. Krejbich-Trotot, P. *et al.* Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virol. J.* **8**, 1–10 (2011).
  61. Blázquez, A.-B., Escribano-Romero, E., Merino-Ramos, T., Saiz, J.-C. & Martínez-Acebes, M. A. Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy. *Front. Microbiol.* **5**, 266 (2014).
  62. Schuessler, A. *et al.* West Nile Virus Noncoding Subgenomic RNA Contributes to Viral Evasion of the Type I Interferon-Mediated Antiviral Response. *J. Virol.* **86**, 5708–5718 (2012).
  63. Schulz, K. S. & Mossman, K. L. Viral evasion strategies in type I IFN signaling - A summary of recent developments. *Frontiers in Immunology* **7**, 498 (2016).
  64. Kumar, A. *et al.* Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep.* **17**, 1766–1775 (2016).
  65. Liu, W. J. *et al.* A Single Amino Acid Substitution in the West Nile Virus Nonstructural Protein NS2A Disables Its Ability To Inhibit Alpha/Beta Interferon Induction and Attenuates Virus Virulence in Mice. *J. Virol.* **80**, 2396–2404 (2006).
  66. Musso, D. & Gubler, D. J. Zika virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 487–524 (2016).
  67. Dick, G. W. A., KITCHEN, S. F. & HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–20 (1952).
  68. MacNamara, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **48**, 139–145 (1954).
  69. Marano, G., Pupella, S., Vaglio, S., Liunbruno, G. M. & Grazzini, G. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and Transfusion Medicine. *Blood Transfus.* **14**, 95–100 (2016).
  70. Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M. & Rousset, D. Zika virus genome from the Americas. *The Lancet* **387**, 227–228 (2016).
  71. Faye, O. *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with

- field-caught Mosquitoes. *Virology* **10**, (2013).
72. Haddow, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1477 (2012).
  73. Zhu, Z. *et al.* Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerg. Microbes Infect.* **5**, e22 (2016).
  74. Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S. & del Carmen Castillo Signor, L. Phylogeny of Zika virus in western Hemisphere, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 933–935 (2016).
  75. Yuan, L. *et al.* A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science (80-. )*. **358**, 933–936 (2017).
  76. Neal, J. W. Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *Journal of Infection* **69**, 203–215 (2014).
  77. Faria, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science (80-. )*. **352**, 345–349 (2016).
  78. Wang, L. *et al.* From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell Host and Microbe* **19**, 561–565 (2016).
  79. Simonin, Y., van Riel, D., Van de Perre, P., Rockx, B. & Salinas, S. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005821 (2017).
  80. Faye, O. *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2636 (2014).
  81. Carbaugh, D. L. & Lazear, H. M. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. (2020). doi:10.1128/JVI.00104-20
  82. Rodriguez-Morales, A. J., Bandeira, A. C. & Franco-Paredes, C. The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: A global concern. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **15**, (2016).
  83. Musso, D. *et al.* Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 359–361 (2015).
  84. Davidson, A., Slavinski, S., Komoto, K., Rakeman, J. & Weiss, D. Suspected female-to-male sexual transmission of Zika virus — New York city, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 716–717 (2016).
  85. Penot, P. *et al.* Infectious Zika virus in vaginal secretions from an HIV-infected woman, France, August 2016. *Eurosurveillance* **22**, (2017).
  86. Moreira, J., Peixoto, T. M., Siqueira, A. M. & Lamas, C. C. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection* **23**, 296–305 (2017).
  87. Baud, D., Musso, D., Vouga, M., Alves, M. P. & Vulliamoz, N. Zika virus: A new threat to human reproduction. *American Journal of Reproductive Immunology* **77**, (2017).
  88. Wilder-Smith, A., Chui, R., Chang, B. & Leong, W. Y. Original Article Original Article Zika in travellers. *J. Travel Med.* 1947–2017 (2018). doi:10.1093/jtm/tay044
  89. Besnard, M., Lastère, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. & Musso, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* **19**, 20751 (2014).
  90. Oliveira Melo, A. S. *et al.* Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* **47**, 6–7 (2016).
  91. Mlakar, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* (2016). doi:10.1056/NEJMoa1600651
  92. van der Eijk, A. A. *et al.* Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1002–1004 (2016).
  93. Brasil, P. *et al.* Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2321–2334 (2016).
  94. Dupont-Rouzeyrol, M., Biron, A., O'Connor, O., Huguon, E. & Descloux, E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *The Lancet* **387**, 1051 (2016).
  95. Mann, T. Z. *et al.* Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: A

- systematic review. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* **32**, 358–368 (2018).
96. Motta, I. J. F. *et al.* Evidence for transmission of zika virus by platelet transfusion. *New England Journal of Medicine* **375**, 1101–1103 (2016).
  97. Kuehnert, M. J. *et al.* Screening of blood donations for zika virus infection — Puerto rico, April 3–June 11, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 627–628 (2016).
  98. Galel, S. A. *et al.* First Zika-positive donations in the continental United States. *Transfusion* **57**, 762–769 (2017).
  99. Williamson, P. C. *et al.* First cases of Zika virus–infected US blood donors outside states with areas of active transmission. *Transfusion* **57**, 770–778 (2017).
  100. Swaminathan, S., Schlaberg, R., Lewis, J., Hanson, K. E. & Couturier, M. R. Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. *New England Journal of Medicine* **375**, 1907–1909 (2016).
  101. Bonaldo, M. C. *et al.* Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
  102. De M. Campos, R. *et al.* Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *Journal of Clinical Virology* **77**, 69–70 (2016).
  103. Musso, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. *J. Clin. Virol.* **68**, 53–5 (2015).
  104. Thangamani, S., Huang, J., Hart, C. E., Guzman, H. & Tesh, R. B. Vertical transmission of zika virus in aedes aegypti mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **95**, 1169–1173 (2016).
  105. Gloria-Soria, A. *et al.* Global genetic diversity of Aedes aegypti. *Mol. Ecol.* **25**, 5377–5395 (2016).
  106. Samy, A. M., Thomas, S. M., Wahed, A. A. El, Cohoon, K. P. & Townsend Peterson, A. Mapping the global geographic potential of Zika virus spread. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 559–560 (2016).
  107. Gutiérrez-Bugallo, G. *et al.* Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nature Ecology and Evolution* **3**, 561–569 (2019).
  108. Gubler, D. J. Dengue, Urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21 st century. *Tropical Medicine and Health* **39**, 3–11 (2011).
  109. Giron, S. *et al.* Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. *Eurosurveillance* **24**, 1900655 (2019).
  110. Ali, R. *et al.* Entomological Surveillance Associated with Human Zika Cases in Miri Sarawak, Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2020). doi:10.4269/ajtmh.19-0339
  111. Berthet, N. *et al.* Molecular characterization of three zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **14**, 862–865 (2014).
  112. Haddow, A. J., Williams, M. C., Woodall, J. P., Simpson, D. I. H. & Goma, L. K. H. *Twelve Isolations of Zika Virus from Aedes (Stegomyia) africanus (Theobald) taken in and above a Uganda Forest\**. *Bull. Org. mond. Santi* ) **31**, (Bull. Wid Hiith Org, 1964).
  113. Diallo, D. *et al.* Zika virus emergence in mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS One* **9**, (2014).
  114. Cornet, M. *et al.* Isolation of arboviruses from mosquitoes in Senegal Oriental. Notes on epidemiology. *Entomol. médicale Parasitol.* **17**, 149–163 (1979).
  115. Marchette, N. J., Garcia, R. & Rudnick, A. Isolation of Zika virus from Aedes aegypti mosquitoes in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **18**, 411–415 (1969).
  116. Weger-Lucarelli, J. *et al.* Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0005101 (2016).
  117. Olson, J. G., Ksiazek, T. G., Suhandiman, G. & Triwibowo, V. Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**, 389–393 (1981).
  118. Guerbois, M. *et al.* The Journal of Infectious Diseases. (2016). doi:10.1093/infdis/jiw302
  119. Li, M. I., Wong, P. S. J., Ng, L. C. & Tan, C. H. Oral susceptibility of Singapore Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1792 (2012).
  120. Hall-Mendelin, S. *et al.* Assessment of Local Mosquito Species Incriminates Aedes

- aegypti as the Potential Vector of Zika Virus in Australia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
121. Richard, V., Paoaafaite, T. & Cao-Lormeau, V. M. Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
  122. Chouin-Carneiro, T. *et al.* Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
  123. Musso, D., Nilles, E. J. & Cao-Lormeau, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O595–O596 (2014).
  124. Azar, S. R. *et al.* Differential vector competency of *Aedes albopictus* populations from the Americas for Zika Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 330–339 (2017).
  125. Wong, P. S. J., Li, M. zhi I., Chong, C. S., Ng, L. C. & Tan, C. H. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, (2013).
  126. Ledermann, J. P. *et al.* *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).
  127. Amraoui, F. *et al.* *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit zika virus. *Eurosurveillance* **21**, (2016).
  128. Diagne, C. T. *et al.* Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect. Dis.* **15**, 492 (2015).
  129. Guo, X. X. *et al.* *Culex pipiens quinquefasciatus*: A potential vector to transmit Zika virus. *Emerg. Microbes Infect.* **5**, (2016).
  130. Kraemer, M. U. G. *et al.* Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat. Microbiol.* **4**, 854–863 (2019).
  131. Dick, G. W. A. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 521–534 (1952).
  132. Maydat, L. & Demarchi, J. [Immunologic investigation on the frequency of arbovirus in bovines in the Central African Republic]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **58**, 801–11
  133. McCrae, A. W. R. & Kirya, B. G. Yellow fever and Zika virus epizootics and enzootics in Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**, 552–562 (1982).
  134. Kirya, B. G. & Okia, N. O. A yellow fever epizootic in Zika Forest, Uganda, during 1972: Part 2: Monkey serology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**, 300–303 (1977).
  135. Babaniyi, O. *et al.* Risk assessment for yellow fever in western and North-Western provinces of Zambia. *J. Glob. Infect. Dis.* **7**, 11–17 (2015).
  136. Saluzzo, J. F., Ivanoff, B., Languillat, G. & Georges, A. J. [Serological survey for arbovirus antibodies in the human and simian populations of the South-East of Gabon (author's transl)]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **75**, 262–6 (1982).
  137. Wolfe, N. D. *et al.* Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **64**, 310–316 (2001).
  138. Darwish, M. A., Hoogstraal, H., Roberts, T. J., Ahmed, I. P. & Omar, F. A sero-epidemiological survey for certain arboviruses (Togaviridae) in Pakistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 442–445 (1983).
  139. Fagbami, A. H. Zika virus infections in Nigeria: Virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J. Hyg. (Lond)*. **83**, 213–219 (1979).
  140. Kilbourn, A. M. *et al.* Health evaluation of free-ranging and semi-captive orangutans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Sabah, Malaysia. *J. Wildl. Dis.* **39**, 73–83 (2003).
  141. Simpson, D. I. H. Zika virus infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **58**, 335–338 (1964).
  142. Robin, Y. & Mouchet, J. [Serological and entomological study on yellow fever in Sierra Leone]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **68**, 249–58 (1975).
  143. Jan, C., Languillat, G., Renaudet, J. & Robin, Y. [A serological survey of arboviruses in Gabon]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **71**, 140–6 (1978).
  144. Saluzzo, J. F., Gonzalez, J. P., Hervé, J. P. & Georges, A. J. [Serological survey for the prevalence of certain arboviruses in the human population of the south-east area of Central African Republic (author's transl)]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **74**, 490–9

- (1981).
145. Monlun, E. *et al.* Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **86**, 21–28 (1993).
  146. Akoua-Koffi, C. *et al.* [Investigation surrounding a fatal case of yellow fever in Côte d'Ivoire in 1999]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **94**, 227–30 (2001).
  147. Duffy, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536–2543 (2009).
  148. WHO Zika Virus, Microcephaly and Guillain-Barré Syndrome Situation Report, 10 March 2017 - World | ReliefWeb. Available at: <https://reliefweb.int/report/world/who-zika-virus-microcephaly-and-guillain-barr-syndrome-situation-report-10-march-2017>. (Accessed: 21st May 2020)
  149. Musso, D., Baud, D. & Freedman, D. O. Should testing of donors be restricted to active Zika virus areas? *The Lancet Infectious Diseases* **16**, 1108–1109 (2016).
  150. Zika - Santé publique France. Available at: <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/zika>. (Accessed: 21st May 2020)
  151. Chen, L. H. & Hamer, D. H. Zika Virus: Rapid spread in the western hemisphere. *Annals of Internal Medicine* **164**, 613–615 (2016).
  152. Aubry, M. *et al.* Zika virus seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 669–672 (2017).
  153. Miner, J. J. & Diamond, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host and Microbe* **21**, 134–142 (2017).
  154. Cao-Lormeau, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* **387**, 1531–1539 (2016).
  155. Dos Santos, T. *et al.* Zika Virus and the Guillain-Barré syndrome - Case series from seven countries. *New England Journal of Medicine* **375**, 1598–1601 (2016).
  156. Uncini, A., Shahrizaila, N. & Kuwabara, S. Zika virus infection and Guillain-Barré syndrome: A review focused on clinical and electrophysiological subtypes. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* **88**, 266–271 (2017).
  157. Chan, J. F. W., Choi, G. K. Y., Yip, C. C. Y., Cheng, V. C. C. & Yuen, K. Y. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection* **72**, 507–524 (2016).
  158. Furtado, J. M., Espósito, D. L., Klein, T. M., Teixeira-Pinto, T. & Da Fonseca, B. A. Uveitis associated with zika virus infection. *New England Journal of Medicine* **375**, 394–396 (2016).
  159. Iosifidis, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et Maladies Infectieuses* **44**, 302–307 (2014).
  160. Ventura, C. V., Maia, M., Bravo-Filho, V., Góis, A. L. & Belfort, R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *The Lancet* **387**, 228 (2016).
  161. Fontes, B. M. Zika virus-related hypertensive iridocyclitis. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* **79**, 63–63 (2016).
  162. Cardona-Ospina, J. A. *et al.* Fatal Zika virus infection in the Americas: A systematic review. *Int. J. Infect. Dis.* **88**, 49–59 (2019).
  163. De Oliveira, W. K. *et al.* Increase in reported prevalence of microcephaly in infants born to women living in areas with confirmed Zika virus transmission during the first trimester of pregnancy — Brazil, 2015. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 242–247 (2016).
  164. Cauchemez, S. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. *Lancet* (2016). doi:10.1016/S0140-6736(16)00651-6
  165. Honein, M. A. *et al.* Birth defects among fetuses and infants of US women with evidence of possible zika virus infection during pregnancy. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **317**, 59–68 (2017).
  166. Vouga, M. & Baud, D. Imaging of congenital Zika virus infection: the route to identification of prognostic factors. *Prenatal Diagnosis* **36**, 799–811 (2016).

167. Russo, F. B., Jungmann, P. & Beltrão-Braga, P. C. B. Zika infection and the development of neurological defects. *Cell. Microbiol.* **19**, 1–6 (2017).
168. Satterfield-Nash, A. *et al.* Health and Development at Age 19–24 Months of 19 Children Who Were Born with Microcephaly and Laboratory Evidence of Congenital Zika Virus Infection During the 2015 Zika Virus Outbreak — Brazil, 2017. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **66**, 1347–1351 (2017).
169. Pessoa, A. *et al.* Motor abnormalities and epilepsy in infants and children with evidence of congenital zika virus infection. *Pediatrics* **141**, S167–S179 (2018).
170. van der Linden, H. *et al.* Epilepsy Profile in Infants with Congenital Zika Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* **379**, 891–892 (2018).
171. Lockrow, J., Tully, H. & Saneto, R. P. Epileptic spasms as the presenting seizure type in a patient with a new “O” of TORCH, congenital Zika virus infection. *Epilepsy Behav. Case Reports* **11**, 1–3 (2019).
172. Marques, F. J. P. *et al.* Children Born With Congenital Zika Syndrome Display Atypical Gross Motor Development and a Higher Risk for Cerebral Palsy. *J. Child Neurol.* **34**, 81–85 (2019).
173. van der Linden, V. *et al.* Description of 13 infants born during October 2015–January 2016 with congenital zika virus infection without microcephaly at birth — Brazil. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **65**, 1343–1348 (2016).
174. Nielsen-Saines, K. *et al.* Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. *Nat. Med.* **25**, 1213–1217 (2019).
175. Olschlager, S., Enfissi, A., Zaruba, M., Kazanji, M. & Rousset, D. Diagnostic validation of the realstar® zika virus reverse transcription polymerase chain reaction kit for detection of zika virus RNA in urine and serum specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **97**, 1070–1071 (2017).
176. Tappe, D. *et al.* First case of laboratory-confirmed zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Eurosurveillance* **19**, (2014).
177. Faye, O. *et al.* One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J. Clin. Virol.* **43**, 96–101 (2008).
178. Balm, M. N. D. *et al.* A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *J. Med. Virol.* **84**, 1501–1505 (2012).
179. Huits, R. *et al.* Detection of Zika Virus Replication in Human Semen by Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Targeting of Antisense Ribonucleic Acid. *J. Infect. Dis.* **222**, 319–323 (2020).
180. Ren, P. *et al.* Evaluation of aptima zika virus assay. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 2198–2203 (2017).
181. Lanciotti, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1232–1239 (2008).
182. Denis, J. *et al.* High specificity and sensitivity of Zika EDIIIbased ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, (2019).
183. Maria, A. T. *et al.* Zika virus infections in three travellers returning from South America and the Caribbean respectively, to Montpellier, France, December 2015 to January 2016. *Eurosurveillance* **21**, (2016).
184. Martines, R. B. *et al.* Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet* **388**, 898–904 (2016).
185. McIntosh BM. Usutu (SAAr 1776); nouvel arbovirus du groupe B. *Int Cat Arboviruses* **3**, 1059–60 (1985).
186. Woodall, J. The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending December 1963. *Proc E Afr Acad* **2**, 141–146 (1964).
187. Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S. B. & Sall, A. A. Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **11**, 1417–1423 (2011).
188. Bakonyi, T., Gould, E. A., Kolodziejek, J., Weissenböck, H. & Nowotny, N. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and other

- flaviviruses. *Virology* (2004). doi:10.1016/j.virol.2004.08.005
189. Engel, D. *et al.* Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. *MBio* **7**, 1–12 (2016).
  190. Cadar, D. *et al.* Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, Western Europe, 2016. *Eurosurveillance* (2017). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30452
  191. Nikolay, B. *et al.* Comparative full length genome sequence analysis of usutu virus isolates from Africa. *Viol. J.* **10**, 1 (2013).
  192. Eiden, M. *et al.* Emergence of two Usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infect. Genet. Evol.* j.meegid.2018.03.020 (2018). doi:10.1016/j.meegid.2018.03.020
  193. Lecollinet, S. *et al.* Dual emergence of Usutu virus in common blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerging Infectious Diseases* **22**, 2225–2227 (2016).
  194. Simonin, Y. *et al.* Human Usutu Virus Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, (2018).
  195. Cadar, D. *et al.* Putative lineage of novel African usutu virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1647–1650 (2015).
  196. Hönig, V. *et al.* Multiple lineages of usutu virus (Flaviviridae, flavivirus) in blackbirds (*turdus merula*) and mosquitoes (*culex pipiens*, *cx. modestus*) in the czech republic (2016–2019). *Microorganisms* **7**, (2019).
  197. Aberle, S. W. *et al.* Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Eurosurveillance* **23**, 1800545 (2018).
  198. Bournez, L. *et al.* Exposure of Wild Ungulates to the Usutu and Tick-Borne Encephalitis Viruses in France in 2009-2014: Evidence of Undetected Flavivirus Circulation a Decade Ago. *Viruses* **2020** **12**, 10 (2019).
  199. Grottola, A. *et al.* Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**, 33–37 (2017).
  200. Chvala, S. *et al.* Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003-2005. *Vet. Microbiol.* **122**, 237–245 (2007).
  201. Bakonyi, T. *et al.* Emergence of usutu virus in Hungary. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3870–3874 (2007).
  202. Gaibani, P. *et al.* Comparative Genomic and Phylogenetic Analysis of the First Usutu Virus Isolate from a Human Patient Presenting with Neurological Symptoms. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0064761
  203. Bakonyi, T. *et al.* Usutu virus, Austria and Hungary, 2010-2016. *Emerg. Microbes Infect.* **6**, e85 (2017).
  204. Weissenböck, H. *et al.* Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* (2002). doi:10.3201/eid0807.020094
  205. Cadar, D. *et al.* Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 1771–1773 (2014).
  206. Mannasse, B. *et al.* Usutu Virus RNA in Mosquitoes, Israel, 2014-2015. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1699–1702 (2017).
  207. Bakonyi, T., Busquets, N. & Nowotny, N. Comparison of complete genome sequences of Usutu virus strains detected in Spain, Central Europe, and Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **14**, 324–9 (2014).
  208. Cadar, D. *et al.* Blood donor screening for west nile virus (WNV) revealed acute usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Eurosurveillance* (2017). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.14.30501
  209. Pecorari, M. *et al.* Rapid communications First human case of usutu virus neuro invasive infection , italy , august - september 2009. 5–6 (2009).
  210. Savini, G. *et al.* Usutu virus in ITALY: An emergence or a silent infection? *Vet. Microbiol.* **151**, 264–274 (2011).
  211. Cavrini, F. *et al.* Usutu virus infection in a patient who underwent orthotropic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* **14**, (2009).
  212. Ochieng, C. *et al.* Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse

- ecological zones of Kenya; 2007 - 2012. *Virologica J.* **10**, 1–10 (2013).
213. Čabanová, V. *et al.* Co-circulation of west nile and usutu flaviviruses in mosquitoes in slovakia, 2018. *Viruses* **11**, (2019).
  214. Cook, C. L. *et al.* North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* are competent vectors for Usutu virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, e0006732 (2018).
  215. Calzolari, M. *et al.* No Title. *PLoS One* **5**, e14324 (2010).
  216. Mancini, G. *et al.* Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy. *Vet. Ital.* **53**, 97–110 (2017).
  217. Diallo, D. *et al.* Evaluation of the Performance of Different Traps for Sampling Usutu and West Nile Viruses and Mosquito (Diptera: Culicidae) Vectors in Senegal. *J. Med. Entomol.* **56**(1), 149–155 (2019).
  218. Rudolf, I. *et al.* Co-circulation of Usutu virus and West Nile virus in a reed bed ecosystem. **8**, 520 (2015).
  219. Ndiaye, E. H. *et al.* Arboviruses isolated from the Barkedji mosquito-based surveillance system, 2012-2013. *BMC Infect. Dis.* **18**, 642 (2018).
  220. Vázquez, A. *et al.* Usutu virus – potential risk of human disease in Europe.
  221. Sieg, M. *et al.* Outbreak and Cocirculation of Three Different Usutu Virus Strains in Eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **17**, 662–664 (2017).
  222. Puggioli, A. *et al.* Does *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) play any role in Usutu virus transmission in Northern Italy? Experimental oral infection and field evidences. *Acta Trop.* **172**, 192–196 (2017).
  223. Carletti, F. *et al.* Expanding usutu virus circulation in italy: Detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. *Eurosurveillance* **24**, (2019).
  224. Cerutti, F. *et al.* Evidence of mosquito-transmitted flavivirus circulation in Piedmont, north-western Italy. *Parasit. Vectors* **5**, 99 (2012).
  225. Pautasso, A. *et al.* Detection of West Nile and Usutu Viruses in Italian Free Areas: Entomological Surveillance in Piemonte and Liguria Regions, 2014. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **16**, 292–294 (2016).
  226. Busani, L. *et al.* West Nile virus circulation in Veneto region in 2008-2009. *Epidemiol. Infect.* **139**, 818–25 (2011).
  227. Grisenti, M. *et al.* Wide detection of *Aedes flavivirus* in north-eastern Italy - a European hotspot of emerging mosquito-borne diseases. *J. Gen. Virol.* **96**, 420–430 (2015).
  228. Busquets, N., Alba, A., Allepuz, A., Aranda, C. & Núñez, J. I. Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 861–863 (2008).
  229. Engler, O. *et al.* European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **10**, 4869–95 (2013).
  230. Camp, J. V, Kolodziejek, J. & Nowotny, N. Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus. *Parasit. Vectors* **12**, 46 (2019).
  231. Jöst, H. *et al.* Isolation of Usutu virus in Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2011). doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0248
  232. Calzolari, M. *et al.* Usutu Virus Persistence and West Nile Virus Inactivity in the Emilia-Romagna Region (Italy) in 2011. *PLoS One* **8**, (2013).
  233. Tamba, M. *et al.* Detection of Usutu Virus Within a West Nile Virus Surveillance Program in Northern Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **11**, 551–557 (2011).
  234. Fros, J. J. *et al.* Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Heal.* **1**, (2015).
  235. Abbo, S. R. *et al.* The invasive Asian bush mosquito *Aedes japonicus* found in the Netherlands can experimentally transmit Zika virus and Usutu virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14**, e0008217 (2020).
  236. Becker, N. *et al.* Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS One* **7**, (2012).
  237. Nikolay, B., Diallo, M., Faye, O., Boye, C. S. & Sall, A. A. Vector competence of *Culex neavei* (Diptera: Culicidae) for Usutu virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2012). doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0509
  238. Michel, F. *et al.* Evidence for west nile virus and usutu virus infections in wild and



- resident birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses* **11**, (2019).
239. Nikolay, B. A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: How much do transmission cycles overlap? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **109**, 609–618 (2015).
  240. Meister, T. *et al.* Serological evidence of continuing high Usutu virus (Flaviviridae) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. *Vet. Microbiol.* **127**, 237–248 (2008).
  241. Steinmetz, H. W. *et al.* Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland-Genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet. Microbiol.* (2011). doi:10.1016/j.vetmic.2010.09.018
  242. Buchebner, N. *et al.* Low Usutu virus seroprevalence in four zoological gardens in central Europe. *BMC Vet. Res.* **9**, 1 (2013).
  243. Esa. bilan-de-la-circulation-du-virus-usutu-en-france.
  244. Garigliany, M. *et al.* Usutu virus, Belgium, 2016. *Infect. Genet. Evol.* (2017). doi:10.1016/j.meegid.2016.12.023
  245. Benzarti, E. *et al.* Usutu Virus Epizootic in Belgium in 2017 and 2018: Evidence of Virus Endemization and Ongoing Introduction Events. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* vbz.2019.2469 (2019). doi:10.1089/vbz.2019.2469
  246. Benzarti, E. *et al.* First Evidence of Fatal Usutu Virus Natural Infections in an Anatidae, the Common Scoter (*Melanitta nigra*). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **19**, 777–780 (2019).
  247. Weidinger, P. *et al.* Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and Hungary, 2017–2018. *Transbound. Emerg. Dis.* (2019). doi:10.1111/tbed.13351
  248. Chevalier, V. *et al.* Serological evidence of west nile and usutu viruses circulation in domestic and wild birds in wetlands of mali and madagascar in 2008. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, (2020).
  249. Jaeger, A. *et al.* Serological evidence for the circulation of flaviviruses in seabird populations of the western Indian Ocean. *Epidemiol. Infect.* **144**, 652–660 (2016).
  250. Decors, A. *et al.* Le réseau Sagir: un outil de vigilance vis-à-vis des agents pathogènes exotiques. *Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment.* **2010**, 35–39 (2014).
  251. Lupulovic, D. *et al.* First Serological Evidence of West Nile Virus Activity in Horses in Serbia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **11**, 1303–1305 (2011).
  252. Barbic, L. *et al.* Demonstration of Usutu Virus Antibodies in Horses, Croatia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **13**, 772–774 (2013).
  253. Csank, T. *et al.* A Serosurvey of Flavivirus Infection in Horses and Birds in Slovakia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **XX**, vbz.2017.2216 (2018).
  254. Bażanów, B. *et al.* A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. *Viruses* **10**, 87 (2018).
  255. Durand, B. *et al.* Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: Dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiol. Infect.* **144**, 1857–1864 (2016).
  256. Ben Hassine, T. *et al.* First Detection of Co-circulation of West Nile and Usutu Viruses in Equids in the South-west of Tunisia. *Transbound. Emerg. Dis.* **61**, 385–389 (2014).
  257. Vanhomwegen, J. *et al.* Circulation of Zoonotic Arboviruses in Equine Populations of Mallorca Island (Spain). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **17**, 340–346 (2017).
  258. Montagnaro, S. *et al.* Serological Evidence of Mosquito-Borne Flaviviruses Circulation in Hunting Dogs in Campania Region, Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* vbz.2018.2337 (2018). doi:10.1089/vbz.2018.2337
  259. Caballero-Gómez, J. *et al.* Evidence of exposure to zoonotic flaviviruses in zoo mammals in Spain and their potential role as sentinel species. *Vet. Microbiol.* **247**, 108763 (2020).
  260. Escribano-Romero, E. *et al.* West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Vet. Microbiol.* **176**, 365–9 (2015).
  261. García-Bocanegra, I. *et al.* Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC Vet. Res.* **12**,

- 249 (2016).
262. Romeo, C. *et al.* Are tree squirrels involved in the circulation of flaviviruses in Italy? *Transbound. Emerg. Dis.* (2018). doi:10.1111/tbed.12874
  263. Diagne, M. *et al.* Usutu Virus Isolated from Rodents in Senegal. *Viruses* **11**, 181 (2019).
  264. Blázquez, A. B., Escribano-Romero, E., Martín-Acebes, M. A., Petrovic, T. & Saiz, J. C. Limited susceptibility of mice to Usutu virus (USUV) infection and induction of flavivirus cross-protective immunity. *Virology* **482**, 67–71 (2015).
  265. Weissenböck, H., Bakonyi, T., Chvala, S. & Nowotny, N. Experimental Usutu virus infection of suckling mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination. *Acta Neuropathol.* **108**, 453–460 (2004).
  266. Simpson, D. I. The susceptibility of *Arvicanthis abyssinicus* (Rüppell) to infection with various arboviruses. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **60**, 248–54 (1966).
  267. Martín-Acebes, M. A. *et al.* A recombinant DNA vaccine protects mice deficient in the alpha/beta interferon receptor against lethal challenge with Usutu virus. *Vaccine* **34**, 2066–2073 (2016).
  268. Benzarti, E. *et al.* New insights into the susceptibility of immunocompetent mice to Usutu virus. *Viruses* **12**, (2020).
  269. Weissenböck, H., Bakonyi, T., Rossi, G., Mani, P. & Nowotny, N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 274–277 (2013).
  270. Chevalier, V. *et al.* Predicting West Nile Virus Seroprevalence in Wild Birds in Senegal. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **9**, 589–596 (2009).
  271. Calzolari, M. *et al.* Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and 2014. *Infect. Genet. Evol.* **51**, 255–262 (2017).
  272. Cavrini, F. *et al.* A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Virol.* **50**, 221–223 (2011).
  273. Santini, M. *et al.* First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August–September 2013: clinical and laboratory features. *J. Neurovirol.* (2014). doi:10.1007/s13365-014-0300-4
  274. Vilibic-Cavlek, T. *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the “One health” context, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.13225 (2019). doi:10.1111/tbed.13225
  275. Nagy, A. *et al.* Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Euro Surveill.* **24**, (2019).
  276. Pacenti, M. *et al.* Clinical and virological findings in patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018. *Eurosurveillance* **24**, (2019).
  277. Bakonyi, T. *et al.* Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges. *Eurosurveillance* **22**, (2017).
  278. Zaaijer, H. L., Slot, E., Molier, M., Reusken, C. B. E. M. & Koppelman, M. H. G. M. Usutu virus infection in Dutch blood donors. *Transfusion* (2019). doi:10.1111/trf.15444
  279. Caracciolo, I. *et al.* Comprehensive response to Usutu virus following first isolation in blood donors in the Friuli Venezia Giulia region of Italy: Development of recombinant NS1-based serology and sensitivity to antiviral drugs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14**, e0008156 (2020).
  280. Percivalle, E. *et al.* West Nile or usutu virus? A three-year follow-up of humoral and cellular response in a group of asymptomatic blood donors. *Viruses* **12**, (2020).
  281. Barr, K. L., Anderson, B. D., Prakoso, D. & Long, M. T. Working with Zika and Usutu Viruses In Vitro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2016). doi:10.1371/journal.pntd.0004931
  282. Nikolay, B. *et al.* Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *J. Virol. Methods* **197**, 51–54 (2014).
  283. Patel, P. *et al.* Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virol. J.* **10**, 58 (2013).
  284. Vina-Rodríguez, A. *et al.* A Novel Pan- Flavivirus Detection and Identification Assay Based on RT-qPCR and Microarray. *Biomed Res. Int.* **2017**, 1–12 (2017).

285. Scaramozzino, N. *et al.* Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1922–1927 (2001).
286. Waxman, S. G. *Clinical neuroanatomy*. (McGraw-Hill Medical, 2009).
287. Banich, M. T. & Compton, R. J. *Cognitive Neuroscience*. (Cambridge University Press, 2018). doi:10.1017/9781316664018
288. Skoff, R. P. & Benjamins, J. A. Oligodendrocytes. in *Encyclopedia of the Neurological Sciences* 643–647 (Elsevier Inc., 2014). doi:10.1016/B978-0-12-385157-4.00188-3
289. Purves, D. *Neuroscience, 3rd Edition*.
290. Mark F. Bear, B. W. C. M. A. P. *Neuroscience* : 1–xlii, 975 pages : (2016).
291. McConnell, H. L., Kersch, C. N., Woltjer, R. L. & Neuwelt, E. A. The translational significance of the neurovascular unit. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 762–770 (2017).
292. Neuwelt, E. A. *et al.* Mechanisms of Disease: The Blood-Brain Barrier. *Neurosurgery* **54**, 131–142 (2004).
293. Ehrlich, P. & 1885, U. Das Sauerstoff-Beduerfnis des Organismus : Eine Farbenanalytische Studie. *ci.nii.ac.jp* 8:167
294. Lewandowsky, M. & 1900, U. Zür lehre der cerebrospinal flüssigkeit. *Zeitschrift für Klin. Medizin*, 40, 480–494
295. EE Goldmann - Abhandl Konigl preuss & 1913, U. Vitalfarbung am zentralnervensystem. *Abh. Preuss. Akad. Wiss. Phys. Math*
296. Reese, T. S. & Karnovsky, M. J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* **34**, 207–217 (1967).
297. Risau, W. & Wolburg, H. Development of the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences* **13**, 174–178 (1990).
298. Abbott, N. J. & Romero, I. A. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Molecular Medicine Today* **2**, 106–113 (1996).
299. Begley, D. J. & Brightman, M. W. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Progress in Drug Research* **61**, 39–78 (2003).
300. Dore-Duffy, P. & Cleary, K. Morphology and Properties of Pericytes Fat pericytes are adult stem cells View project Chapter 2 Morphology and Properties of Pericytes. *Methods Mol. Biol.* **686**, (2011).
301. Haseloff, R. F., Blasig, I. E., Bauer, H. C. & Bauer, H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology* **25**, 25–39 (2005).
302. Wolburg, H., Noell, S., Wolburg-Buchholz, K., Mack, A. & Fallier-Becker, P. Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier. *Neuroscientist* **15**, 180–193 (2009).
303. Bonkowski, D., Katyshev, V., Balabanov, R. D., Borisov, A. & Dore-Duffy, P. The CNS microvascular pericyte: Pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids and Barriers of the CNS* **8**, 1–12 (2011).
304. Ma, Q. *et al.* Blood-brain barrier-associated pericytes internalize and clear aggregated amyloid- $\beta$ 42 by LRP1-dependent apolipoprotein e isoform-specific mechanism. *Mol. Neurodegener.* **13**, (2018).
305. Mishra, A. *et al.* Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat. Neurosci.* **19**, 1619–1627 (2016).
306. Peppiatt, C. M., Howarth, C., Mobbs, P. & Attwell, D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* **443**, 700–704 (2006).
307. Hall, C. N. *et al.* Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508**, 55–60 (2014).
308. Shimizu, F. *et al.* Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem. Res.* **37**, 401–409 (2012).
309. Wolburg, H. & Lippoldt, A. *Tight junctions of the blood-brain barrier: Development,*

- composition and regulation.
310. Butt, A. M., Jones, H. C. & Abbott, N. J. *ELECTRICAL RESISTANCE ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER IN ANAESTHETIZED RATS: A DEVELOPMENTAL STUDY*. *Journal of Physiology* **429**, (1990).
  311. Furuse, M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, (2010).
  312. Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y. & Tsukita, S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell Biol.* **137**, 1393–1401 (1997).
  313. Lippoldt, A. *et al.* *MOLECULAR NEUROSCIENCE: Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C*. *Lippincott Williams & Wilkins* **11**,
  314. Huber, J. D., Egleton, R. D. & Davis, T. P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences* **24**, 719–725 (2001).
  315. Klaus Ebnet, A. S. S. O. and D. V. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? doi:10.1242/jcs.00930
  316. Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S. & Goodenough, D. A. *Identification of ZO-1: A High Molecular Weight Polypeptide Associated with the Tight Junction (Zonula Occludens) in a Variety of Epithelia*.
  317. Bauer, H. & Traweger, A. Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier &#8211; A Molecular Gatekeeper.
  318. Cordenonsi, M. *et al.* Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J. Cell Biol.* **147**, 1569–1581 (1999).
  319. Bazzoni, G. & Dejana, E. Endothelial cell-to-cell junctions: Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological Reviews* **84**, 869–901 (2004).
  320. Vestweber, D., Winderlich, M., Cagna, G. & Nottebaum, A. F. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends in Cell Biology* **19**, 8–15 (2009).
  321. Corada, M. Endothelial cell-to-cell junctions. *Artic. FASEB J.* (1995). doi:10.1096/fasebj.9.10.7615160
  322. Balda, M. S. *et al.* *Membrane Biology Assembly and Sealing of Tight Junctions: Possible Participation of G-proteins, Phospholipase C, Protein Kinase C and Calmodulin*. *J. Membrane Biol* **122**, (1991).
  323. Abbott, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of Anatomy* **200**, 629–638 (2002).
  324. Abbott, N. J., Rönnbäck, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* **7**, 41–53 (2006).
  325. Betz, A. & Goldstein, G. Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science (80-. )*. **202**, 225–227 (1978).
  326. Roberts, L. M. *et al.* SUBCELLULAR LOCALIZATION OF TRANSPORTERS ALONG THE RAT BLOOD-BRAIN BARRIER AND BLOOD-CEREBRAL-SPINAL FLUID BARRIER BY IN VIVO BIOTINYLATION. (2008). doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.015
  327. Liu, X., Tu, M., Kelly, R. S., Chen, C. & Smith, B. J. *DEVELOPMENT OF A COMPUTATIONAL APPROACH TO PREDICT BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY*. (2004).
  328. Sorani, M. D. *et al.* Novel variants in human Aquaporin-4 reduce cellular water permeability. doi:10.1093/hmg/ddn138
  329. O'donnell, M. E. & Lam, T. I. Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *Artic. J. Cereb. Blood Flow Metab.* (2006). doi:10.1038/sj.jcbfm.9600278
  330. Bradbury, M. W. & Kleeman, C. R. Stability of the potassium content of cerebrospinal fluid and brain. *Am. J. Physiol.* **213**, 519–528 (1967).
  331. Zlokovic, B. V. *et al.* A saturable mechanism for transport of immunoglobulin G across

- the blood-brain barrier of the guinea pig. *Exp. Neurol.* **107**, 263–270 (1990).
332. Pardridge, W. M. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Advanced Drug Delivery Reviews* **15**, 5–36 (1995).
  333. Pan, W. & Kastin, A. J. Entry of EGF into brain is rapid and saturable. *Peptides* **20**, 1091–1098 (1999).
  334. Begley, D. ABC Transporters and the Blood-Brain Barrier. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1295–1312 (2004).
  335. Dauchy, S. *et al.* ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J. Neurochem.* **107**, 1518–1528 (2008).
  336. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation Research* **100**, 158–173 (2007).
  337. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation Research* **100**, 174–190 (2007).
  338. Coomber, B. L. & Stewart, P. A. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc. Res.* **30**, 99–115 (1985).
  339. Brightman, M. W. & Reese, T. S. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* **40**, 648–677 (1969).
  340. Westergaard, E. & Brightman, M. W. Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J. Comp. Neurol.* **152**, 17–44 (1973).
  341. Nag, S., Kapadia, A. & Stewart, D. J. Review: Molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **37**, 3–23 (2011).
  342. Daneman, R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann. Neurol.* **72**, 648–672 (2012).
  343. Betz, A. L., Firth, J. A. & Goldstein, G. W. Polarity of the blood-brain barrier: Distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* **192**, 17–28 (1980).
  344. Henninger, D. D. *et al.* Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J. Immunol.* **158**, 1825–32 (1997).
  345. Ufnal, M. & Skrzypecki, J. Blood borne hormones in a cross-talk between peripheral and brain mechanisms regulating blood pressure, the role of circumventricular organs. *Neuropeptides* **48**, 65–73 (2014).
  346. Glezer, I., Simard, A. R. & Rivest, S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* **147**, 867–883 (2007).
  347. Engelhardt, B. & Wolburg, H. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur. J. Immunol.* **34**, 2955–2963 (2004).
  348. Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K. & Engelhardt, B. Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol.* **109**, 181–190 (2005).
  349. Davoust, N., Vuillat, C., Androdias, G. & Nataf, S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends in Immunology* **29**, 227–234 (2008).
  350. Wong, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, (2011).
  351. Nguyen, K. B. *et al.* Coordinated and Distinct Roles for IFN- $\alpha\beta$ , IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection. *J. Immunol.* **169**, 4279–4287 (2002).
  352. Niemiec, M. J. *et al.* Trace element landscape of resting and activated human neutrophils on the sub-micrometer level. *Metallomics* **7**, 996–1010 (2015).
  353. Huang, J., Upadhyay, U. M. & Tamargo, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg. Neurol.* **66**, 232–245 (2006).
  354. Owens, T., Bechmann, I. & Engelhardt, B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **67**, 1113–1121 (2008).
  355. Bolton, C. Neurovascular damage in experimental allergic encephalomyelitis: A target

- for pharmacological control. *Mediators of Inflammation* **6**, 295–302 (1997).
356. Kongsman, J. P., Drukarch, B. & Van Dam, A. M. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clinical Science* **112**, 1–25 (2007).
  357. Armulik, A., Mäe, M. & Betsholtz, C. Pericytes and the blood-brain barrier: Recent advances and implications for the delivery of CNS therapy. *Therapeutic Delivery* **2**, 419–422 (2011).
  358. Armulik, A. *et al.* Pericytes regulate the blood-brain barrier. (2010). doi:10.1038/nature09522
  359. Sims, D. E. The pericyte-A review. *Tissue and Cell* **18**, 153–174 (1986).
  360. Rucker, H. K., Wynder, H. J. & Thomas, W. E. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res. Bull.* **51**, 363–369 (2000).
  361. Majesky, M. W. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**, 1248–1258 (2007).
  362. Shepro, D. & Morel, N. M. L. Pericyte physiology. *FASEB J.* **7**, 1031–1038 (1993).
  363. Allt, G. & Lawrenson, J. G. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells. Tissues. Organs* **169**, 1–11 (2001).
  364. Kisler, K. *et al.* Pericyte degeneration leads to neurovascular uncoupling and limits oxygen supply to brain. *Nat. Neurosci.* **20**, 406–416 (2017).
  365. Cai, C. *et al.* Stimulation-induced increases in cerebral blood flow and local capillary vasoconstriction depend on conducted vascular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E5796–E5804 (2018).
  366. Alarcon-Martinez, L. *et al.* (No Title). doi:10.7554/eLife.34861.001
  367. Gerhardt, H. & Christen Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Artic. Cell Tissue Res.* **314**, 15–23 (2003).
  368. Elfont, R. M., Sundaresan, P. R. & Sladek, C. D. Adrenergic receptors on cerebral microvessels: Pericyte contribution. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **256**, (1989).
  369. Healy, D. P. & Wilk, S. Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II. *Brain Res.* **606**, 295–303 (1993).
  370. V, B. *et al.* VIP-like immunoreactivity within neurons and perivascular neuronal processes of the human cerebral cortex. *Eur. J. Histochem.* **40**, 53–56 (1996).
  371. Dehouck, M.-P. *et al.* Endothelin-1 as a Mediator of Endothelial Cell–Pericyte Interactions in Bovine Brain Capillaries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **17**, 464–469 (1997).
  372. Van Zwieten, E. J., Ravid, R., Swaab, D. F. & Woude, T. V. D. *Immunocytochemically stained vasopressin binding sites on blood vessels in the rat brain. Brain Research* **474**, (1988).
  373. Balabanov, R. & Dore-Duffy, P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J. Neurosci. Res.* **53**, 637–644 (1998).
  374. Hirschi, K. K. & D'Amore, P. A. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS* **79**, 419–428 (1997).
  375. Ribatti, D., Nico, B. & Crivellato, E. The role of pericytes in angiogenesis. *International Journal of Developmental Biology* **55**, 261–268 (2011).
  376. Sengillo, J. D. *et al.* Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **23**, 303–310 (2013).
  377. Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A. & Barres, B. A. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* **468**, 562–566 (2010).
  378. R, B., T, B. & P, D.-D. Role of Central Nervous System Microvascular Pericytes in Activation of Antigen-Primed Splenic T-lymphocytes. *J. Neurosci. Res.* **55**, (1999).
  379. Guillemin, G. J. & Brew, B. J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 388–397 (2004).
  380. Thomas, W. E. Brain macrophages: On the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Research Reviews* **31**, 42–57 (1999).
  381. Rustenhoven, J., Jansson, D., Smyth, L. C. & Dragunow, M. Brain Pericytes As

- Mediators of Neuroinflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 291–304 (2017).
382. Smyth, L. C. D. *et al.* Unique and shared inflammatory profiles of human brain endothelia and pericytes. *J. Neuroinflammation* **15**, 138 (2018).
  383. Kovac, A., Erickson, M. A. & Banks, W. A. Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: Cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *J. Neuroinflammation* **8**, (2011).
  384. Chen, Y. & Swanson, R. A. Astrocytes and Brain Injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 137–149 (2003).
  385. Volterra, A. & Meldolesi, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience* **6**, 626–640 (2005).
  386. Barreto, G. E., Gonzalez, J., Torres, Y. & Morales, L. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci. Res.* **71**, 107–13 (2011).
  387. Adelson, J. D. *et al.* Neuroprotection from Stroke in the Absence of MHC1 or PirB. *Neuron* **73**, 1100–1107 (2012).
  388. Hamby, M. E. & Sofroniew, M. V. Reactive Astrocytes as Therapeutic Targets for CNS Disorders. *Neurotherapeutics* **7**, 494–506 (2010).
  389. Astrocytes - Methods and Protocols | Richard Milner | Springer. Available at: <https://www.springer.com/gp/book/9781617794513>. (Accessed: 22nd May 2020)
  390. Noell, S. *et al.* Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur. J. Neurosci.* **33**, 2179–2186 (2011).
  391. Maragakis, N. J. & Rothstein, J. D. Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nature Clinical Practice Neurology* **2**, 679–689 (2006).
  392. Attwell, D. *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**, 232–243 (2010).
  393. Gordon, G. R. J., Howarth, C. & MacVicar, B. A. Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Exp. Physiol.* **96**, 393–399 (2011).
  394. Theis, M. & Giaume, C. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Research* **1487**, 88–98 (2012).
  395. Alvarez, J. I., Katayama, T. & Prat, A. Glial influence on the blood brain barrier. *GLIA* **61**, 1939–1958 (2013).
  396. Kimelberg, H. K. & Nedergaard, M. Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics* **7**, 338–353 (2010).
  397. Parpura, V., Grubišić, V. & Verkhratsky, A. Ca<sup>2+</sup> sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1813**, 984–991 (2011).
  398. Janzer, R. C. & Raff, M. C. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**, 253–257 (1987).
  399. Wong, A. D. *et al.* The blood-brain barrier: An engineering perspective. *Frontiers in Neuroengineering* **6**, (2013).
  400. Lee, S. *et al.* Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell* **130**, 691–703 (2007).
  401. Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A. & John, G. R. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1977–1982 (2009).
  402. Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K. & Antel, J. P. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* **36**, 145–155 (2001).
  403. Wosik, K. *et al.* Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis. *J. Neurosci.* **27**, 9032–9042 (2007).
  404. McKimmie, C. S. & Graham, G. J. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 1006–1011 (2010).
  405. Vesce, S., Rossi, D., Brambilla, L. & Volterra, A. Glutamate Release from Astrocytes in Physiological Conditions and in Neurodegenerative Disorders Characterized by Neuroinflammation. *International Review of Neurobiology* **82**, 57–71 (2007).
  406. Rossi, D. & Volterra, A. Astrocytic dysfunction: Insights on the role in

- neurodegeneration. *Brain Research Bulletin* **80**, 224–232 (2009).
407. Schlageter, K. E., Molnar, P., Lapin, G. D. & Groothuis, D. R. Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: Microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc. Res.* **58**, 312–328 (1999).
  408. Zlokovic, B. V. Neurovascular mechanisms of Alzheimer’s neurodegeneration. *Trends in Neurosciences* **28**, 202–208 (2005).
  409. Zlokovic, B. V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* **57**, 178–201 (2008).
  410. Banerjee, S. & Bhat, M. A. Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**, 235–258 (2007).
  411. Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endo... : NeuroReport. Available at: [https://journals.lww.com/neuroreport/Abstract/2000/04070/Neurons\\_and\\_ECM\\_regulate\\_occludin\\_localization\\_in.35.aspx](https://journals.lww.com/neuroreport/Abstract/2000/04070/Neurons_and_ECM_regulate_occludin_localization_in.35.aspx). (Accessed: 22nd May 2020)
  412. Weidenfeller, C., Svendsen, C. N. & Shusta, E. V. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J. Neurochem.* **101**, 555–565 (2007).
  413. Klein, R. S. *et al.* Neuronal CXCL10 Directs CD8+ T-Cell Recruitment and Control of West Nile Virus Encephalitis. *J. Virol.* **79**, 11457–11466 (2005).
  414. Kalia, M. *et al.* Japanese Encephalitis Virus Infects Neuronal Cells through a Clathrin-Independent Endocytic Mechanism. (2013). doi:10.1128/JVI.01399-12
  415. Del Zoppo, G. J. *et al.* Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. in *Biochemical Society Transactions* **34**, 1261–1266 (Portland Press, 2006).
  416. Del Zoppo, G. J. & Milner, R. Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 1966–1975 (2006).
  417. Sorokin, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature Reviews Immunology* **10**, 712–723 (2010).
  418. Engelhardt, B. & Sorokin, L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology* **31**, 497–511 (2009).
  419. Tilling, T., Korte, D., Hoheisel, D. & Galla, H.-J. Basement Membrane Proteins Influence Brain Capillary Endothelial Barrier Function In Vitro. *J. Neurochem.* **71**, 1151–1157 (2002).
  420. De Chiara, G. *et al.* Infectious agents and neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* **46**, 614–638 (2012).
  421. Ludlow, M. *et al.* Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol.* (2015). doi:10.1007/s00401-015-1511-3
  422. Agner, S. C. & Klein, R. S. Viruses have multiple paths to central nervous system pathology. *Current Opinion in Neurology* **31**, 313–317 (2018).
  423. Thakur, K. T. *et al.* Global HIV neurology: a comprehensive review. *AIDS* **1** (2018). doi:10.1097/QAD.0000000000001796
  424. Alfahad, T. & Nath, A. Retroviruses and amyotrophic lateral sclerosis. *Antiviral Research* **99**, 180–187 (2013).
  425. Canet, G. *et al.* HIV Neuroinfection and Alzheimer’s Disease: Similarities and Potential Links? *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 1–13 (2018).
  426. Tarter, K. D., Simanek, A. M., Dowd, J. B. & Aiello, A. E. Persistent viral pathogens and cognitive impairment across the life course in the third national health and nutrition examination survey. *J. Infect. Dis.* **209**, 837–844 (2014).
  427. Itzhaki, R. F. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer’s disease: increasing evidence for a major role of the virus. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 202 (2014).
  428. Lurain, N. S. *et al.* Virological and immunological characteristics of human cytomegalovirus infection associated with Alzheimer disease. *J. Infect. Dis.* **208**, 564–72 (2013).
  429. Lee, B. E. & Davies, H. D. Aseptic meningitis. *Current Opinion in Infectious Diseases*



- 20**, 272–277 (2007).
430. Garg, R. K. *et al.* Subacute sclerosing panencephalitis. *Reviews in Medical Virology* **29**, (2019).
  431. Koyuncu, O. O., Hogue, I. B. & Enquist, L. W. Virus infections in the nervous system. *Cell Host and Microbe* **13**, 379–393 (2013).
  432. Salinas, S., Schiavo, G. & Kremer, E. J. A hitchhiker's guide to the nervous system: The complex journey of viruses and toxins. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 645–655 (2010).
  433. Dittmar, S. *et al.* Measles Virus-Induced Block of Transendothelial Migration of T Lymphocytes and Infection-Mediated Virus Spread across Endothelial Cell Barriers. *J. Virol.* **82**, 11273–11282 (2008).
  434. Liou, M. L. & Hsu, C. Y. Japanese encephalitis virus is transported across the cerebral blood vessels by endocytosis in mouse brain. *Cell Tissue Res.* **293**, 389–394 (1998).
  435. Daniels, B. P. *et al.* Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *MBio* **5**, (2014).
  436. Verma, S. *et al.* West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology* **385**, 425–433 (2009).
  437. Papa, M. P. *et al.* Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Front. Microbiol.* **8**, 2557 (2017).
  438. Afonso, P. V. *et al.* Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathog.* **4**, (2008).
  439. McGavern, D. B. & Kang, S. S. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nature Reviews Immunology* **11**, 318–329 (2011).
  440. Paul, A. M. *et al.* Osteopontin facilitates West Nile virus neuroinvasion via neutrophil 'trojan horse' transport. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
  441. Peluso, R., Haase, A., Stowring, L., Edwards, M. & Ventura, P. A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. *Virology* **147**, 231–236 (1985).
  442. Tiong, V., Shu, M. H., Wong, W. F., Abubakar, S. & Chang, L. Y. Nipah virus infection of immature dendritic cells increases its transendothelial migration across human brain microvascular endothelial cells. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
  443. Wang, S. *et al.* Drak2 contributes to West Nile virus entry into the brain and lethal encephalitis. *J. Immunol.* **181**, 2084–91 (2008).
  444. Schönrich, G. & Raftery, M. J. Dendritic cells as Achilles' heel and Trojan horse during varicella zoster virus infection. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
  445. Dutta, K., Mishra, M. K., Nazmi, A., Kumawat, K. L. & Basu, A. Minocycline differentially modulates macrophage mediated peripheral immune response following Japanese encephalitis virus infection. *Immunobiology* **215**, 884–893 (2010).
  446. Geisbert, T. W. *et al.* Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques: Evidence that Dendritic Cells are Early and Sustained Targets of Infection. *Am. J. Pathol.* **163**, 2347–2370 (2003).
  447. Li, Z. L., Liang, X., Li, H. C., Wang, Z. M. & Chong, T. Dendritic cells serve as a 'trojan horse' for oncolytic adenovirus delivery in the treatment of mouse prostate cancer. *Acta Pharmacol. Sin.* **37**, 1121–1128 (2016).
  448. Kaul, M., Garden, G. A. & Lipton, S. A. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature* **410**, 988–994 (2001).
  449. Roe, K., Orillo, B. & Verma, S. West nile virus-induced cell adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells regulate leukocyte adhesion and modulate permeability of the in vitro blood-brain barrier model. *PLoS One* **9**, (2014).
  450. Tabor-Godwin, J. M. *et al.* A novel population of myeloid cells responding to coxsackievirus infection assists in the dissemination of virus within the neonatal CNS. *J. Neurosci.* **30**, 8676–8691 (2010).
  451. Schneider, H. *et al.* Chemotaxis of T-cells after infection of human choroid plexus papilloma cells with Echovirus 30 in an in vitro model of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Virus Res.* **170**, 66–74 (2012).

452. Falangola, M. F., Hanly, A., Galvao-Castro, B. & Petito, C. K. HIV infection of human choroid plexus: A possible mechanism of viral entry into the CNS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**, 497–503 (1995).
453. Petito, C. K. *et al.* HIV infection of choroid plexus in AIDS and asymptomatic HIV-infected patients suggests that the choroid plexus may be a reservoir of productive infection. *J. Neurovirol.* **5**, 670–677 (1999).
454. Tirabassi, R. S., Townley, R. A., Eldridge, M. G. & Enquist, L. W. Molecular mechanisms of neurotropic herpesvirus invasion and spread in the CNS. in *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **22**, 709–720 (Pergamon, 1998).
455. Smith, G. Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 153–176 (2012).
456. Hirokawa, N. & Takemura, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature Reviews Neuroscience* **6**, 201–214 (2005).
457. Vale, R. D. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467–480 (2003).
458. Ugolini, G. *Rabies Virus as a Transneuronal Tracer of Neuronal Connections. Advances in Virus Research* **79**, (Adv Virus Res, 2011).
459. Callaway, E. M. & Luo, L. Monosynaptic circuit tracing with glycoprotein-deleted rabies viruses. *J. Neurosci.* **35**, 8979–8985 (2015).
460. Gluska, S. *et al.* Rabies Virus Hijacks and Accelerates the p75NTR Retrograde Axonal Transport Machinery. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
461. Powers, A. M. & Logue, C. H. Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology* **88**, 2363–2377 (2007).
462. Kalinke, U., Bechmann, I. & Detje, C. N. Host strategies against virus entry via the olfactory system. (2011). doi:10.4161/viru.2.4.16138
463. St-Jean, J. R. *et al.* Human Respiratory Coronavirus OC43: Genetic Stability and Neuroinvasion. *J. Virol.* **78**, 8824–8834 (2004).
464. Yeh, E. A., Collins, A., Cohen, M. E., Duffner, P. K. & Faden, H. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics* **113**, (2004).
465. Salimi, H., Cain, M. D. & Klein, R. S. Encephalitic Arboviruses: Emergence, Clinical Presentation, and Neuropathogenesis. *Neurotherapeutics* **13**, 514–534 (2016).
466. Sejvar, J. J. *et al.* Neurologic Manifestations and Outcome of West Nile Virus Infection. *JAMA* **290**, 511 (2003).
467. Barzon, L. *et al.* West Nile virus infection in children. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **13**, 1373–1386 (2015).
468. Carson, P. J. *et al.* Long-Term Clinical and Neuropsychological Outcomes of West Nile Virus Infection. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 723–730 (2006).
469. Ouhoumanne, N. *et al.* Morbidity, mortality and long-term sequelae of West Nile virus disease in Québec. *Epidemiol. Infect.* **146**, 867–874 (2018).
470. Li, G. H., Ning, Z. J., Liu, Y. M. & Li, X. H. Neurological manifestations of dengue infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**, (2017).
471. Vieira, M. A. da C. E. S. *et al.* Potential role of dengue virus, chikungunya virus and Zika virus in neurological diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, e170538 (2018).
472. Marinho, P. E. S. *et al.* Meningitis associated with simultaneous infection by multiple dengue virus serotypes in children, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 115–118 (2017).
473. Cam, B. V. *et al.* Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**, 848–851 (2001).
474. Miagostovich M P, R. R. G. Retrospective Study on Dengue Fatal Cases. *Clin neuropathol* **16**, 204–8 (1997).
475. Jennings, A. D. *et al.* *Analysis of a Yellow Fever Virus Isolated from a Fatal Case of Vaccine-Associated Human Encephalitis.* (1994).
476. Beck, A. S. & Barrett, A. D. T. Current status and future prospects of yellow fever vaccines. *Expert Review of Vaccines* **14**, 1479–1492 (2015).
477. Yin, Z. *et al.* Neurological sequelae of hospitalized Japanese encephalitis cases in

- Gansu province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **92**, 1125–1129 (2015).
478. Kumar, R. *et al.* Clinical sequelae of Japanese encephalitis in children. *Indian J. Med. Res.* **97**, 9–13 (1993).
479. Bian, P. *et al.* Mesenchymal stem cells alleviate Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and mortality. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 38 (2017).
480. Wang, K. *et al.* IP-10 promotes blood-brain barrier damage by inducing tumor necrosis factor alpha production in Japanese encephalitis. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
481. Holzmann, H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* **21**, S36–S40 (2003).
482. Gustaw-Rothenberg, K. Cognitive Impairment after Tick-Borne Encephalitis. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **26**, 165–168 (2008).
483. Veje, M. *et al.* Tick-Borne Encephalitis sequelae at long-term follow-up: a self-reported case–control study. *Acta Neurol. Scand.* **134**, 434–441 (2016).
484. Tyler, K. L. Emerging Viral Infections of the Central Nervous System. **66**, 1065–1074 (2010).
485. VAN DEN BROEK, M. F., MULLER, U., HUANG, S., ZINKERNAGEL, R. M. & AGUET, M. Immune Defence in Mice Lacking Type I and/or Type II Interferon Receptors. *Immunol. Rev.* **148**, 5–18 (1995).
486. Detje, C. N. *et al.* Local Type I IFN Receptor Signaling Protects against Virus Spread within the Central Nervous System. *J. Immunol.* **182**, 2297–2304 (2009).
487. Mustafá, Y. M., Meuren, L. M., Coelho, S. V. A. & De Arruda, L. B. Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. *Frontiers in Microbiology* **10**, (2019).
488. Hasebe, R. *et al.* Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiol.* **10**, 165 (2010).
489. Hussmann, K. L., Samuel, M. A., Kim, K. S., Diamond, M. S. & Fredericksen, B. L. Differential Replication of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of West Nile Virus within Astrocytes. *J. Virol.* **87**, 2814–2822 (2013).
490. Bai, F. *et al.* A Paradoxical Role for Neutrophils in the Pathogenesis of West Nile Virus. *J. Infect. Dis.* **202**, 1804–1812 (2010).
491. Xu, Z., Waeckerlin, R., Urbanowski, M. D., van Marle, G. & Hobman, T. C. West Nile Virus Infection Causes Endocytosis of a Specific Subset of Tight Junction Membrane Proteins. *PLoS One* **7**, e37886 (2012).
492. Arjona, A. *et al.* Abrogation of macrophage migration inhibitory factor decreases West Nile virus lethality by limiting viral neuroinvasion. *J. Clin. Invest.* **117**, 3059–3066 (2007).
493. Verma, S., Kumar, M., Gurjav, U., Lum, S. & Nerurkar, V. R. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* **397**, 130–138 (2010).
494. Roe, K. *et al.* West nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J. Gen. Virol.* **93**, 1193–1203 (2012).
495. Dai, J., Wang, P., Bai, F., Town, T. & Fikrig, E. ICAM-1 Participates in the Entry of West Nile Virus into the Central Nervous System. *J. Virol.* **82**, 4164–4168 (2008).
496. Wang, P. *et al.* Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates West Nile Virus Entry into the Brain. *J. Virol.* **82**, 8978–8985 (2008).
497. Lazear, H. M. *et al.* Interferon- restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. *Sci. Transl. Med.* **7**, 284ra59–284ra59 (2015).
498. Miner, J. J. *et al.* The TAM receptor MerTK protects against neuroinvasive viral infection by maintaining blood-brain barrier integrity. *Nat. Med.* **21**, 1464–1472 (2015).
499. Wang, T. *et al.* Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* **10**, 1366–1373 (2004).
500. Velandia-Romero, M. L., Acosta-Losada, O. & Castellanos, J. E. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. *J. Neurovirol.* **18**, 374–387 (2012).
501. Andrews, B. S. *et al.* Replication of dengue and junin viruses in cultured rabbit and

- human endothelial cells. *Infect. Immun.* **20**, 776–781 (1978).
502. da Conceição, T. M. *et al.* Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. *Virology* **435**, 281–292 (2013).
  503. Limonta, D., Capó, V., Torres, G., Pérez, A. B. & Guzmán, M. G. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J. Clin. Virol.* **40**, 50–54 (2007).
  504. Velandia-Romero, M. L., Calderón-Peláez, M. A. & Castellanos, J. E. In vitro infection with dengue virus induces changes in the structure and function of the mouse brain endothelium. *PLoS One* **11**, (2016).
  505. Cardier, J. E. *et al.* Evidence of vascular damage in dengue disease: Demonstration of high levels of soluble cell adhesion molecules and circulating endothelial cells. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.* **13**, 335–340 (2006).
  506. Bhatt, R. S., Kothari, S. T., Gohil, D. J., D'Souza, M. & Chowdhary, A. S. Novel evidence of microglial immune response in impairment of Dengue infection of CNS. *Immunobiology* **220**, 1170–1176 (2015).
  507. Salazar, M. I. *et al.* Dengue Virus Type 2: Protein Binding and Active Replication in Human Central Nervous System Cells. *Sci. World J.* **2013**, (2013).
  508. Hotta, H. *et al.* Localization of Dengue Virus in Nude Mice. *Microbiol. Immunol.* **25**, 89–93 (1981).
  509. Salomão, N. G. *et al.* BALB/c mice infected with DENV-2 strain 66985 by the intravenous route display injury in the central nervous system. *Sci. Rep.* **8**, 1–13 (2018).
  510. Sarathy, V. V. *et al.* Characterization of lethal dengue virus type 4 (DENV-4) TVP-376 infection in mice lacking both IFN- $\alpha/\beta$  and IFN- $\gamma$  receptors (AG129) and comparison with the DENV-2 AG129 mouse model. *J. Gen. Virol.* **96**, 3035–3048 (2015).
  511. Prestwood, T. R. *et al.* Gamma Interferon (IFN- $\gamma$ ) Receptor Restricts Systemic Dengue Virus Replication and Prevents Paralysis in IFN- $\gamma$  Receptor-Deficient Mice. *J. Virol.* **86**, 12561–12570 (2012).
  512. Vasconcelos, B. C. B. *et al.* Antibody-enhanced dengue disease generates a marked CNS inflammatory response in the black-tufted marmoset *Callithrix penicillata*. *Neuropathology* **36**, 3–16 (2016).
  513. Barrett, A. D. T. & Gould, E. A. Comparison of neurovirulence of different strains of yellow fever virus in mice. *J. Gen. Virol.* **67**, 631–637 (1986).
  514. Mims, C. A. The Invasion of the Brain by Yellow Fever Virus Present in the Blood of Mice. *Br. J. Exp. Pathol.* **38**, 329 (1957).
  515. Luethy, L. N. *et al.* Comparison of three neurotropic viruses reveals differences in viral dissemination to the central nervous system. *Virology* **487**, 1–10 (2016).
  516. Douam, F. *et al.* Type III interferon-mediated signaling is critical for controlling live attenuated yellow fever virus infection in vivo. *MBio* **8**, (2017).
  517. Jamil Al-Obaidi, M. M. *et al.* Japanese encephalitis virus disrupts blood-brain barrier and modulates apoptosis proteins in THBMEC cells. *Virus Res.* **233**, 17–28 (2017).
  518. Agrawal, T., Sharvani, V., Nair, D. & Medigeshi, G. R. Japanese Encephalitis Virus Disrupts Cell-Cell Junctions and Affects the Epithelial Permeability Barrier Functions. *PLoS One* **8**, (2013).
  519. Patabendige, A., Michael, B. D., Craig, A. G. & Solomon, T. Brain microvascular endothelial-astrocyte cell responses following Japanese encephalitis virus infection in an in vitro human blood-brain barrier model. *Mol. Cell. Neurosci.* **89**, 60–70 (2018).
  520. Chen, C.-J. *et al.* Infection of Pericytes In Vitro by Japanese Encephalitis Virus Disrupts the Integrity of the Endothelial Barrier. *J. Virol.* **88**, 1150–1161 (2014).
  521. Chang, C. Y. *et al.* Disruption of in vitro endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-infected astrocytes. *Glia* **63**, 1915–1932 (2015).
  522. Bhowmick, S. *et al.* Induction of IP-10 (CXCL10) in astrocytes following Japanese encephalitis. *Neurosci. Lett.* **414**, 45–50 (2007).
  523. Myint, K. S. A. *et al.* Neuropathogenesis of Japanese Encephalitis in a Primate Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).
  524. Li, F. *et al.* Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation

- Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. *J. Virol.* **89**, 5602–5614 (2015).
525. Růžek, D. *et al.* Morphological changes in human neural cells following tick-borne encephalitis virus infection. *J. Gen. Virol.* **90**, 1649–1658 (2009).
  526. Bílý, T. *et al.* Electron Tomography Analysis of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Human Neurons. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
  527. Potokar, M., Korva, M., Jorgačevski, J., Avšič-Županc, T. & Zorec, R. Tick-Borne Encephalitis Virus Infects Rat Astrocytes but Does Not Affect Their Viability. *PLoS One* **9**, e86219 (2014).
  528. Palus, M. *et al.* Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* **95**, 2411–2426 (2014).
  529. Lindqvist, R. *et al.* Fast type I interferon response protects astrocytes from flavivirus infection and virus-induced cytopathic effects. *J. Neuroinflammation* **13**, (2016).
  530. Palus, M. *et al.* Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity. *Virology* **507**, 110–122 (2017).
  531. Růžek, D., Salát, J., Singh, S. K. & Kopecký, J. Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells. *PLoS One* **6**, (2011).
  532. Atrasheuskaya, A. V., Fredeking, T. M. & Ignatyev, G. M. Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clin. Exp. Immunol.* **131**, 148–154 (2003).
  533. Avšič-Županc, T. *et al.* Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clin. Diagn. Virol.* **4**, 51–59 (1995).
  534. Cugola, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* **534**, 267–71 (2016).
  535. Zhang, N. *et al.* Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* **19**, 120–126 (2016).
  536. Garcez, P. P. *et al.* Zika virus: Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science (80-. )*. **352**, 816–818 (2016).
  537. Dudley, D. M. *et al.* A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
  538. Bramley, J. C. *et al.* A Three-Dimensional Cell Culture System To Model RNA Virus Infections at the Blood-Brain Barrier. *mSphere* **2**, e00206-17 (2017).
  539. Mladinich, M. C., Schwedes, J. & Mackow, E. R. Zika Virus Persistently Infects and Is Basolaterally Released from Primary. *MBio* **8**, 1–17 (2017).
  540. Alimonti, J. B. *et al.* Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. *Fluids Barriers CNS* **15**, (2018).
  541. Leda, A. R. *et al.* Selective Disruption of the Blood–Brain Barrier by Zika Virus. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
  542. Ayala-Nunez, N. V. *et al.* Zika virus enhances monocyte adhesion and transmigration favoring viral dissemination to neural cells. *Nat. Commun.* **10**, 1–16 (2019).
  543. Diop, F. *et al.* Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. *PLoS One* **13**, e0206093 (2018).
  544. Bayless, N. L., Greenberg, R. S., Swigut, T., Wysocka, J. & Blish, C. A. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe* (2016). doi:10.1016/j.chom.2016.09.006
  545. Sánchez-San Martín, C. *et al.* Differentiation enhances Zika virus infection of neuronal brain cells. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
  546. Simonin, Y. *et al.* Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine* **12**, 161–169 (2016).
  547. Anfasa, F. *et al.* Phenotypic Differences between Asian and African Lineage Zika Viruses in Human Neural Progenitor Cells. *mSphere* **2**, (2017).
  548. Jurado, K. A. *et al.* Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in

- mice. *Nat. Microbiol.* **3**, 141–147 (2018).
549. Lucas, C. G. O. *et al.* Critical role of CD4+ T cells and IFN $\gamma$  signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
  550. Kim, J. *et al.* Zika virus infects pericytes in the choroid plexus and enters the central nervous system through the blood-cerebrospinal fluid barrier. (2020).  
doi:10.1371/journal.ppat.1008204
  551. Shao, Q. *et al.* Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. *Dev.* **143**, 4127–4136 (2016).
  552. Panganiban, A. T. *et al.* A Zika Virus Primary Isolate Induces Neuroinflammation, Compromises the Blood-2 Brain Barrier, and Upregulates CXCL12 in Adult Macaques  
Short title: Zika Virus Induced Neuropathology. *bioRxiv* 850198 (2019).  
doi:10.1101/850198
  553. Salinas, S. *et al.* Deleterious effect of Usutu virus on human neural cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005913 (2017).
  554. Riccetti, S. *et al.* Modelling West Nile Virus and Usutu Virus Pathogenicity in Human Neural Stem Cells. 1–19 (2020).
  555. Segura Guerrero, N. A., Sharma, S., Neyts, J. & Kaptein, S. J. F. Favipiravir inhibits in vitro Usutu virus replication and delays disease progression in an infection model in mice. *Antiviral Res.* **160**, 137–142 (2018).
  556. Cecchelli, R. *et al.* A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* **9**, (2014).
  557. Cereso, N. *et al.* Proof of concept for AAV2/5-mediated gene therapy in iPSC-derived retinal pigment epithelium of a choroideremia patient. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **1**, 14011 (2014).
  558. Bhatt, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504–507 (2013).
  559. Sansom, J., Phipps, P., Johnson, N., McElhinney, L. M. & Roberts, H. West Nile virus season in Europe. *Veterinary Record* **183**, 224 (2018).
  560. Renault, P. *et al.* A Major Epidemic of Chikungunya Virus Infection on Réunion Island. (2005).
  561. Carreaux, G. *et al.* Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1595–1596 (2016).
  562. Deligne, C. *et al.* Development of a human in vitro blood-brain tumor barrier model of diffuse intrinsic pontine glioma to better understand the chemoresistance. *Fluids Barriers CNS* **17**, 37 (2020).
  563. Zhao, W., Han, L., Bae, Y. & Manickam, D. S. Lucifer yellow-a robust paracellular permeability marker in a cell model of the human blood-brain barrier. *J. Vis. Exp.* **2019**, e58900 (2019).
  564. Helms, H. C. *et al.* In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 862–90 (2016).
  565. Strack, P. R. *et al.* Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9571–9576 (1996).
  566. Sharief, M. K., Noori, M. A., Ciardi, M., Cirelli, A. & Thompson, E. J. Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF- $\alpha$  and blood-brain barrier damage. *J. Neuroimmunol.* **43**, 15–21 (1993).
  567. Adamson, P., Etienne, S., Couraud, P. O., Calder, V. & Greenwood, J. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J. Immunol.* **162**, 2964–73 (1999).
  568. Yang, L. *et al.* ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow. *Blood* **106**, 584–592 (2005).
  569. DiStasi, M. R. & Ley, K. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends in Immunology* **30**, 547–556 (2009).
  570. Guabiraba, R. *et al.* Role of the Chemokine Receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the

- Pathogenesis of Experimental Dengue Infection in Mice. *PLoS One* **5**, 15680 (2010).
571. Zhang, Y., Gao, W., Li, J., Wu, W. & Jiu, Y. The Role of Host Cytoskeleton in Flavivirus Infection. *Virologica Sinica* **34**, 30–41 (2019).
572. AL-OBAIDI, M. M. J. *et al.* Disruption of the blood brain barrier is vital property of neurotropic viral infection of the central nervous system. *Acta Virol.* **62**, 16–27 (2018).
573. Yu, X., Shang, H. & Jiang, Y. ICAM-1 in HIV infection and underlying mechanisms. *Cytokine* **125**, 154830 (2020).
574. Rieckmann, P. *et al.* Soluble intercellular adhesion molecule-1 in cerebrospinal fluid: An indicator for the inflammatory impairment of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J. Neuroimmunol.* **47**, 133–140 (1993).
575. Hartung, H. P. *et al.* Circulating adhesion molecules and inflammatory mediators in demyelination: A review. *Neurology* **45**, S22–S32 (1995).
576. Cinatl, J. *et al.* West Nile virus infection induces interferon signalling in human retinal pigment epithelial cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 645–651 (2006).
577. Merle, H. *et al.* Ocular manifestations of emerging arboviruses: Dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. *J. Fr. Ophthalmol.* **41**, e235–e243 (2018).
578. Simonin, Y. *et al.* Zika virus induces strong inflammatory responses and impairs homeostasis and function of the human retinal pigment epithelium. *EBioMedicine* **39**, 315–331 (2019).
579. Yoser, S. L., Forster, D. J. & Rao, N. A. Systemic viral infections and their retinal and choroidal manifestations. *Survey of Ophthalmology* **37**, 313–352 (1993).
580. Clark, D. C., Brault, A. C. & Hunsperger, E. The contribution of rodent models to the pathological assessment of flaviviral infections of the central nervous system. *Archives of Virology* **157**, 1423–1440 (2012).
581. Vielle, N. J. *et al.* The human upper respiratory tract epithelium is susceptible to flaviviruses. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
582. Garcia, M. *et al.* Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 387 (2018).
583. Kim, J. A., Seong, R. K., Son, S. W. & Shin, O. S. Insights into ZIKV-Mediated Innate Immune Responses in Human Dermal Fibroblasts and Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 391–399 (2019).
584. Bernard, E. *et al.* Human keratinocytes restrict chikungunya virus replication at a post-fusion step. *Virology* **476**, 1–10 (2015).
585. Huang, Y. *et al.* Zika virus propagation and release in human fetal astrocytes can be suppressed by neutral sphingomyelinase-2 inhibitor GW4869. *Cell Discov.* **4**, (2018).
586. Cheung, Y. P. *et al.* A Critical Role for Perivascular Cells in Amplifying Viral Haemorrhage Induced by 3 Dengue Virus Non-Structural Protein 1 4 5. *Classif. Biol. Sci.* doi:10.1101/2020.02.13.948208
587. Singhal, G., Jaehne, E. J., Corrigan, F., Toben, C. & Baune, B. T. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: A focused review. *Front. Neurosci.* **8**, 1–22 (2014).
588. Kanneganti, T. D. *et al.* Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* **281**, 36560–36568 (2006).
589. Kaushik, D. K., Gupta, M., Kumawat, K. L. & Basu, A. Nlrp3 inflammasome: Key mediator of neuroinflammation in murine japanese encephalitis. *PLoS One* **7**, (2012).
590. Mamik, M. K. *et al.* HIV-1 Viral Protein R Activates NLRP3 Inflammasome in Microglia: implications for HIV-1 Associated Neuroinflammation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **12**, 233–248 (2017).
591. Streit, W. J., Mrak, R. E. & Griffin, W. S. T. Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. *J. Neuroinflammation* **1**, 14 (2004).
592. Rempel, J. D., Murray, S. J., Meisner, J. & Buchmeier, M. J. Differential regulation of innate and adaptive immune responses in viral encephalitis. *Virology* **318**, 381–392

- (2004).
593. Chen, A. M., Khanna, N., Stohlman, S. A. & Bergmann, C. C. Virus-Specific and Bystander CD8 T Cells Recruited during Virus-Induced Encephalomyelitis. *J. Virol.* **79**, 4700–4708 (2005).
  594. Michlmayr, D. & Lim, J. K. Chemokine receptors as important regulators of pathogenesis during arboviral encephalitis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, (2014).
  595. Lokensgard, J. R. *et al.* Robust expression of TNF-, IL-1, RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus. *Journal of NeuroVirology* **7**, (2001).
  596. Cheeran, M. C.-J. *et al.* Cytomegalovirus induces cytokine and chemokine production differentially in microglia and astrocytes: Antiviral implications. *Journal of NeuroVirology* **7**, (2001).
  597. Chen, C. J. *et al.* Glial activation involvement in neuronal death by Japanese encephalitis virus infection. *J. Gen. Virol.* **91**, 1028–1037 (2010).
  598. Liu, W. J., Chen, H. B., Wang, X. J., Huang, H. & Khromykh, A. A. Analysis of Adaptive Mutations in Kunjin Virus Replicon RNA Reveals a Novel Role for the Flavivirus Nonstructural Protein NS2A in Inhibition of Beta Interferon Promoter-Driven Transcription. *J. Virol.* **78**, 12225–12235 (2004).
  599. Glass, W. G. *et al.* Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* **202**, 1087–1098 (2005).
  600. Luo, Y. *et al.* RANTES stimulates inflammatory cascades and receptor modulation in murine astrocytes. *Glia* **39**, 19–30 (2002).
  601. Ip, P.-P. & Liao, F. Resistance to Dengue Virus Infection in Mice Is Potentiated by CXCL10 and Is Independent of CXCL10-Mediated Leukocyte Recruitment. *J. Immunol.* **184**, 5705–5714 (2010).
  602. Naveca, F. G. *et al.* Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, e170542 (2018).
  603. Melchjorsen, J., Sørensen, L. N. & Paludan, S. R. Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 331–343 (2003).
  604. Campanella, G. S. V., Colvin, R. A. & Luster, A. D. CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3. *PLoS One* **5**, 1–10 (2010).
  605. Liu, M. *et al.* CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **22**, 121–130 (2011).
  606. Fredericksen, B. L. & Gale, M. West Nile Virus Evades Activation of Interferon Regulatory Factor 3 through RIG-I-Dependent and -Independent Pathways without Antagonizing Host Defense Signaling. *J. Virol.* **80**, 2913–2923 (2006).
  607. Cacciotti, G. *et al.* Variation in interferon sensitivity and induction between Usutu and West Nile (lineages 1 and 2) viruses. *Virology* **485**, 189–198 (2015).
  608. Scagnolari, C. *et al.* Usutu virus growth in human cell lines: Induction of and sensitivity to type I and III interferons. *J. Gen. Virol.* (2013). doi:10.1099/vir.0.046433-0
  609. Shresta, S. *et al.* Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J. Virol.* **78**, 2701–10 (2004).
  610. Samuel, M. A. & Diamond, M. S. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J. Virol.* **79**, 13350–61 (2005).
  611. Best, S. M. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. *doi.org* e01970-16 (2017). doi:10.1128/jvi.01970-16
  612. Domingo, E. & Cabrera, N. Mechanisms of viral emergence. doi:10.1051/vetres/2010010
  613. Sauter, D. *et al.* Tetherin-Driven Adaptation of Vpu and Nef Function and the Evolution of Pandemic and Nonpandemic HIV-1 Strains. *Cell Host Microbe* **6**, 409–421 (2009).
  614. Charpentier, C. *et al.* Role of Minority Populations of Human Immunodeficiency Virus



- Type 1 in the Evolution of Viral Resistance to Protease Inhibitors. *J. Virol.* **78**, 4234–4247 (2004).
615. Li, G. *et al.* The roles of prM-E proteins in historical and epidemic zika virus-mediated infection and neurocytotoxicity. *Viruses* **11**, (2019).
616. Shan, C. *et al.* A Zika virus envelope mutation preceding the 2015 epidemic enhances virulence and fitness for transmission. doi:10.1073/pnas.2005722117/-/DCSupplemental
617. Chambers, T. J., Halevy, M., Nestorowicz, A., Rice, C. M. & Lustig, S. West Nile virus envelope proteins: Nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. *J. Gen. Virol.* **79**, 2375–2380 (1998).
618. Solomon, T. *et al.* Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* **355**, 1053–1059 (2000).
619. Taucher, C., Berger, A. & Mandl, C. W. A trans-Complementing Recombination Trap Demonstrates a Low Propensity of Flaviviruses for Intermolecular Recombination. *J. Virol.* **84**, 599–611 (2010).
620. Beasley, D. W. C., Li, L., Suderman, M. T. & Barrett, A. D. T. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology* **296**, 17–23 (2002).
621. Fazakerley, J. Pathogenesis of Semliki Forest Virus Encephalitis. *Artic. J. NeuroVirology* (2003). doi:10.1080/135502802901068000
622. Osorio, J. E. *et al.* Characterization of West Nile viruses isolated from captive American flamingoes (*Phoenicopterus ruber*) in Medellin, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **87**, 565–572 (2012).
623. Benzarti, E. *et al.* Usutu virus infection of embryonated chicken eggs and a chicken embryo-derived primary cell line. *Viruses* **12**, (2020).

## ANNEXES

Données supplémentaires de l'article I: **Zika virus infection promotes local inflammation, cell adhesion molecule upregulation, and leukocyte recruitment at the blood brain barrier** (*Mbio* – 2020).

Données supplémentaires de l'article II: **Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models** (*Plos neglected tropical diseases* – 2020).

Données supplémentaires de l'article III: **Differential neurovirulence of Usutu isolates in mice and neuronal cells** (*under review, Journal of neuroinflammation* – 2020).

Marion Clé, Cécile Beck, Sara Salinas, Sylvie Lecollinet, Serafin Gutierrez, Philippe Van de Perre, Thierry Baldet, Vincent Foulongne, Yannick Simonin. 2019. **Usutu virus: A new threat?** *Epidemiology and Infection*, 147, e232, 1–11.

Marion Clé, Patrick Eldin, Laurence Briant, Annie Lannuzel, Yannick Simonin, Philippe Van de Perre, André Cabié and Sara Salinas. 2020. **Neurocognitive impacts of Arbovirus infections.** *Journal of neuroinflammation*, 17:233.

Données supplémentaires de l'article I

**Zika virus infection promotes local inflammation, cell adhesion molecule upregulation, and leukocyte recruitment at the blood brain barrier (*Mbio – 2020*).**

1 **Supplemental Legends:**

2 **Supplementary Fig.1: human BBB is readily infected by ZIKV.** (a) Depiction of human  
3 blood brain barrier grown on transwell filters. (b) Table showing the main characteristics of the  
4 BBB. (c) CT-, ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI 1) hBLEC of BBB model grown on cell  
5 culture inserts fixed at 7 dpi. Indirect IF confocal studies of CT- and ZIKV-infected hBLEC using  
6 an actin probe (green), and antibodies against pan flavivirus (magenta). Nuclei are labeled with  
7 Hoechst (blue). Scale bars 10  $\mu\text{m}$ . (d) 3-D rendering of mock- and ZIKV-infected BBB. Confocal  
8 stacks of images from mock- or ZIKV-infected hBLEC at 7 dpi were subjected to 3D  
9 reconstruction with the Imaris software. Actin is colored in green, ZIKV in magenta and nuclei  
10 in blue.

11 **Supplementary Fig.2: ZIKV efficiently replicates in hBLEC and pericytes without**  
12 **impairing its integrity.** (a) Viral titers in supernatants from ZIKV AF- and ZIKV AS-infected  
13 (MOI 0.1) hBLEC from the BBB model in apical and basolateral sides at 4 and 7 days  
14 determined using the TCID50 method. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3  
15 independent experiments. (b) CT-, ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI 0.1) hBLEC of BBB  
16 model grown on cell culture inserts fixed at 7 dpi. Indirect IF confocal studies of CT- and ZIKV-  
17 infected hBLEC using an actin probe (green), and antibodies against double-strand RNA  
18 (magenta) and ZIKV Env (cyan). Nuclei are labeled with Hoechst (blue). Scale bars 30  $\mu\text{m}$ . (c)  
19 RT-qPCR analyses of ZIKV genome in hBLEC and pericytes from transwell co-culture at 7 dpi  
20 (MOI 1). (d-e) Paracellular permeability of CT-, ZIKV AF- and ZIKV AS-infected (MOI 0.1) BBB  
21 model grown on cell culture inserts at 7 and 10 dpi. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM  
22 (n=3) and analyzed using a Wilcoxon-Mann-Whitney test \* $p < 0.05$  (ZIKV AF / AS compared to  
23 CT).

24 **Supplementary Fig.3: Gene modulation in ZIKV-infected hBLEC.** (a) and (b) Volcano plots  
25 of genes modulated upon ZIKV infection in hBLEC from the BBB model at 7 dpi normalized to  
26 CT expression from Fig.3a,b. Statistically significant changes in fold regulation appear in the  
27 top-right window (red; genes upregulated) and top-left window (green; genes downregulated).

28 (c) Statistical analyzes from Fig.3a-b using a Wilcoxon-Mann-Whitney test of  $2^{-\Delta Ct}$  (ratio  
29 gene/housekeeping gene ZIKV vs CT). (d) Statistical analyzes from Fig.3b-c and Fig.6a using  
30 a Wilcoxon-Mann-Whitney test of  $2^{-\Delta Ct}$  (ratio gene/housekeeping gene ZIKV vs CT).

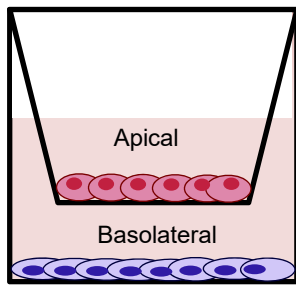
31 **Supplementary Fig.4: Increased expression of cytokines and chemokines in ZIKV-**  
32 **infected human BBB.** ELISA analyses of CXCL10, CCL5, IL6 and CCL2 concentrations in  
33 the supernatants (apical and basolateral compartments) of CT- or ZIKV AF and ZIKV AS-  
34 infected (MOI 0.1) BBB model grown on cell culture inserts at 4 and 7 dpi. Results are  
35 expressed as means  $\pm$  SEM (n = 3) and analyzed using an unpaired *t*-test, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01,  
36 \*\*\**p* < 0.001 \*\*\*\* *p* < 0.0001 ZIKV-AF or AS compared to CT.

37 **Supplementary Fig.5: Gene modulation in ZIKV-infected pericytes and astrocytes.** (a)  
38 Statistical analyzes from Fig.5a using a Wilcoxon-Mann-Whitney test of  $2^{-\Delta Ct}$  (ratio  
39 gene/housekeeping gene ZIKV vs CT). (b) Statistical analyzes from Fig.5b using a Wilcoxon-  
40 Mann-Whitney test of  $2^{-\Delta Ct}$  (ratio gene/housekeeping gene ZIKV-AF and ZIKV-AS vs CT). (c)  
41 Statistical analyzes from Fig.6b using a Wilcoxon-Mann-Whitney test of  $2^{-\Delta Ct}$  (ratio  
42 gene/housekeeping gene ZIKV-AF, ZIKV-AS vs CT). (d) Statistical analyzes from Fig.6d using  
43 a Wilcoxon-Mann-Whitney test of  $2^{-\Delta Ct}$  (ratio gene/housekeeping gene ZIKV-AF, ZIKV-AS vs  
44 CT). (e) Description of human blood brain barrier grown on transwell filters (endothelial cells  
45 in red, pericytes in purple and astrocytes in blue).

46 **Supplementary Fig.6: Leukocyte binding to mock- and ZIKV-infected in hBLEC.** (a)  
47 Monocytes or (b) lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (LyT) labeled with CFSE (in green) binding to CT-, ZIKV  
48 AF- and ZIKV AS-infected (MOI 0.1) BBB model grown on cell culture inserts 7 dpi. Nuclei are  
49 false-colored in magenta after Hoechst staining. Scale bars 50  $\mu$ m. (c-d) ZIKV AF and AS-  
50 infected BBB grown on cell culture insert were fixed at 7 dpi. Indirect IF studies were used to  
51 label monocytes (c) and LyT (d) (green), ZIKV (pan-flavi, magenta), ICAM-1 (cyan), as well as  
52 nuclei (Hoechst, blue). Scale bars 10  $\mu$ m (c) and 20  $\mu$ m (d).

53 **Supplementary Fig.7: ZIKV-infected mouse brain displays local BBB impairment. (a)**  
54 Evans Blue fluorescence (red) and nuclei (blue) in brain slices in CT- and ZIKV-infected  
55 animals. **(b-c)** 3  $\mu\text{m}$  paraffin sections brain from mock- and ZIKV- infected mice were  
56 processed with luxol blue and stained either with an anti-CD45 (total immune cells) **(b)** or anti-  
57 CD3 (T lymphocytes) (brown labelling). **(d)** 3  $\mu\text{m}$  paraffin sections brain from mock- and ZIKV-  
58 infected mice were processed with luxol blue and stained with anti-pan-flavivirus (brown  
59 labelling). Scale bars 50  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$  in zoomed inserts.

60 **Supplementary Fig.8: ZIKV induces modulation of inflammatory molecules, cells**  
61 **adhesion molecules and junction protein expression in ZIKV-infected mice. (a)** Gene  
62 expression of inflammatory and CAMs in *Ifnar<sup>-/-</sup>* mice infected by ZIKV AF and ZIKV AS.  
63 Statistical analyzes from Fig.9g-h using a Wilcoxon-Mann-Whitney test of  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (ratio  
64 gene/housekeeping gene ZIKV vs CT). **(b)** Indirect IF studies were used to label blood vessels  
65 (IB4, green), ZO-1 (magenta), as well as nuclei (cyan). Scale bars 10  $\mu\text{m}$  **(c)** Indirect IF studies  
66 were used to label blood vessels (IB4, green), Claudin-5 (magenta), as well as nuclei (cyan).  
67 Scale bars 10  $\mu\text{m}$ .

**a**

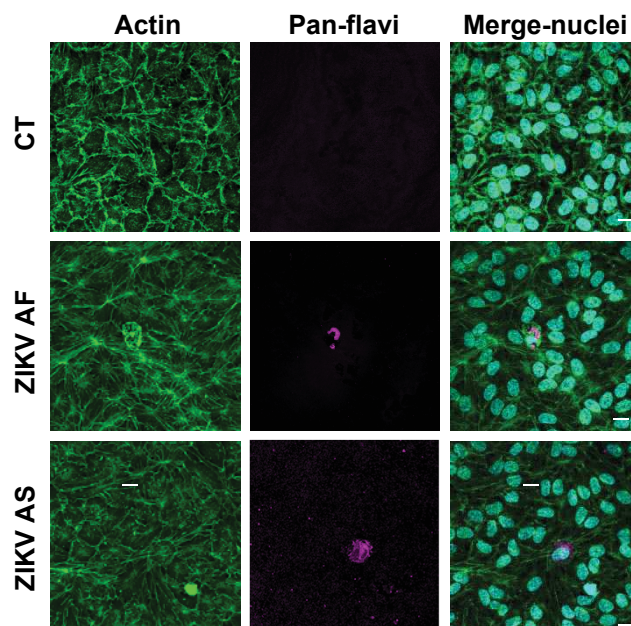
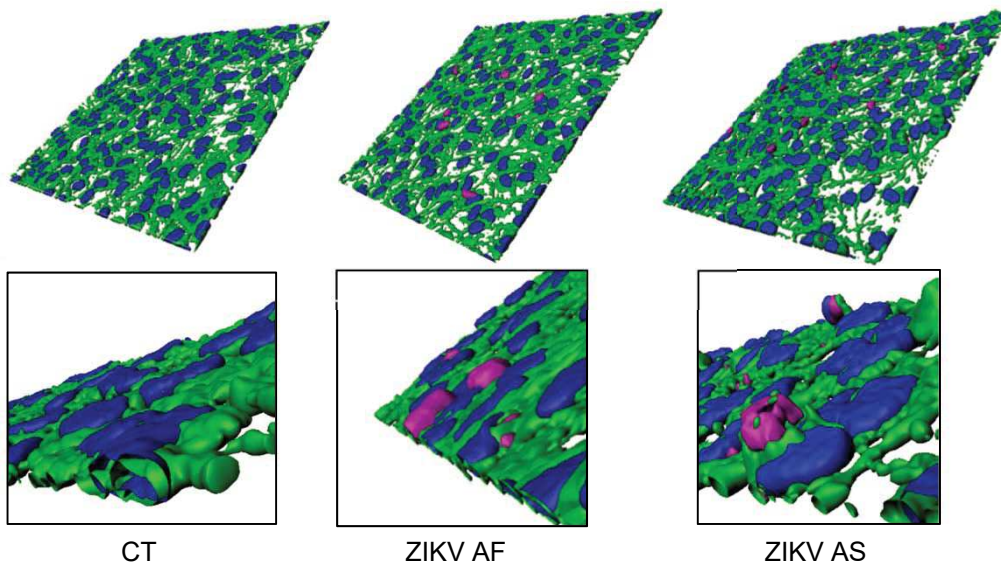
● hBLEC

● Brain pericytes

**b**

hBLEC (ref 25)

Class of proteins	Name of proteins
TJ and AJ	ZO-1; Claudin-5; Occludin; Claudin-1; JAM-A
Influx transporters	SLC7A5; SLC16A1; TFRC
Efflux transporters	P-gp; MRP2; BCRP; MRP4; MRP1; MRP5
Receptors	hTrf; RAGE; LRP1

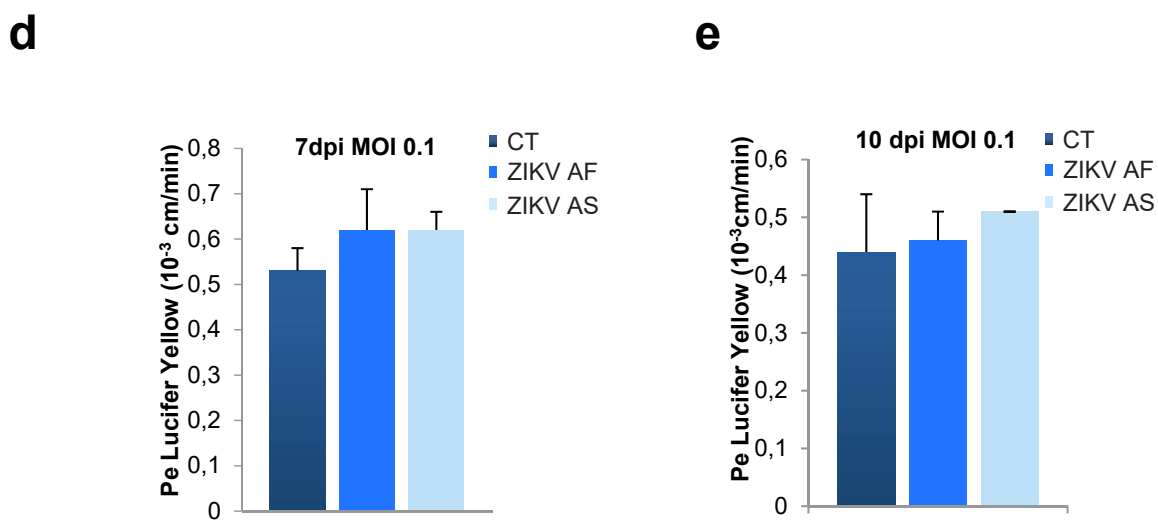
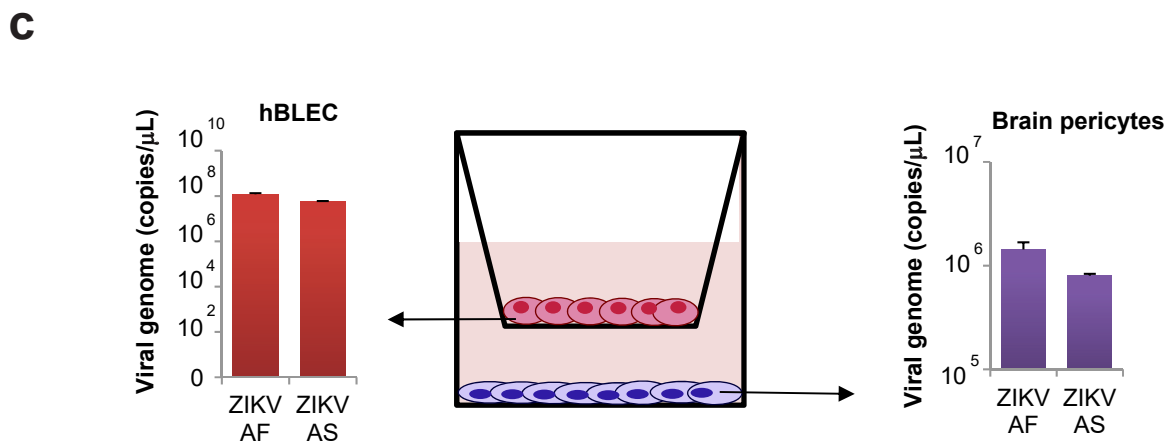
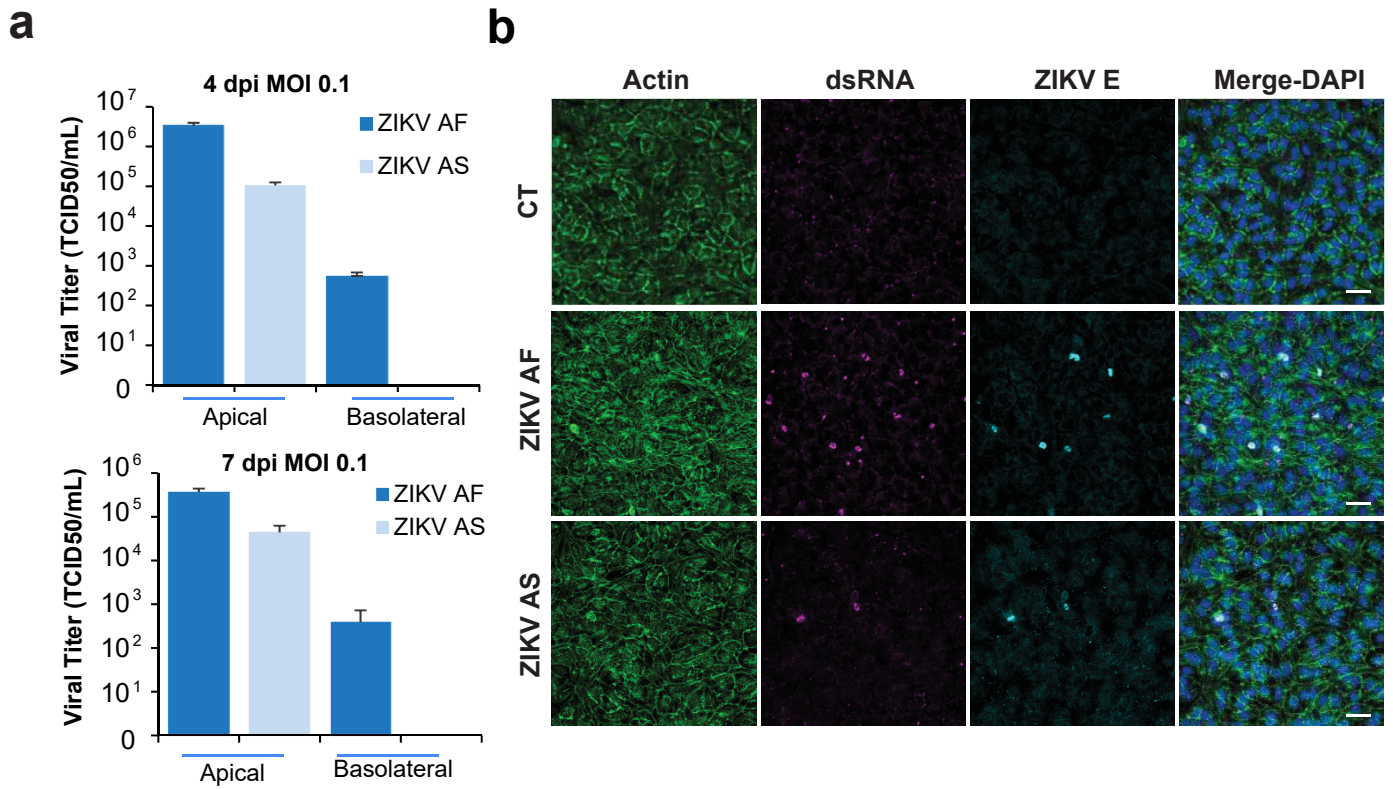
**c****d**

CT

ZIKV AF

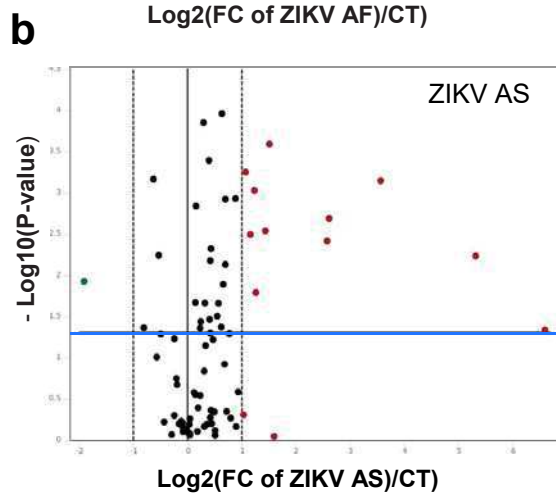
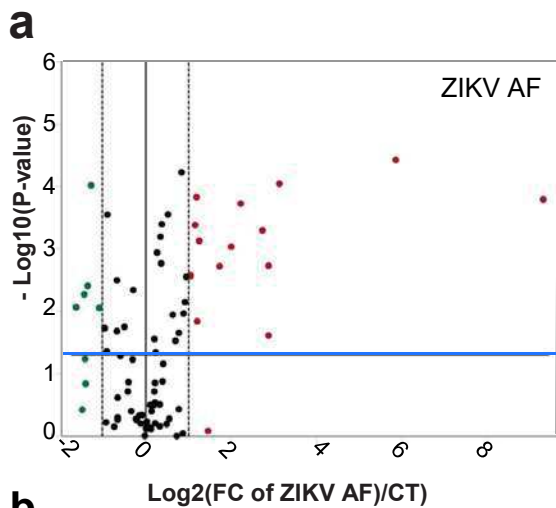
ZIKV AS

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2





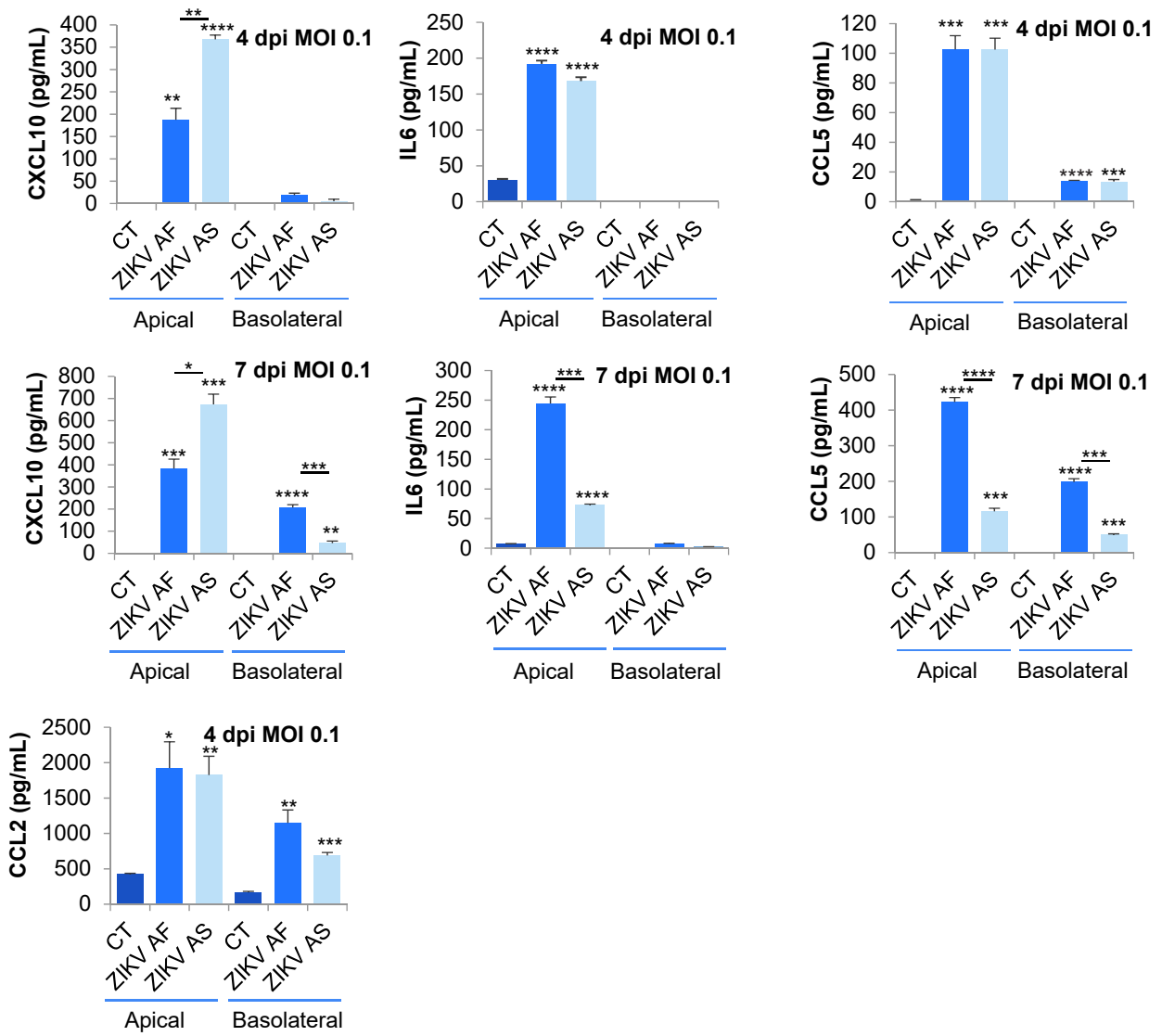
**c**

Gene name	p-value AF/CT	p-value AS/CT	p-value AF/AS
CCL2	0,000091	0,00071	NS
CCL5	0,000164	0,045875	0,000907
FAS	0,000035	0,000172	0,006404
ICAM1	0,00075	0,000559	NS
SELE	0,000511	0,003832	NS
SERPINE1	0,00019	0,002884	0,005164
SPHK1	0,00191	0,000932	NS
TNFSF10	0,00042	0,003194	NS
TYMP	0,000038	0,005825	NS
VCAM1	0,001875	0,002035	NS
CASP1	0,00015	—	—
CFLAR	0,002672	—	—
FGF2	0,002838	NS	—
IL6	0,024558	NS	—
PLAU	0,00093	—	—
PTGIS	0,014535	NS	—
PTGS2	0,002749	—	—
MMP1	—	0,000256	—
PGF	—	0,016235	—
ACE	0,003941	—	—
AGTR1	—	0,011848	—
EDN1	0,008846	—	—
OCLN	0,000097	—	—
TFPI	0,008657	—	—
VWF	0,005388	—	—

**d**

Gene name	p-value AF/CT	p-value AS/CT	p-value AF/AS
CCL5	0,0022	0,0022	0,0022
CXCL10	0,0043	0,0043	0,0022
CCL2	0,0022	0,0022	NS
IL6	FC<2	FC<2	
IL8	0,0022	0,0411	NS
IL1 beta	0,0357	0,0043	NS
IFN beta	0,0022	0,0022	0,0411
IFN alpha	FC<2	FC<2	
TNF alpha	FC<2	FC<2	
IFN gamma	NS	NS	
VCAM	0,0022	0,0022	0,0087
ICAM-1	0,0022	0,0022	NS
ICAM-2	FC<2	FC<2	
SELE	0,0043	0,0303	
ALCAM	FC<2	FC<2	
PECAM	0,0022	FC<-2	
Occludin	0,0022	FC<2	0,0022
Claudin-5	0,0152	NS	
ZO1	0,0152	NS	
Pgp	0,0043	0,0043	0,0022

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4

**a**

Gene name	p-value AF/CT
<i>C3</i>	0,04228
<i>CCL5</i>	0,001333
<i>CCR1</i>	0,015386
<i>CXCL10</i>	0,005584
<i>CXCL3</i>	0,00054
<i>FOS</i>	0,017005
<i>IL15</i>	0,00895
<i>IL23A</i>	0,006803
<i>IL6</i>	0,006543
<i>MYD88</i>	0,002162
<i>TLR1</i>	0,046203
<i>TLR3</i>	0,00377

**b**

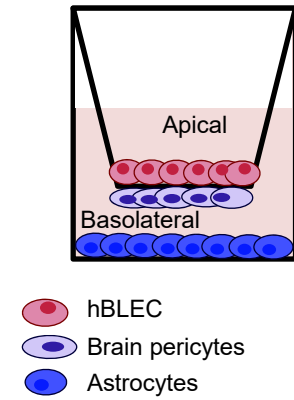
Gene name	p-value AF/CT	p-value AS/CT	p-value AF/AS
<i>CCL5</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>CXCL10</i>	<0,0001	0,0012	<0,0001
<i>IFN beta</i>	<0,0001	0,0021	<0,0001
<i>IFN alpha</i>	FC<2	FC<2	FC<2
<i>IL6</i>	FC<2 (<0,001)	FC<2 (<0,007)	FC<2

**c**

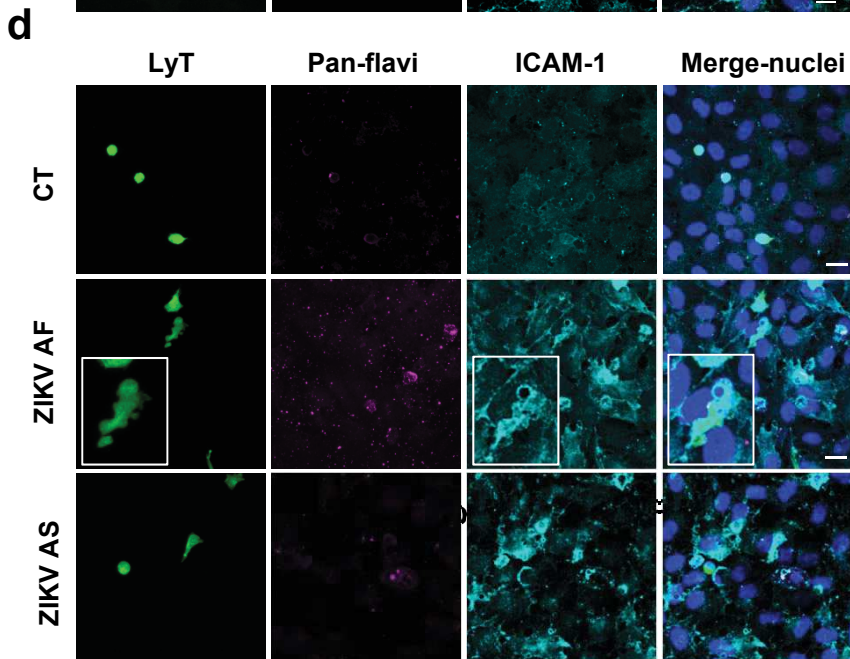
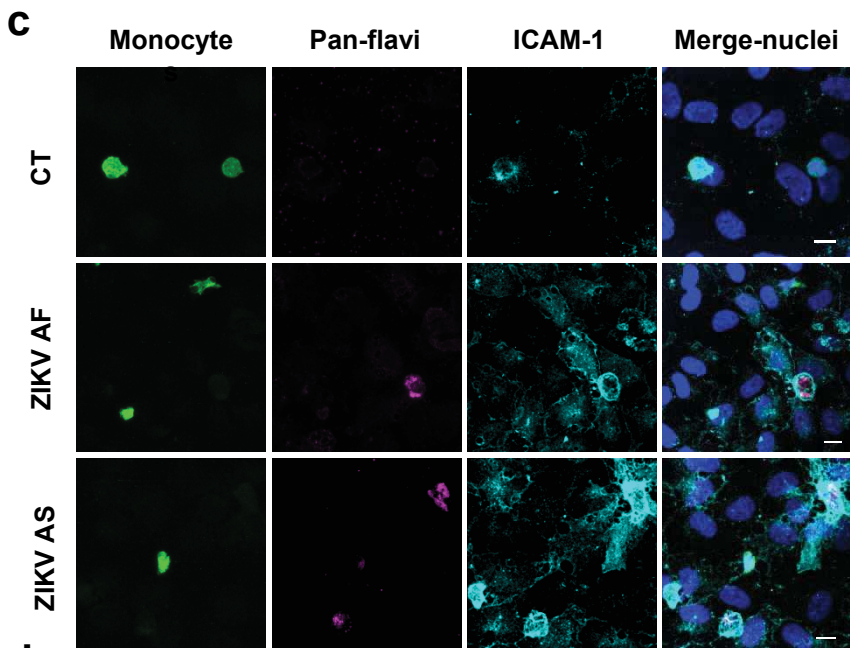
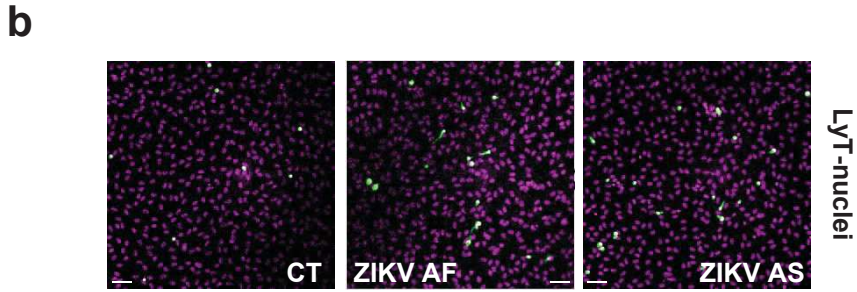
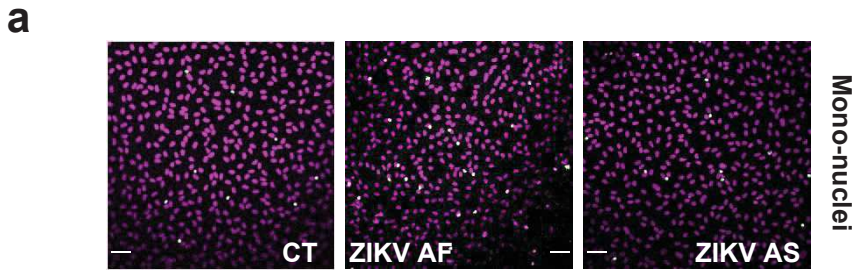
Gene name	p-value AF/CT	p-value AS/CT	p-value AF/AS
<i>CCL5</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>CXCL10</i>	<0,0001	0,0012	<0,0001
<i>IFN beta</i>	<0,0001	0,0007	<0,0001
<i>IL6</i>	FC<2	FC<2	FC<2
<i>IL8</i>	FC<2	FC<2	FC<2

**d**

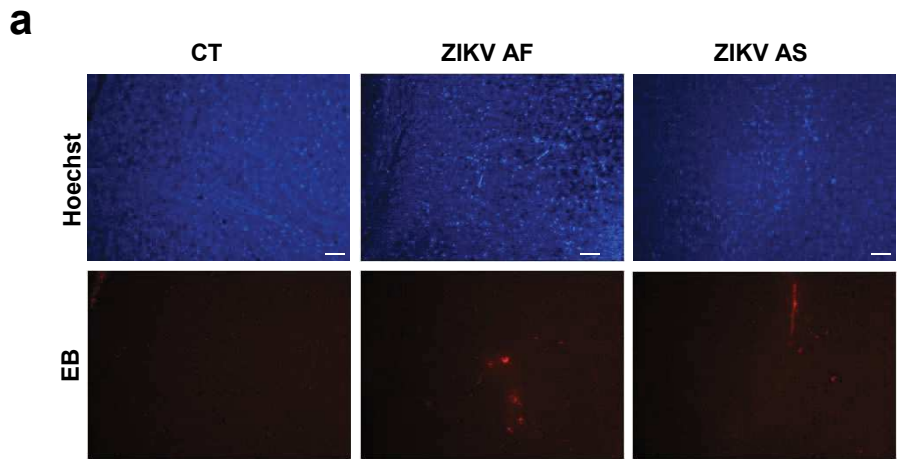
Gene name	p-value AF/CT	p-value AS/CT	p-value AF/AS
<i>CCL5</i>	0,0022	NS	0,0022
<i>CXCL10</i>	0,0022	0,0022	0,0022
<i>IFN beta</i>	0,0022	FC<2	0,0022
<i>IL6</i>	FC<2	FC<2	FC<2
<i>IL8</i>	FC<2	FC<2	FC<2

**e**

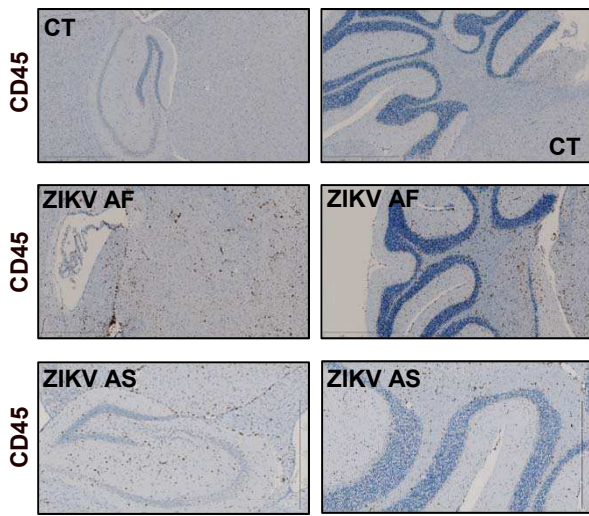
Supplementary Figure 5



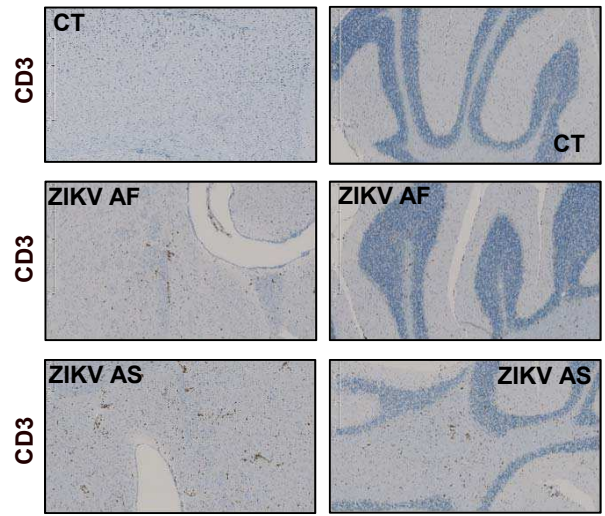
Supplementary Figure 6



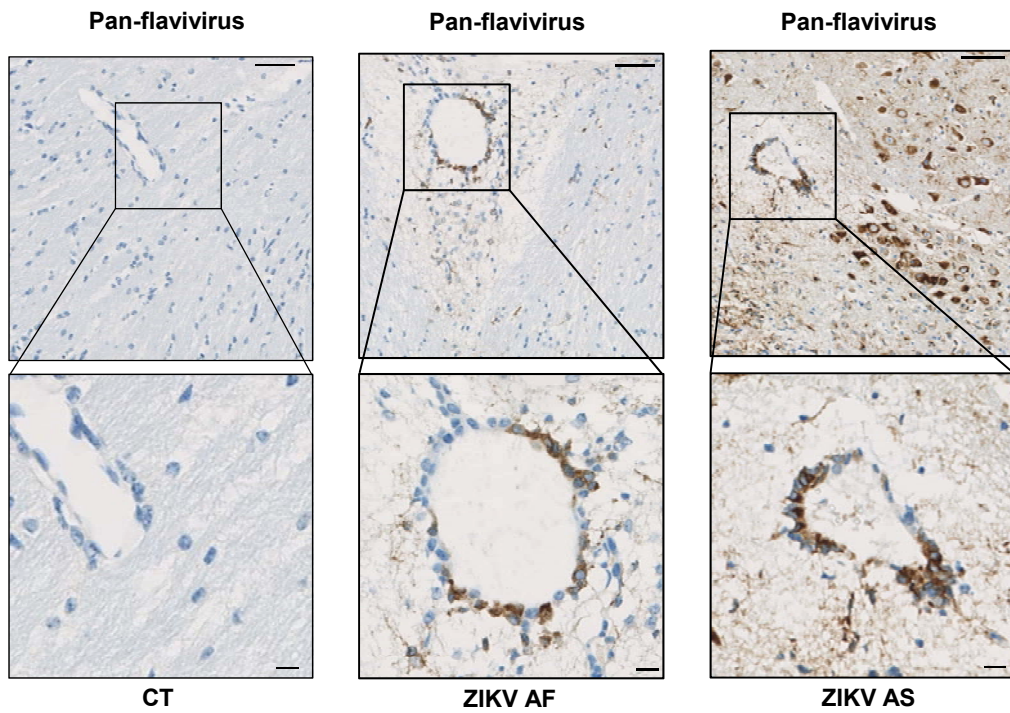
**b**



**c**



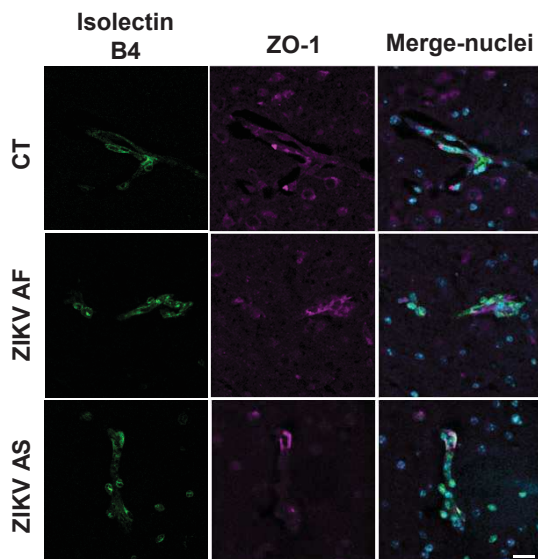
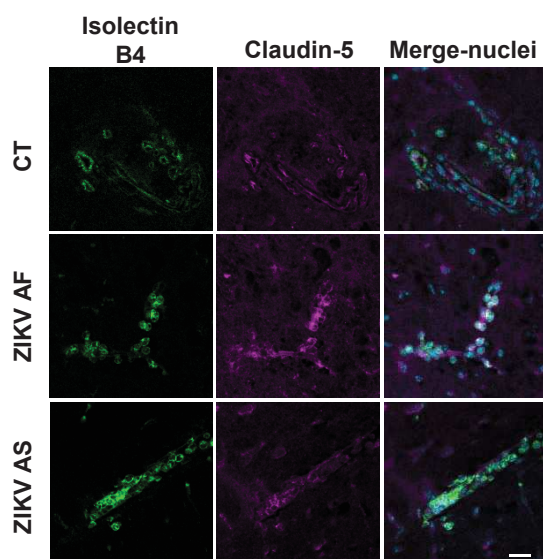
**d**



Supplementary Figure 7

**a**

Gene name	p-value AF/CT	p-value AS/CT	p-value AF/AS
<i>ICAM-1</i>	<0,0001	0,0008	0,004
<i>VCAM-1</i>	0,3401	0,7962	0,7962
<i>E-SELE</i>	0,0012	0,0078	0,4894
<i>IL6</i>	<0,0001	<0,0001	0,5414
<i>CCL5</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>CXCL10</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>INF beta</i>	<0,0001	0,0003	<0,0001
<i>TNF alpha</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>IL1 beta</i>	0,0022	0,0022	0,99
<i>Occludin</i>	0,0770	0,0770	0,6048
<i>ZO-1</i>	0,0142	0,3865	0,0019
<i>PECAM-1</i>	0,0770	0,2581	0,2581
<i>Claudin-1</i>	0,0592	0,5457	0,1388
<i>Claudin-5</i>	0,7002	0,1359	0,0927
<i>V-Cadherin</i>	<0,0001	0,7304	<0,0001
<i>JAM-A</i>	0,0111	0,0625	0,1672

**b****c**

Supplementary Figure 8

Données supplémentaires de l'article II

**Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models**

*(Plos neglected tropical diseases – 2020).*

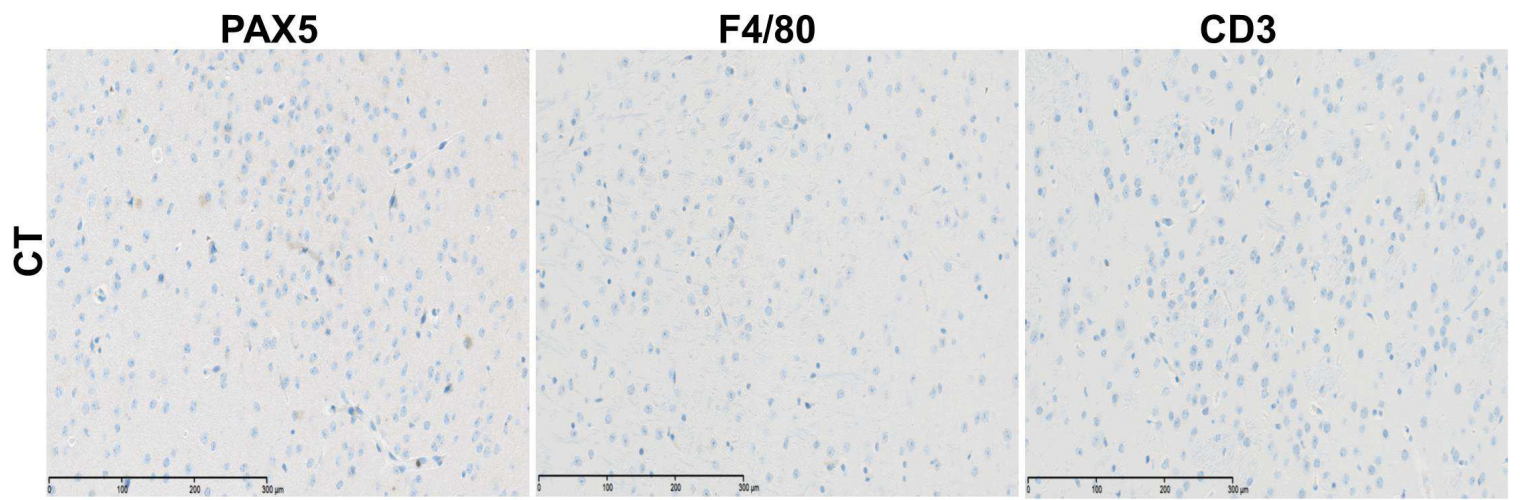
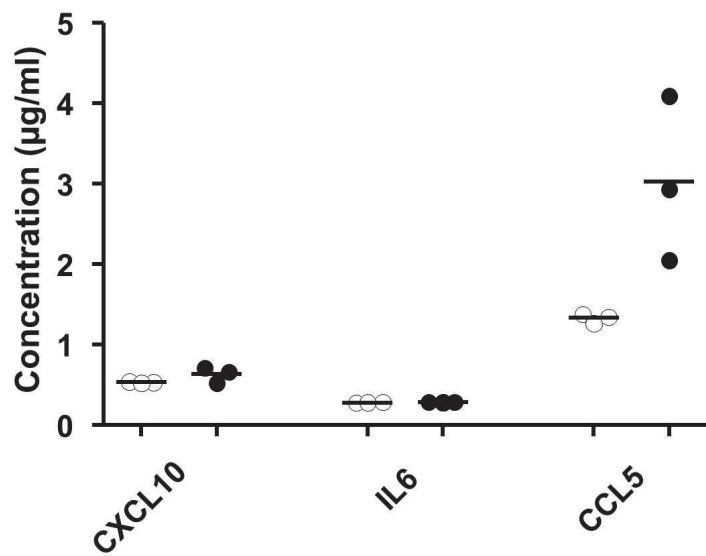


Figure S1



### Swiss



### IFNAR

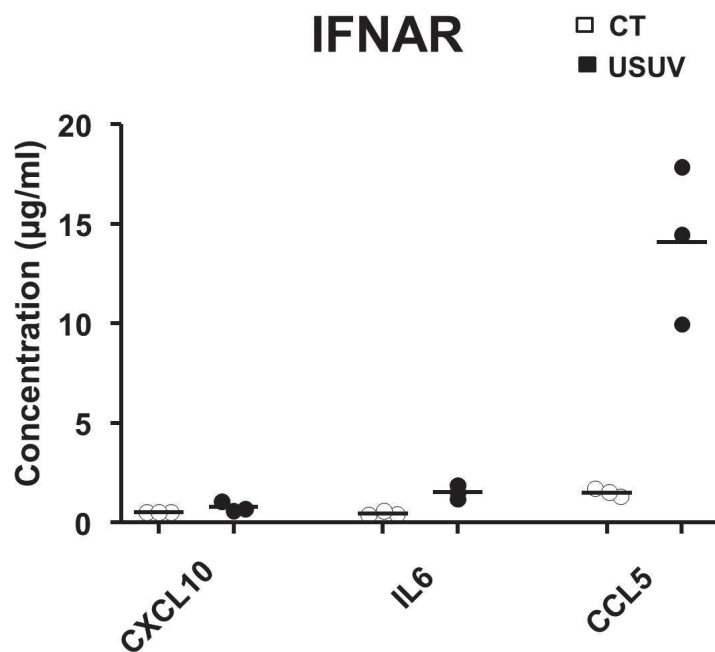


Figure S2

**A**

Gene symbol	p value
AIM2	0.006673
CASP1	0.015418
CASP8	0.030619
CCL5	0.046175
CD40	0.041449
CD86	0.022930
CTSS	0.006091
CXCL10	0.046532
CCL9	0,048762
DDX58	0.006180
DHX58	0.034412
IFH1	0.035609
IFNB1	0.041937
IL1B	0.031937
IL6	0.048860
IRF5	0.019844
IRF7	0.030488
ISG15	0.001350
MX1	0.043833
NFKBIA	0.060976
NLRP3	0.027363
OAS2	0.004729
PYCARD	0.001587
STAT1	0.000081
TLR3	0.029524
TRIM25	0.013264

**B**

Gene symbol	p value
AIM2	0.036732
CASP8	0.047127
CCL3	0.044101
CCL4	0.039241
CCL5	0.040224
CD80	0.017268
CD86	0.040711
CXCL10	0.040051
CCL9	0.032731
DDX58	0.041681
DHX58	0.048743
IFNB1	0.033084
IL6	0.042480
IRF5	0.049178
IRF7	0.034395
ISG15	0.047468
MEFV	0.049116
MX1	0.021515
MYD88	0.010282
NFKBIA	0.000628
NLRP3	0.038214
OAS2	0.028406
PSTPIP1	0.049204
PYCARD	0.034159
RIPK1	0.026344
STAT1	0.041658
TLR3	0.000911

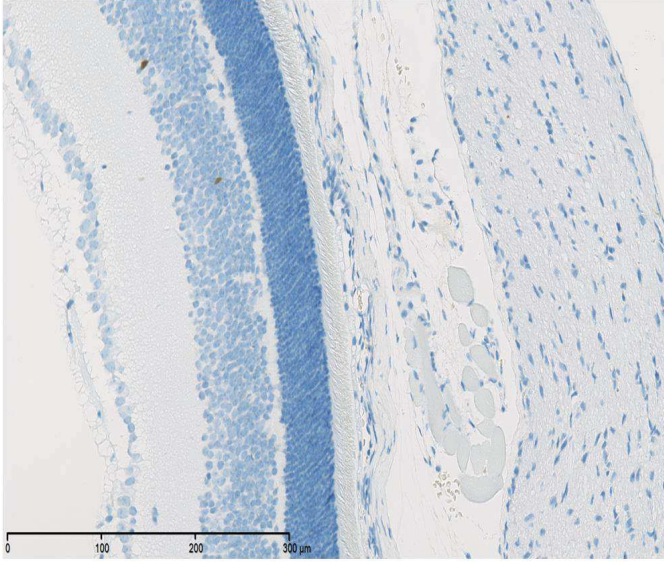
Figure S3

Gene symbol	p value
CXCL10	0.043514
CCL5	0,035468
IFI27	0.034965
IFI44	0.045682
IFI44L	0.047417
IFI6	0.039038
IFH1	0.025769
IFT2	0.028743
IFT3	0.011145
IFITM1	0.036817
IFNA14	0.030670
IFNB1	0.014401
IFNK	0.015319
IFRD1	0.019393
IL10RA	0.042487
IL12B	0.041644
IL15	0.002757
IL21R	0.039091
IFNL2	0.019192
IFBL1	0.021343
IL5RA	0.008634
IL6	0.004367
IL6R	0.003228
IRF1	0.023141
MX1	0.020628
OAS1	0.040924

Figure S4

**Caspase 3**

**CT**



**USUV**

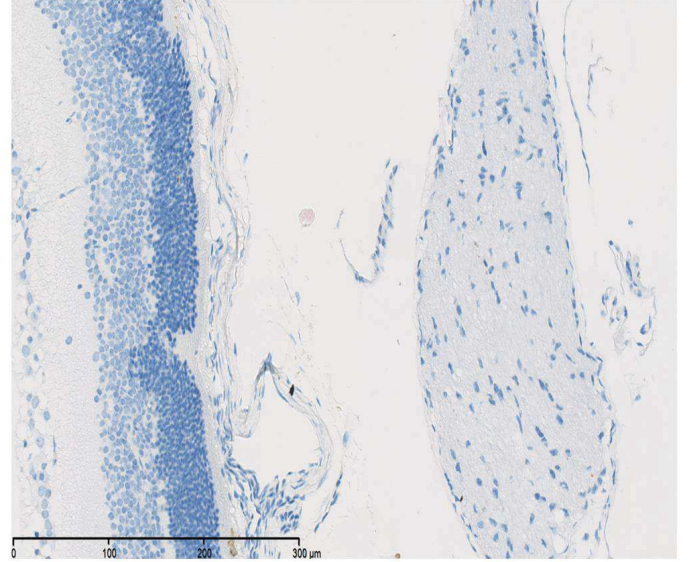


Figure S5

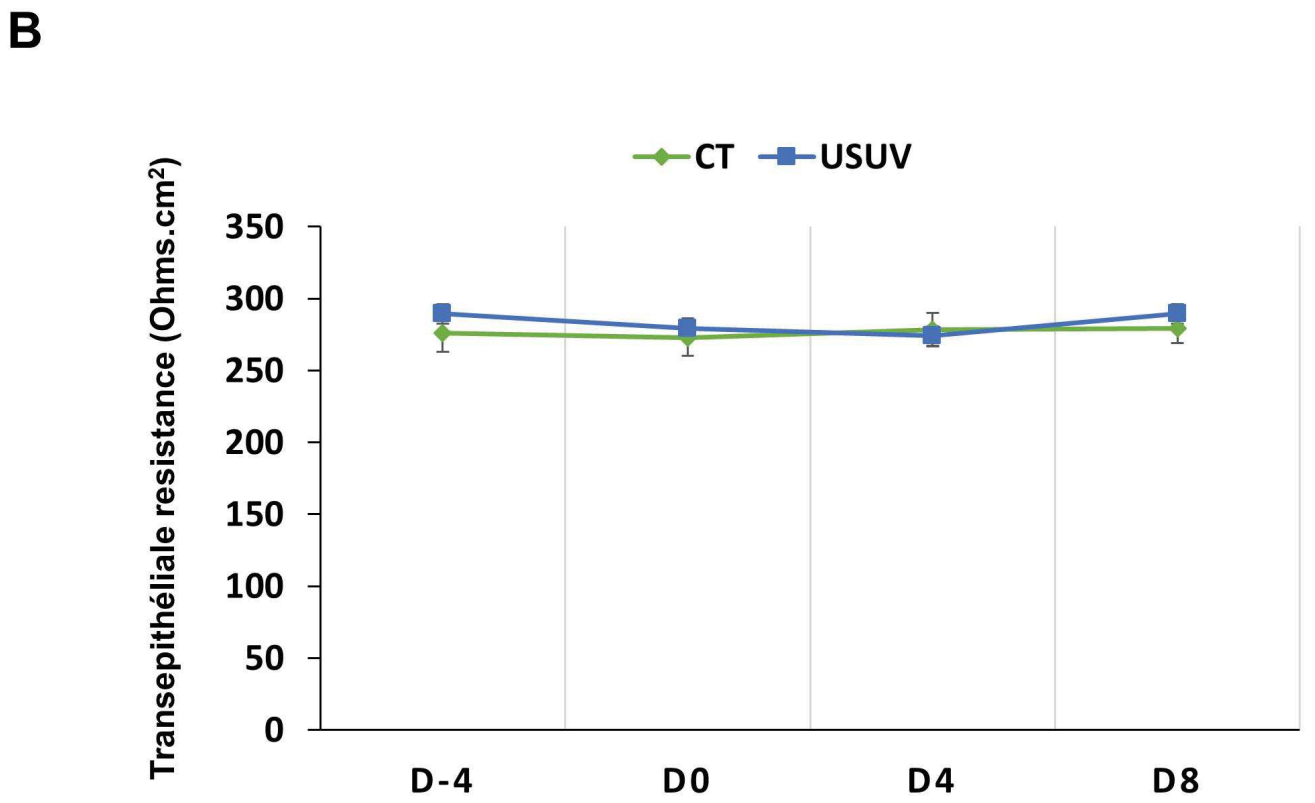
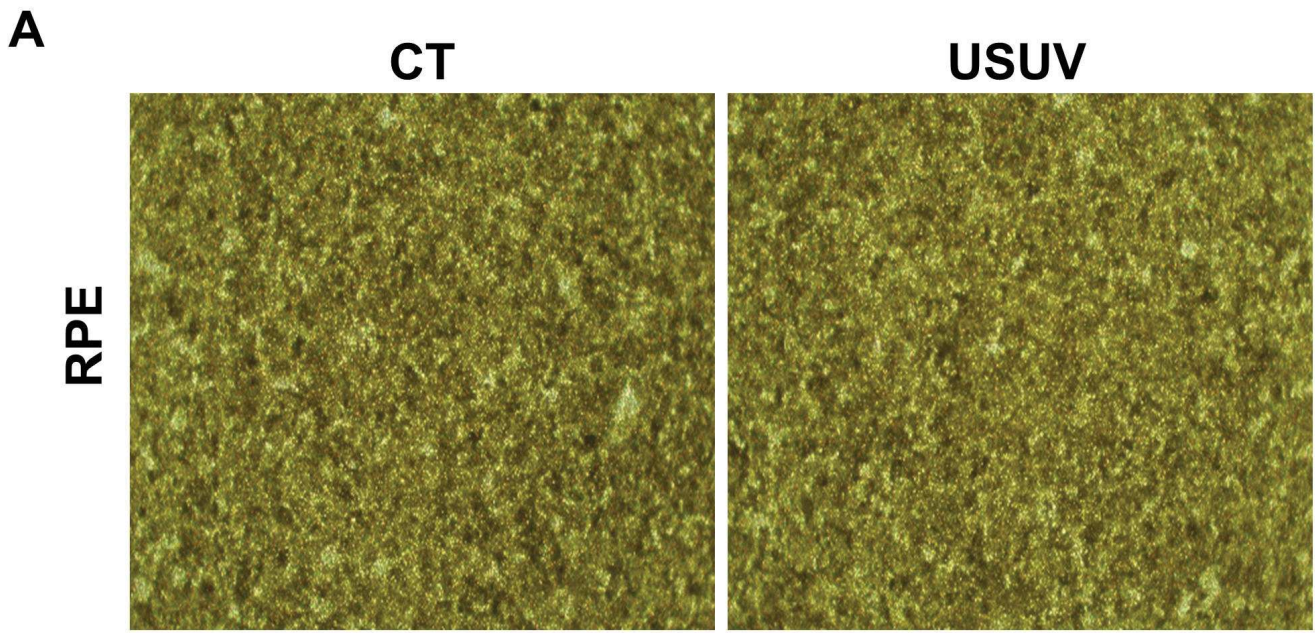


Figure S6

Données supplémentaires de l'article III

**Differential neurovirulence of Usutu isolates in mice and neuronal cells** (*under review, Journal of neuroinflammation – 2020*).

1 **Supplemental Figures Legends**

2 **Supplemental Figure 1. Phylogenetic analysis of Usutu virus strains**

3 Phylogenetic tree based on the partial NS5 gene and showing positioning of the USUV isolates used in  
4 this study (in blue). USUV sequences are labeled with their respective ID or GenBank accession number,  
5 preceded by country and year of isolation. Scale bar indicates mean number of nt substitutions per site.  
6 The analysis was processed through on line phylogeny analysis (<http://www.phylogeny.fr>; Réseau  
7 National des Génopoles) and tree was rooted with an USUV Africa 1 sequence (GenBank accession  
8 number KC754958).

9

10 **Supplemental Figure 2. Two USUV EU2 strains induce a specific CPE and persistent viral**  
11 **replication in astrocytes**

12 Human astrocyte cells were infected with two strains from EU2 lineage (20421 and 18982) at a MOI of  
13 0,1. (A) Bright light images of human astrocytes infected at 7 dpi show similar atypical CPE with the  
14 two strains. (B) Supernatants from infected astrocyte cells (MOI 0,1) were collected at 2, 7, and 11 dpi  
15 and subjected to TCID50 measurement on Vero cells. EU2 strains have similar replication and  
16 persistence over time. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiment. (C) Cellular  
17 proliferation (7 dpi) and apoptosis (4 dpi) cells measured respectively with BrdU and MTT are affected  
18 similarly with the two EU2 isolates. NS : Not significant.

19

20 **Supplemental Figure 3. Differential CPE in USUV-infected murine microglia and neurons cells**

21 (A) Bright light images of infected murine microglial cells at 5 dpi and murine neurons (B) at 4 dpi  
22 (MOI of 0,1) showed specific CPE in EU2 USUV-infected condition.

23

24 **Supplemental Figure 4. USUV isolates induces CPE in human endothelial cells with an atypical**  
25 **shape for EU2 while there is no CPE in pericytes**

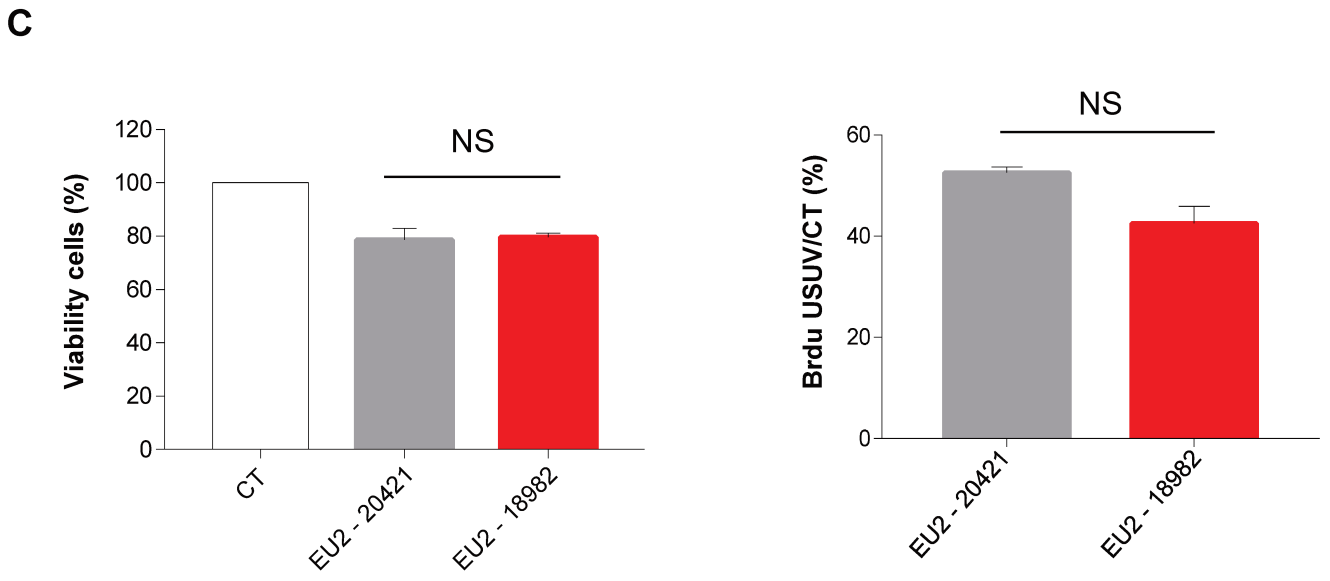
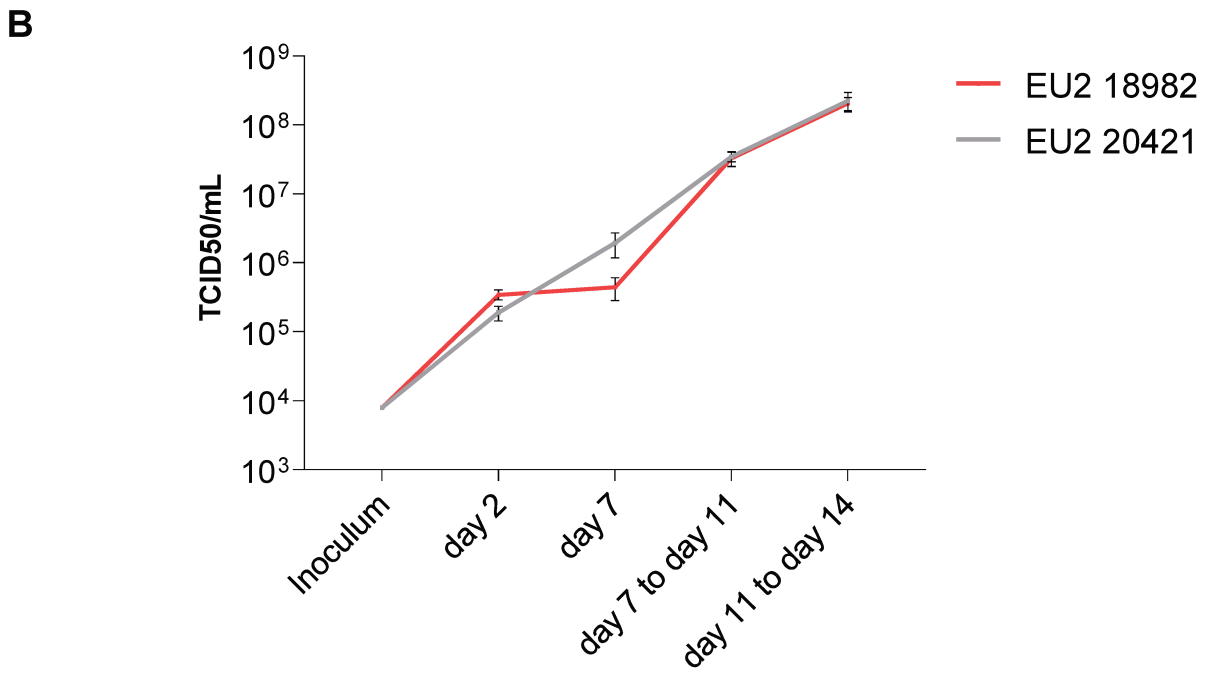
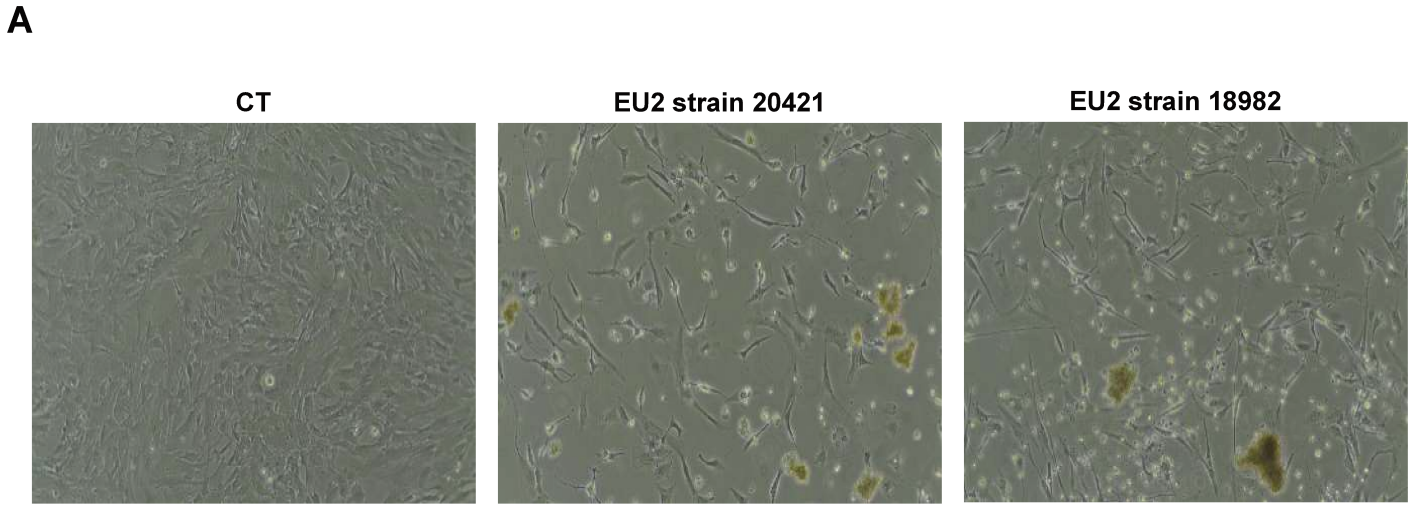
26 (A) USUV infection in pericytes (at 4pi) does not induce CPE unlike endothelial cells (B) where an  
27 atypical CPE is observed with the EU2 strain (at 6 dpi).

28

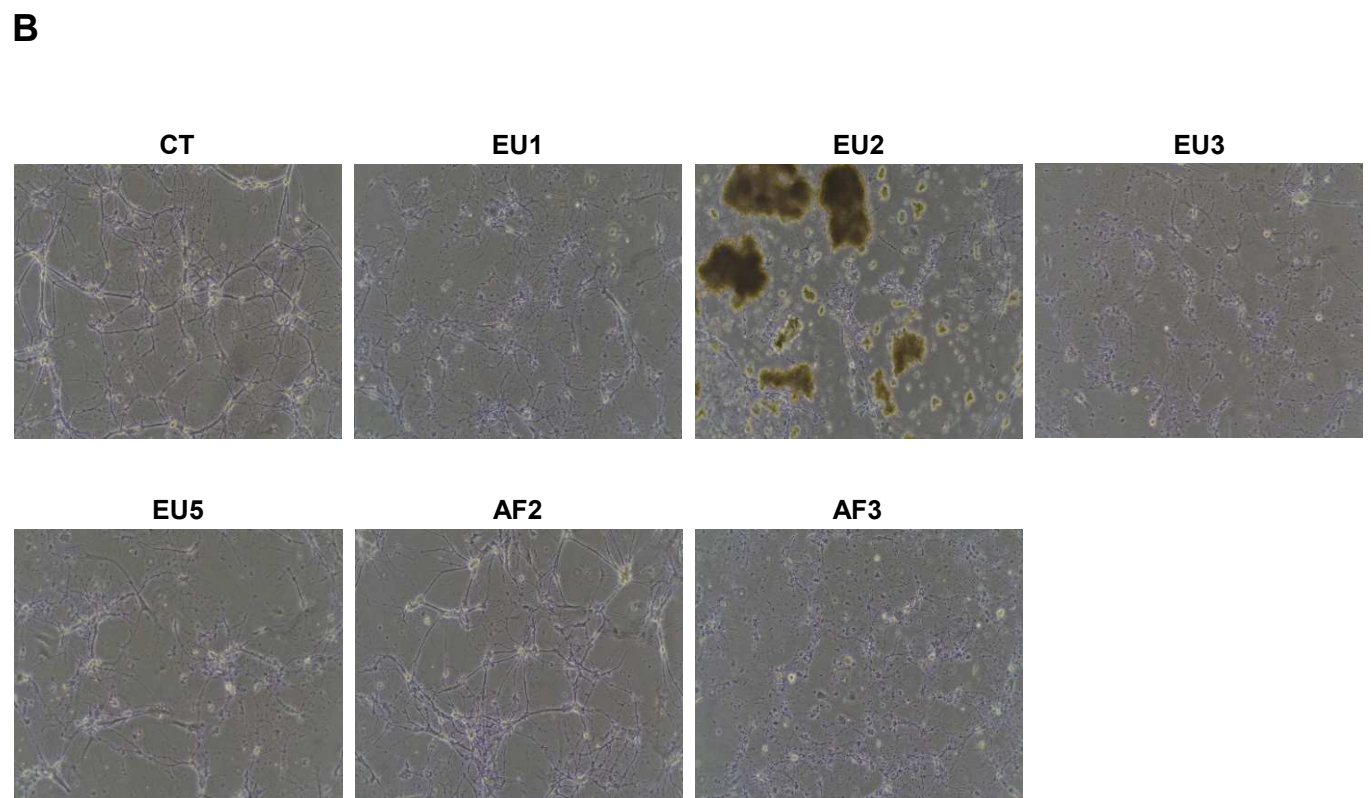
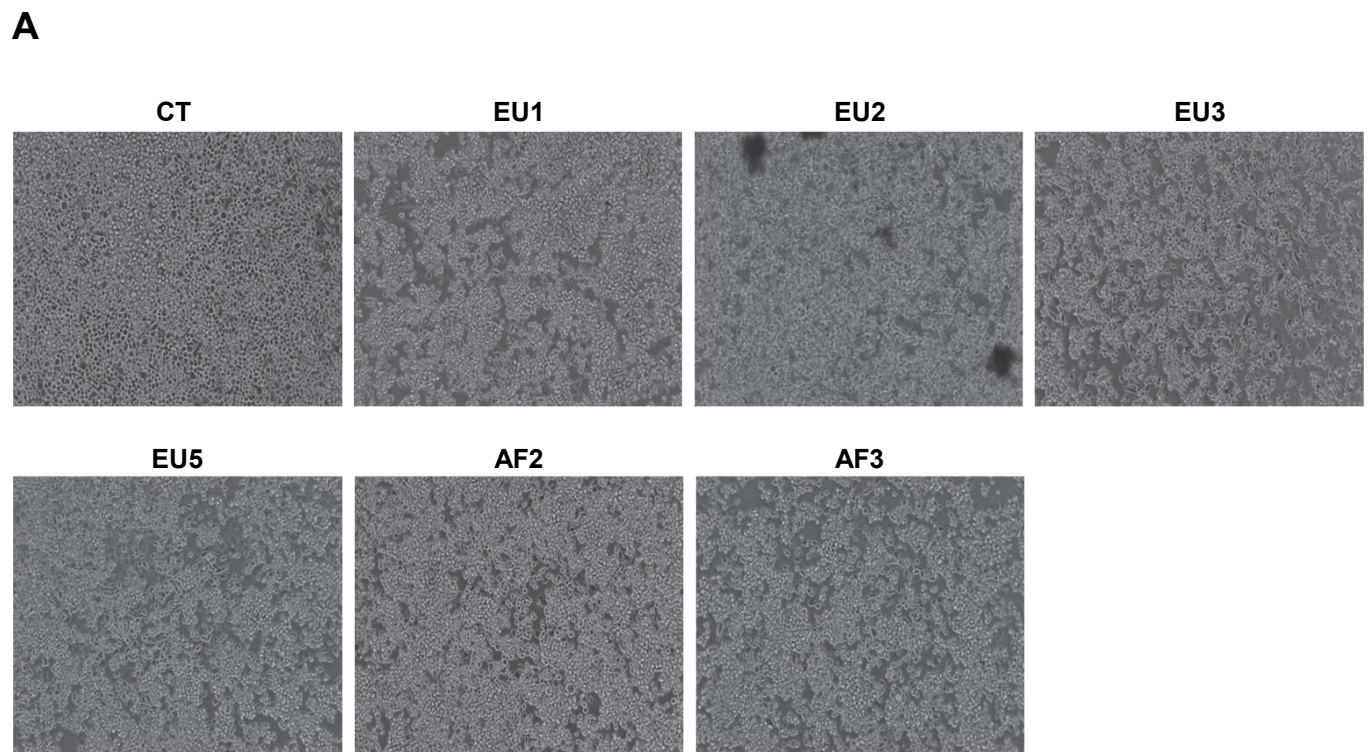


Supp Figure 1

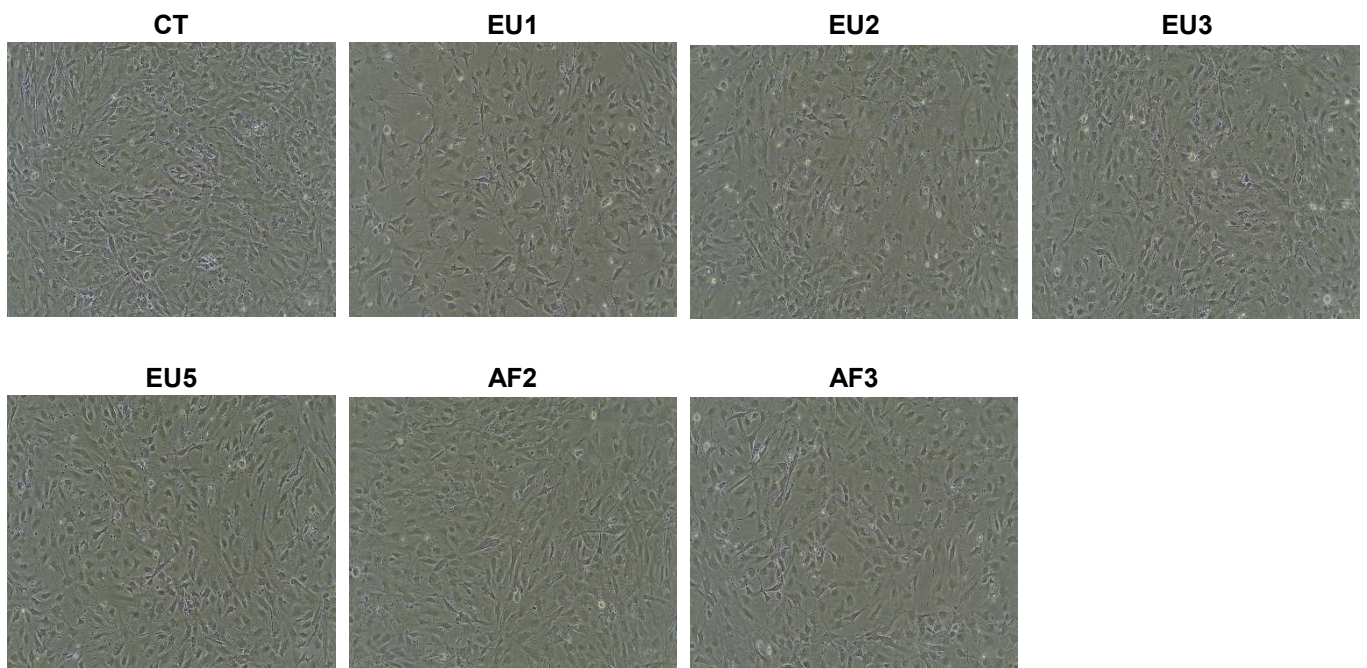




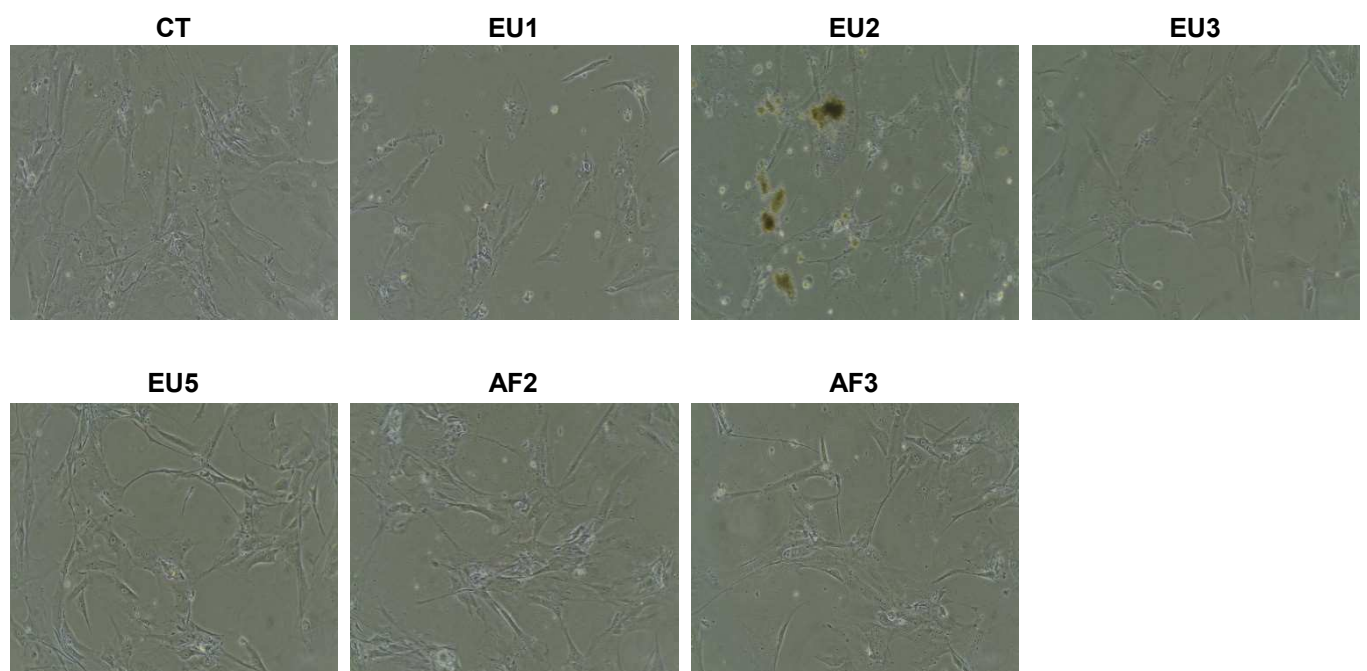
Supp Figure 2



**A**



**B**



cambridge.org/hyg

M. Clé<sup>1</sup>, C. Beck<sup>2</sup>, S. Salinas<sup>1</sup>, S. Lecollinet<sup>2</sup>, S. Gutierrez<sup>3</sup>, P. Van de Perre<sup>4</sup>,  
T. Baldet<sup>3</sup>, V. Foulongne<sup>4</sup> and Y. Simonin<sup>1</sup>

## Review

**Cite this article:** Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, Baldet T, Foulongne V, Simonin Y (2019). Usutu virus: A new threat? *Epidemiology and Infection* **147**, e232, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001213>

Received: 12 April 2019

Revised: 22 May 2019

Accepted: 4 June 2019

## Key words:

Arboviruses; virology (human) and epidemiology; virology

## Author for correspondence:

Y. Simonin, E-mail: [yannick.simonin@umontpellier.fr](mailto:yannick.simonin@umontpellier.fr); C. Beck, E-mail: [Cecile.beck@anses.fr](mailto:Cecile.beck@anses.fr)

<sup>1</sup>Pathogenesis and Control of Chronic Infections, University of Montpellier, Inserm, EFS, Montpellier, France; <sup>2</sup>UPE, Anses Animal Health Laboratory, UMR1161 Virology, INRA, Anses, ENVA, Maisons-Alfort, France; <sup>3</sup>ASTRE, CIRAD, INRA, University of Montpellier, Montpellier, France and <sup>4</sup>Pathogenesis and Control of Chronic Infections, University of Montpellier, Inserm, EFS, CHU Montpellier, Montpellier, France

## Abstract

Usutu virus (USUV) is an emerging arbovirus that was first isolated in South Africa in 1959. This *Flavivirus* is maintained in the environment through a typical enzootic cycle involving mosquitoes and birds. USUV has spread to a large part of the European continent over the two decades mainly leading to substantial avian mortalities with a significant recrudescence of bird infections recorded throughout Europe within the few last years. USUV infection in humans is considered to be most often asymptomatic or to cause mild clinical signs. Nonetheless, a few cases of neurological complications such as encephalitis or meningo-encephalitis have been reported. USUV and West Nile virus (WNV) share many features, like a close phylogenetic relatedness and a similar ecology, with co-circulation frequently observed in nature. However, USUV has been much less studied and in-depth comparisons of the biology of these viruses are yet rare. In this review, we discuss the main body of knowledge regarding USUV and compare it with the literature on WNV, addressing in particular virological and clinical aspects, and pointing data gaps.

## Usutu virus: a flavivirus of African origin

Among emerging viruses, Usutu virus (USUV) has recently attracted the attention of the scientific community due to its extensive spread in Europe. USUV is an arbovirus of the *Flaviviridae* family and of the *Flavivirus* genus, comprising more than 70 members. Flaviviruses include some of the most pathogenic arboviruses for humans, such as West Nile virus (WNV), dengue virus, yellow fever virus, Zika virus as well as Japanese encephalitis virus (JEV) [1]. USUV is a member of the Japanese encephalitis serocomplex and is phylogenetically close to JEV and WNV [2, 3]. Its name derives from the Usutu River in Swaziland, in Southern Africa. USUV was first identified in 1959 by McIntosh as part of a study on the prevalence of viruses in arthropods in South Africa during which USUV was isolated from field-caught *Culex neavei* mosquitoes through intracerebral inoculation of newborn mice [4, 5]. Then, it was also isolated from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* in Uganda [4]. USUV is an enveloped virus of approximately 40–60 nm in diameter, with a single-stranded RNA of positive polarity comprised of 11 064 nucleotides harbouring a 5' N7-methylguanosine-triphosphate cap but lacking a polyA tail at the 3' end [6]. The genome of USUV comprises a single open reading frame coding for a polyprotein of 3434 amino acids that, after cleavage, generates to three structural proteins (capsid C, pre-membrane prM and envelope E) and eight non-structural proteins (NS1/NS1', NS2a, NS2b, NS3, NS4a, 2K, NS4b and NS5) [2]. The capsid protein (C) forms the central body of the virion and is associated with the viral RNA. The prM protein is required for virion assembly and maturation of virions through the folding of the envelope glycoprotein (E) that participates in various aspects of the viral cycle such as attachment and fusion to the cell membrane [7]. The non-structural proteins (NS) of flaviviruses is associated with the endoplasmic reticulum to form replication complexes in which NS5 ensures viral RNA replication by its RNA-dependent RNA polymerase activity [6]. Similarly to other flaviviruses, viral replication takes place in the cytoplasm of infected cells. The NS5 protein, which is highly conserved among USUV strains, has a methyltransferase domain required for the addition of the cap element at the 5' end of the viral genomic RNA [7]. Phylogenetic studies based on the nucleic acid sequence of the NS5 gene have shown that USUV strains isolated in different regions of the world can be divided into eight lineages: three African and five European [8], and that the level of genetic relatedness depends on their geographical origin and on the host from which they have been isolated. A comparative analysis of USUV genomes reveals specific amino acid mutations linked with the geographical origin of the isolate and the hosts involved. These mutations are found particularly in C (A120V), NS4B (M16I), prM (Y120N), as well as E (G195R) [9–11].

© The Author(s) 2019. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Tropism and pathogenesis

USUV has been shown to infect a large number of cell lines or primary cells from different species (e.g. human (dendritic and HeLa cells), equine (ED), bovine (MDBK), porcine (PK-15), rabbit (RK-13), canine (MDCK, DK), feline (CR), hamster (BHK-21, BF), rat (C6), turtle (TH1), birds (GEF), monkey (LLC-MK2, Vero cells)) [12, 13]. Cytopathic effects have been observed in Vero, GEF, CRFK, DNI.Tr, E, EA.hy.926, FoLu, OHH1.K, OK, PK(15), Sf 1 Ep, A549, Hep-2, KB and Mv 1 Lu cell lines [12, 14, 15]. USUV, like for other flaviviruses, can also infect murine mature neurons and microglial cells *in vitro*, as well as human neuronal precursors and astrocytes, leading to death by apoptosis or arrest of proliferation, respectively [16].

USUV infection has been shown to activate cellular stress response such as autophagy in the Vero cell line, which promotes its replication [17]. Infection of mammalian cells (human astrocytes and monocyte-derived dendritic cells, Vero and Hep-2 human cell lines) also activated innate immune responses and induced a high level of type 1 interferon (IFN) production [13, 15, 16]. In monocyte-derived DCs, USUV induced more type I IFN activity than both WNV lineages 1 and 2 [13]. Moreover, USUV replication was found to be more sensitive to types I and III IFNs than WNV replication [13]. These findings suggest that USUV is less efficient at counteracting IFN production than WNV and that USUV and WNV may interact differently with innate IFN antiviral defences.

In 1-week-old Swiss or NMRI mice infected intraperitoneally, USUV infection gives rise to clinical signs: disorientation, depression, paraplegia, paralysis and coma, and are associated with neuronal death in the brains of infected animals as well as demyelination of the spinal cord [18, 19]. In these studies, all of the suckling mice that survived to USUV infection were protected against a lethal challenge with a highly virulent WNV strain, suggestive of WNV clinical cross-protection afforded by USUV infection. However, USUV immunity did not reduce WNV replication upon subsequent WNV challenge. Unlike WNV, no mortality was recorded in adult mice (8 weeks old) infected with USUV at any of the doses tested, illustrating the limited pathogenicity of USUV in immunocompetent mice as compared to WNV [19, 20].

In contrast to immunocompetent adult mice, mice lacking the interferon  $\alpha/\beta$  receptor (IFNAR $^{-/-}$ ) were highly sensitive to USUV neuroinvasive infection, with death induced approximately 6 days after infection [21]. Moreover, high levels of USUV genomic RNA was detected in mouse brain samples. USUV neuroinvasive infections are also described in avian reservoir species, as well as in some human patients exposed to the virus (see below).

## Epidemiology

### Geographical distribution

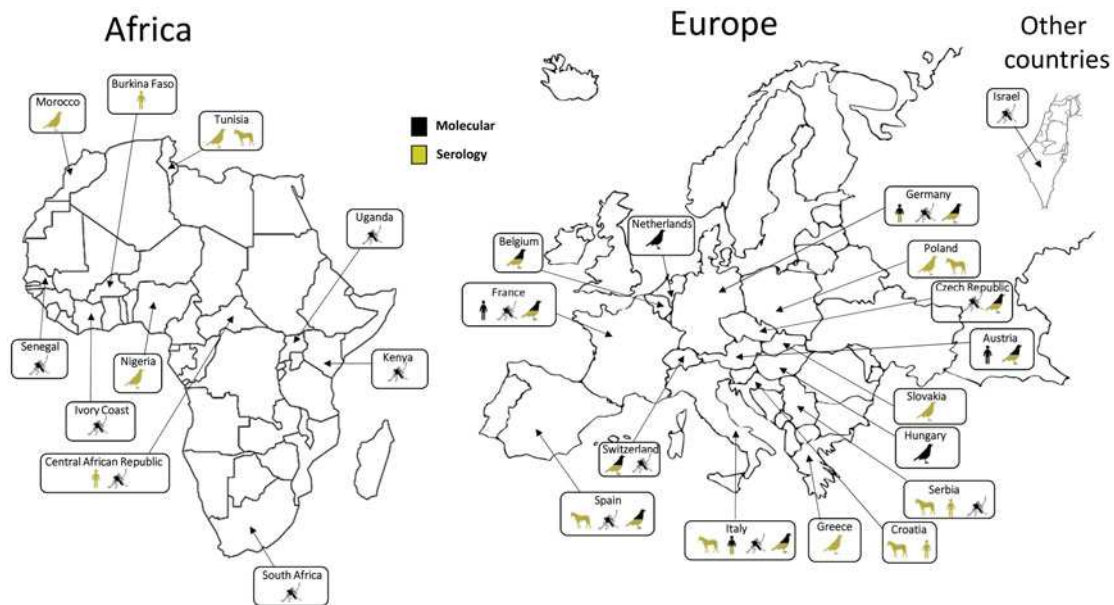
Following its first identification in South Africa, USUV has been detected in other African countries: Central African Republic, Senegal, Ivory Coast, Nigeria, Uganda, Burkina Faso, Tunisia and Morocco [22–25]. This virus was also detected in Israel in *Culex* mosquitoes collected in 2014–2015 [26]. Phylogenetic analyses suggest that at least three USUV introductions have occurred in Europe along the migratory routes from Africa. The virus is thought to have been introduced in Spain on two occasions in the 1950s and then in the 1990s along an eastern Atlantic migratory route [10]. Furthermore, a unique introduction in central Europe appears to have occurred in the 1980s along a Black

Sea/Mediterranean migratory route [10, 27]. Up to 2015, USUV infection had been reported from mosquitoes, birds or horses in 12 European countries (Germany, Austria, Belgium, Croatia, Spain, France, Greece, Hungary, Italy, the Czech Republic, Serbia and Switzerland) [28–32] (Fig. 1). During the summer of 2016, a major USUV epidemic affecting the avifauna was evidenced in Northern Europe, with extensive circulation in Belgium, Germany, France and, for the first time, in the Netherlands [8, 33, 34]. Furthermore, USUV infection has also been serologically identified in Slovakia and in Poland in equine and avian populations [35, 36]. In 2018, USUV spread rapidly in Western Europe, also associated with a large WNV epidemic that reached 1503 human cases, including 181 deaths in a dozen European countries [37, 38]. These data not only suggest a continuous geographical spread of the virus, but also the colonisation of new ecological niches. USUV endemicity in different European countries, as assessed by repeated transmission reports every summer and autumn, could be explained by residual enzootic transmission in affected areas but without detectable and significant clinical expression in bird populations. Moreover putative mechanisms of USUV persistence between two epizootic events involve USUV overwintering in infected mosquito females or in natural reservoir hosts or by virus vertical transmission of infected mosquito females to their offspring [39]. However, the mechanisms that allow the efficient overwintering and subsequent amplification of USUV in Europe have not been elucidated. The USUV strains identified in Europe display a broad genetic diversity, underscoring several introductions from Africa and the plasticity of the strains circulating in Europe. USUV frequently co-circulates with WNV in numerous European countries. WNV re-emerged in 2015 in Southeast France concomitantly with USUV, and enhanced dual reporting of WNV and USUV outbreaks in 2018 was observed in several European countries [40].

Given that USUV and WNV are genetically, antigenically and epidemiologically closely related, one question is whether such overlaps in transmission cycles can influence the spatiotemporal dynamics of the circulation of the two viruses in Europe and the associated risks for humans. Co-infections in humans would therefore be possible and probable. They could complicate diagnosis and symptomatology. In addition, since these two viruses are quite similar, ‘cross-immunity’ would be possible, which would make epidemiological models more complex. USUV, which appeared more than 20 years ago in Europe, has spread over the last years to many European countries with significant bird mortality in countries facing central European USUV strain circulation for the first time.

### Vertebrate hosts

USUV is maintained through an enzootic cycle between passerine birds mainly blackbirds (*Turdus merula*) or magpies (*Pica pica*) and Strigiformes, such as the Great Gray Owl (*Strix nebulosa*) as amplifying hosts and ornithophilic mosquitoes as vectors. USUV and WNV transmission cycles are therefore similar. USUV has been shown to infect 58 bird species derived from 13 orders and 26 families [41]. USUV can infect different European migratory bird species such as *Falco tinnunculus* (the common kestrel), *Sylvia curruca* (the lesser whitethroat) or *Ficedula hypoleucas* (the European pied flycatcher) [22] but also resident species, such as *P. pica* (the Eurasian magpie), *Passer domesticus* (the house sparrow) and *Turdus merula* (the common blackbird) [41] (Table 1). The virus was first identified in dead



**Fig. 1.** Worldwide USUV distribution. Concerned countries: Austria, Belgium, Burkina-Faso, Central African Republic, Croatia, Czech Republic, France, Germany, Greece, Hungary, Israel, Italy, Ivory Coast, Kenya, Morocco, Nigeria, The Netherlands, Poland, Senegal, Serbia, Slovakia, South Africa, Spain, Switzerland, Tunisia, Uganda. Symbols indicate in which species USUV has been detected (man, birds, mosquitoes or horses). Method of identification (molecular or serological) is indicated for each species.

blackbirds in Austria in 2001 and in Italy in 1996 [42]. USUV was also isolated in captive owls found dead or moribund in zoological gardens in Austria (2001), in Switzerland (2006) and in France (2016–2018) [37, 43, 44]. Central nervous system disorders have been reported in USUV-infected birds. The most reported clinical signs are being prostration, disorientation, ataxia and weight loss. Hepatomegaly and splenomegaly are the main macroscopic lesions. Necrotic areas and inflammatory infiltrates composed of lymphoid and histiocytic cells have also been reported in the heart, liver, kidneys, spleen and brains of infected birds [45]. Glial nodules and neuronophagia have also been observed in the brain [45]. USUV can therefore be highly pathogenic in wild and captive birds, due to its wide tropism and virulence in a variety of tissues and organs. USUV circulation has consequently led to substantial avian death in different European countries although the consequences of USUV-associated mortality on the dynamics of avian populations have not been clearly investigated to date. The correlation between enhanced bird mortality and speed of virus turnover within the natural reservoir with the risk of USUV infection in incidental hosts such as humans needs to be evaluated, as for WNV [46].

Beyond birds, USUV has also been detected in mammals. USUV has been isolated from the brain of bats (*Pipistrellus*) found dead in southwest Germany, questioning the role of these animals in USUV amplification [58]. Other species can also be infected with USUV although the consequences of USUV exposure in these species have only been partially assessed. USUV-specific antibodies have been detected in the serum of horses in Italy, Serbia, Croatia, Poland and on the island of Mallorca in Spain [36, 59]. Virus neutralisation tests carried out on the sera of military horses and dogs in Morocco in 2012 also suggest exposure of these animals to USUV [24]. In 2014, another study reported the presence of anti-USUV antibodies in 10 equines in the southwest of Tunisia [23]. USUV-specific neutralizing antibodies have been detected in wild boars in Serbia

[60]. Lastly, a retrospective serological survey, undertaken on the sera of 4693 wild ruminants has reported a prevalence of USUV-specific antibodies corresponding to 0.1–0.2% of the tested animals [61]. This study involved samples from Red deer (*Cervus elaphus*), Fallow deer (*Dama dama*), European mouflon (*Ovis aries musimon*) and Roe deer (*Capreolus capreolus*), collected between 2003 and 2014 in Spanish hunting parks. Serological tests (ELISA and serum neutralisation) have shown the circulation of USUV in hunting dogs in southern Italy (1.3% of the tested animals) [62]. More recently USUV has been isolated from rodent and shrew species in Senegal [63].

### Vectors

Several mosquito species are involved in WNV and USUV infection of the wild or captive avifauna [43, 64]. These mosquitoes are mainly ornithophilic species of the *Culex* genus. They are also responsible for virus transmission to susceptible mammals in particular to humans (WNV, USUV) and horses (WNV), which are viewed as incidental dead-end hosts, with short-lasting and low-level viraemia. USUV has been isolated from many species of mosquitoes throughout the African continent, primarily in countries where entomological surveillance programmes have been implemented, such as Senegal, Kenya and Uganda [22, 65] as well as more recently in southern and central Europe as in Italy or Austria [66]. The mosquito species in which USUV has been detected most often belong to the *Culex* genus like *Cx. modestus*, *Cx. neavei*, *Cx. perexiguus*, *Cx. perfuscus*, *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. univittatus* but also to other genera such as *Ae. albopictus*, *Ae. japonicus*, *Ae. minutus*, *Anopheles maculipennis*, *Culiseta annulata*, *Mansonia africana*, *Ma. aurites* (recently renamed *Coquillettidia aurites*), *Ochlerotatus caspius* and *Oc. detritus* (both formerly named *Ae. caspius* and *Ae. detritus*) (Tables 2 and 3). *Culex pipiens*, an ornithophilic species, but which can also feed on humans, is considered to be the main vector in Europe [47].

**Table 1.** List of birds with USUV clinical infections

Order	Common name	Scientific name	Migration pattern	Countries with USUV RT-PCR positive animals	Ref
Passeriformes	Blackbird	<i>Turdus merula</i>	R,P	AT, CZ,FR,DE,HU,IT,NL, BE, CH	[32, 33, 44, 47–55]
	Common Starling	<i>Sturnus vulgaris</i>	R,P, S	DE, IT	[47, 49, 53, 55]
	Song Trush	<i>Turdus philomelos</i>	M	AT, DE, SP	[50, 55, 56]
	Canary	<i>Serinus canaria domestica</i>	Captive	DE	[49, 55]
	House sparrow	<i>Passer domesticus</i>	R	AT, DE, CH	[44, 48, 49, 53, 55]
	Blue (great) tit	<i>Parus caeruleus (major)</i>	R,P, M	AT, CH	[44, 48]
	European greenfinch	<i>Chloris chloris</i>	P	CH	[44]
	European robin	<i>Erithacus rubecula</i>	P	AT, CH	[44, 48]
	Bullfinch	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	Captive	BE	[57]
	Nuthatch	<i>Sitta europaea</i>	R	AT	[48]
	Eurasian Jay	<i>Garrulus glandarius</i>	R, P	HU,IT	[47, 53, 54]
	Magpie	<i>Pica pica</i>	R	IT	[52, 53]
	Barn Swallows	<i>Hirundo rustica</i>	M	AT	[42]
Strigiformes	Great Grey owl	<i>Strix nebulosa</i>	Captive	AT, DE, CH, FR, IT, NL	[33, 44, 48, 49, 55]
	Long-eared owl	<i>Asio otus</i>	Captive	DE,IT	[47, 55]
	Snowy owl	<i>Bubo scandiacus</i>	Captive	CH	[44]
	Tengmaml's owl	<i>Aegolius funereus</i>	Captive	CH, IT	[44]
	Hawk owl	<i>Surnia ulala</i>	Captive	CH, DE	[48, 55]
	Pygmy owl	<i>Glaucidium passerinum</i>	Captive	CH	[44]
Coraciiformes	Common Kingfisher	<i>Alcedo atthis</i>	R,P, M	DE	[49, 55]
	European Bee-eater	<i>Merops apiaster</i>	M	IT	[53]
Piciformes	Great spotted woodpecker	<i>Dendrocopos major</i>	R	BE	[14, 53]
	European Green Woodpecker	<i>Picus viridis</i>	R	DE, IT	[55]
Charadriiformes	Inca Tern	<i>Larosterna inca</i>	Captive	DE	[55]
	Yellow-legged gull	<i>Larus michahellis</i>	R	IT	[53]
Accipitriformes	Greater Spotted Eagle	<i>Aquila clanga</i>	M	IT	[53]
Caprimulgiformes	Nightjar	<i>Caprimulgus europaeus</i>	M	IT	[47]
Pelecaniformes	Grey Heron	<i>Ardea cinerea</i>	R, P	IT	[53]
Columbiformes	Collared Dove	<i>Streptopelia decaocto</i>	R	IT	[47, 53]
Galliformes	Red-legged Partridge	<i>Alectoris rufa</i>	R	IT	[47]

R, resident; P, partial; M, migratory; S, short distance.

Bird orders, common and scientific names and their behaviour (resident or migrating birds), as well as the countries having reported USUV positive RT-PCR animals are indicated.

In addition, the vector competence of *Cx. pipiens*, *Cx. neavei* and *Cx. quinquefasciatus* for USUV has been demonstrated under laboratory conditions [86–88] (Tables 2 and 3). The vector competence of *Cx. pipiens* has been shown to be greater for USUV than for WNV, under conditions of elevated temperature (at 28 °C) [87]. In a recent study, two UK strains of *Cx. pipiens*

challenged with an African strain of USUV showed a very low vector competence [89]. These contradictory results with previous experimental infections could be explained by the genetic variability of the USUV strains and the differences in susceptibility between different populations of the same mosquito species for the same virus [90]. The selective pressures associated with the

**Table 2.** Mosquito species found infected by USUV in the field and bridge vectors

Species (bridge vector)	Country (site)	Year	Reference
<i>Aedes albopictus</i> (S)	Israel (Haifa)	2015	[26]
	Italy (Emilia-Romagna)	2009, 2010, 2011, 2012	[47, 53, 67–69]
<i>Aedes japonicus</i>	Austria (Graz)	2018	[66]
<i>Aedes minutus</i> (N)	Senegal (Kedegou)	1998	CRORA (unpublished)
<i>Anopheles maculipennis</i> sl (S)	Italy (Emilia-Romagna)	2010, 2011	[53, 69]
<i>Culex antennatus</i> (S)	Senegal (Barkedji)	2012, 2013	[70]
<i>Culex modestus</i> (P)	Czech Republic (South-Moravia)	2013	[71]
	Italy (Emilia-Romagna)	2013	[72]
<i>Culex neavei</i> (S)	Senegal (Barkedji)	2003	CRORA (unpublished)
	Senegal (Barkedji)	2012, 2013	[70, 73]
	South Africa (Natal)	1959	[74]
<i>Culex perexiguus</i> (S)	Israel (Sdeh Eliahu, Midrach)	2015	[26]
	Spain (Guadalquivir Delta)	2009	[75]
<i>Culex perfuscus</i> (S)	Central African Republic	1969, 1980	Institut Pasteur de Bangui (unpublished)
	Senegal (Kedegou)	1974, 1998	CRORA (unpublished)
<i>Culex pipiens</i> (P)	Austria (Linz, Graz)	2018	[66]
	France (Camargue Delta)	2015	[31]
	Germany (Emsdetten)	2016	[30]
	Germany (Freiburg)	2014	[30]
	Germany (Leipzig)	2015	[76]
	Germany (Weinheim)	2010	[77]
	Israel (Kityat Ata)	2014	[26]
	Israel (Yeftachel)	2015	[26]
	Italy (Emilia-Romagna)	2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016	[47, 53, 67–69, 78]
	Italy (Friuli-Venezia-Giulia)	2012	[69]
	Italy (Lombardy)	2009, 2011, 2013, 2014	[69]
	Italy (Lazio)	2018	[79]
	Italy (Liguria)	2014	[69]
	Italy (Marche)	2011	[69]
	Italy (Molise)	2011	[69]
	Italy (Piedmont)	2009, 2010, 2011, 2014	[69, 80, 81]
	Italy (Sardinia)	2011, 2013	[69]
	Italy (Tuscany)	2009, 2010	[52, 69]
	Italy (Veneto)	2009, 2010, 2011, 2012, 2013	[69, 82, 83]
	Serbia (Titel, Zrejanin)	2014	[29]
Spain (Ebre Delta)	2006	[84]	
Switzerland (Ticino, Geneva)	2011, 2012	[85]	
<i>Culex quinquefasciatus</i> (P)	Ivory Coast	2004	CRORA (unpublished)
	Kenya (Kisumu)	2007–2012	[65]
<i>Culex univittatus</i> (group) (S)	Senegal (Barkedji)	1993	CRORA (unpublished)
	Uganda (Jinja)	2012	[25]

(Continued)



**Table 2.** (Continued.)

Species (bridge vector)	Country (site)	Year	Reference
<i>Culiseta annulata</i> (P)	Italy (Molise)	2011	[69]
<i>Mansonia africana</i> (S)	Central African Republic	1969, 1980	Institut Pasteur de Bangui (unpublished)
<i>Mansonia aurites</i> <sup>a</sup> (S)	Uganda (Entebbe)	1962	[4]
<i>Ochlerotatus caspius</i> <sup>b</sup> (S)	Italy (Emilia-Romagna)	2011, 2012, 2013	[53, 69, 72]
	Italy (Veneto)	2010	[69]
<i>Ochlerotatus detritus</i> <sup>c</sup> (P)	Italy (Molise)	2011	[69]

P, potential; S, small probability; N, no probability.

Mosquito species and then countries are ordered alphabetically. Bridge vectors. P: refer to potential bridge vectors, i.e. mosquito species that readily bite birds and humans. S: refers to species with a lower probability of being bridge vectors and encompass opportunistic species that rarely bite both humans and birds, or have a low vector competence for WNV. N: refers to species that have very low or no probability of being a competent bridge vector. For Africa, USUV has been isolated only in countries in which entomological surveillance programmes have been undertaken particularly Senegal and Uganda, suggesting that its geographic distribution may be much wider than the reported detection.

<sup>a</sup>Recently renamed *Coquilletidia aurites*.

<sup>b</sup>Formerly named *Aedes caspius*.

<sup>c</sup>Formerly named *Aedes detritus*.

**Table 3.** Oral infection experiments. Infection, dissemination and transmission rates for mosquitoes 14 days after oral exposure to USUV

Species/(populations)	USUV Strain used	Blood meal titer (PFU/ml) (TCID50/ml)	Infection rate <sup>a</sup>	Dissemination rate <sup>b</sup>	Transmission rate <sup>c</sup>	Reference
<i>Culex neavei</i> (Barkedji, Senegal)	SAAR 1776	$2 \times 10^7$	33.3% (1/3)	0% (0/1)	–	[86]
		$2 \times 10^7$	22.2% (2/9)	0% (0/2)	–	
		$2 \times 10^7$	0% (0/1)	–	–	
		$1.8 \times 10^8$	<b>90.9%</b> (40/44)	<b>40.0%</b> (16/40)	<b>81.3%</b> (13/16)	
<i>Culex pipiens</i> (Brummen, The Netherlands)	USUV, Bologna '09	$4 \times 10^7$	<b>80%</b>	Not studied	<b>69%</b>	[87]
<i>Culex pipiens</i> (Mercer County, NJ, USA)	SAAR 1776	$1 \times 10^{7.5}$	<b>58.6%</b> (17/29)	<b>92.3%</b> (12/13)	<b>23.5%</b> (4/17)	[88]
<i>Culex quinquefasciatus</i> (Vero Beach, FL, USA)	SAAR 1776	$1 \times 10^{6.95}$	<b>70.0%</b> (21/30)	<b>35.7%</b> (5/14)	<b>19.0%</b> (4/21)	[88]
<i>Aedes albopictus</i> (Mercer County, NJ, USA)	SAAR 1776	$1 \times 10^{5.95}$	<b>0%</b> (0/27)	–	–	[88]
<i>Culex pipiens</i> form <i>pipiens</i> (Caldbeck, UK) <i>Culex pipiens</i> hybrid form (Brookwood, UK)	SAAR 1776	$1 \times 10^6$ (25°)	<b>5%</b> (1/20)	<b>5%</b> (1/20)	<b>100%</b> (1/1)	[89]
	SAAR 1776	$1 \times 10^6$ (25°)	<b>0%</b> (0/18)	–	–	
<i>Aedes albopictus</i> (Emilia-Romagna, Italy)	USUV1	$0.66 \times 10^{7.5}$	<b>0%</b> (0/20)	–	–	[78]
	USUV2	$0.66 \times 10^{7.5}$	<b>0%</b> (0/20)	–	–	
	USUV3	$0.66 \times 10^{7.9}$	<b>0%</b> (0/19)	–	–	

PFU, plaque-forming unit; TCID50, tissue culture infectious dose 50%.

After 14 days incubation at 27–28 °C and 80% relative humidity (except for Hernández-Triana *et al.*, 2018 for which both UK lines of *Culex pipiens* were tested for their vector competence for the SAAR-1776 strain of USUV at 25 °C), fed mosquitoes were analysed for USUV infection of their bodies (infection), of their legs and wings (dissemination), and the presence of virus in the saliva (transmission).

<sup>a</sup>No. infected mosquito bodies/no. mosquitoes tested.

<sup>b</sup>No. mosquitoes with infected wings and legs/no. infected mosquitoes.

<sup>c</sup>Formerly named *Aedes detritus*

laboratory colonisation process of mosquito populations can modify susceptibility to infection; moreover, experimental conditions, such as virus titres in the blood meal during oral infection and incubation temperature and length can also influence mosquito competence.

In contrast, North American and European populations of *Ae. albopictus* appear to be resistant to USUV infection even though this species has been repeatedly found infected in the Emilia-Romagna region, Northern Italy [78, 88, 91]. Isolation of infectious viruses or detection of viral RNA from *Ae. albopictus*

may be a consequence of recent engorgement from viraemic avian species as some *Ae. albopictus* populations have been demonstrated to have opportunistic feeding behaviours and utilise avian species as a source of blood meals. Nevertheless, experimental infection studies of *Ae. albopictus* by USUV should be repeated, possibly using other vector populations, virus strains and dosages. Additional research should be carried out in the laboratory (vector competence) and in the field (vector capacity) to clarify its role in USUV (and also WNV) transmission and the associated risk for humans [78].

## Clinical manifestations in humans

The zoonotic potential associated with USUV infection was initially described in Africa. The first case of human infection by USUV was reported in the Central African Republic in the 1980s and a second case was diagnosed in Burkina Faso in 2004 [22]. For these two cases, mild clinical signs were reported: fever and skin rash. In Europe, the recent epizootics were also accompanied by descriptions of neuroinvasive infections in humans. In 2009 in Italy, two cases of meningoencephalitis associated with USUV infection were described in immunosuppressed patients [92, 93]. Shortly after this first description, three additional cases of USUV meningoencephalitis which occurred in 2008 and 2009 were retrospectively detected [94]. Again in Italy and during the same period, a retrospective study carried out recently in Emilia-Romagna region has allowed the documentation of eight other patients with encephalitis or meningoencephalitis, with USUV infection associated with other comorbidities in half of these cases, and two patients with asymptomatic infection [95]. Six other symptomatic cases were reported in Croatia in 2013 and in 2018 [96, 97]. These acute infections however do not reflect the full spectrum of human USUV infections, as the studies were carried out on cohorts exhibiting signs of neurological infections of varying severity. Our team recently described an acute USUV infection associated with a probable atypical presentation of a *frigore* facial paralysis in France [98]. The full clinical presentation of USUV infection needs thus to be better defined.

Recent studies performed on sera from blood donors have confirmed the existence of asymptomatic USUV infections [79]. This was the case in Germany for an asymptomatic blood donor who was found to be positive for USUV by PCR [99], and in Austria, for six donors who were positive for USUV [100]. In these two studies, primary screening of the blood donations for WNV, resulting positive in WNV screening tests allowed the identification of USUV infections by sequencing. Thus, out of the seven positive signals obtained by WNV RT-PCR in the Austrian study, six were identified as USUV after sequencing [100].

To date, in Europe, there have been 46 documented cases of acute USUV infection in humans, most of them were accidentally identified in donated blood samples. (Table 4). It is impossible to know whether these cases of infection represent the tip of the iceberg and whether the incidence of acute infections by USUV could, in fact, be more substantial. Reporting of USUV bird epizootics probably implies a higher exposure level of humans to the zoonotic risk. Indeed, the human cases detected in Italy coincided with USUV outbreaks, and interestingly some authors suggest that USUV exposure may be higher than for WNV [101]. The recent infections detected in blood donors in Germany and in Austria coincided with the most substantial epizootics that have been observed in recent times in central Europe, particularly in 2016 and 2018 [99, 100, 102]. Phylogenetic analysis of the viral strains detected in humans in these two countries identified at different period times strains of the Europe 2, Europe 3 and Africa 3 lineages corresponding to the same strains isolated in the populations of blackbirds and passerines from Germany and Austria. The strain derived from the Africa 2 lineage, implicated in the human case detected in the South of France [98], was also identified in mosquito populations of the *Cx. pipiens* species captured nearby in the same region 1 year earlier [31]. Substantial circulation of USUV in avian reservoirs as well as in vectors appears to increase the probability of human infections.

Seroprevalence studies seem to indicate non-negligible exposure of humans to USUV infection risk (Table 4). These studies carried out in Italy, in Germany and in Serbia reported USUV-antibody prevalences between 0.02% and 1.1% among healthy blood donors [101, 103–107]. Several of these studies show that USUV circulates more actively than WNV in Europe. Studies on the prevalence of USUV infection in mosquito vectors in Europe have revealed higher infection rates for USUV than for WNV. In Northern Italy (Emilia-Romagna), the Maximum Likelihood Estimates (MLE) value calculated as a regional seasonal average for *Cx. pipiens* was quite stable showing a continuous circulation at similar levels from 2009 to 2016 in the range 0.23–0.54 [78]. In contrast, WNV infection rates in the same mosquito species and in the same region were 2–5 times lower [53], with different strains circulating discontinuously and in different locations over the years [108]. This situation potentially reflects higher levels of circulation of USUV relative to WNV at least in some European regions like Northern Italy. Nonetheless, the data remain tenuous for accurately assessing USUV incidence in humans and the serological diagnostic tools available need to be improved to allow for large-scale screening.

## Diagnosis and surveillance of USUV infection

Diagnosing USUV infection in humans relies on several techniques: (i) the detection of viral RNA in blood and in cerebrospinal fluid (CSF), (ii) the isolation of the virus in cell culture and/or (iii) indirect assay detecting anti-USUV antibodies (IgM and G) in the serum and the CSF of patients.

To date, no commercial diagnostic test is available. USUV serological assays are based on ELISA tests or immunofluorescence tests that have been developed by reference laboratories, performed with viral antigens or virus isolates. These tests suffer from a lack of specificity. They need to be systematically confirmed by seroneutralisation assays to reduce the risk of serological cross-reactions described with infections by closely related flaviviruses, such as WNV. The kinetics of USUV antibody response in humans is not known and interpretations are usually drawn from data gained from WNV descriptions. Thus, in our recent experience, there was no detectable antibody response 3 days during an acute USUV infection, in contrast to the kinetics usually observed with other flaviviruses. Direct diagnosis of USUV infection can be obtained by isolating the virus in cell cultures and visualizing cytopathic effects. Numerous cells are permissive to the virus, and the most used are mosquito C6/36 or mammalian Vero cells [14].

The techniques used for the amplification of WNV RNA, from donated blood (such as the cobas® WNV test (Roche Diagnostics, Germany)), also present a lack of specificity, allowing as well the detection of USUV genome [8, 100]. Numerous RT-PCR techniques have been described and some PCR methods have been developed to be specific for USUV sequences [94, 109] and others amplify USUV as several other flaviviruses by screening for a conserved region in the NS5 polymerase gene that is common to these viruses [110–112]; virus typing can then be performed secondarily by sequencing or hybridisation [111]. This ‘pan-flavivirus’ approach is certainly more cumbersome but it provides a double advantage. First, it offers a wider range of detection, which may be useful for the integrated surveillance of different arboviruses with very similar epidemiology, such as USUV and WNV. Second, the sequencing step, necessary for the identification of the viral aetiology, also allows for a phylogenetic analysis

**Table 4.** Chronological description of human cases worldwide


Acute infections ( <i>n</i> = 49)							
Country	Year	Number	Sample	Clinic	Studied population	Diagnostic method	ref
CAR	1981	1	Blood	Eruptive fever	Clinical case	Culture	[22]
Burkina	2004	1	Blood	Fever and jaundice	Clinical case	Culture	[22]
Italy	2009	1	CSF	Meningoencephalitis	Clinical case	Panflavi RT-PCR + sequence	[92]
	2009	1	Blood	Encephalitis	Clinical case	Procleix-WNV + panflavi RT-PCR + sequence	[93]
	2008–9	3/44	CSF	Meningoencephalitis	Meningoencephalitis patients	Specific RT-PCR	[94]
	2008–11	8/306 + 2/609	CSF + blood	Meningoencephalitis /healthy	Meningoencephalitis patients (CSF) + various healthy and sick subjects (serum)	Specific RT-PCR + seroneutralisation	[95]
Croatia	2013	3/95	Blood	Meningoencephalitis	Meningoencephalitis patients	ELISA + seroneutralisation	[96]
	2018	3/178	Blood + Urine	Neuroinvasive disease	Neuroinvasive cohort	Specific RT-PCR + seroneutralisation	[97]
Germany	2016	1	Blood	Healthy	Blood donors ( <i>n</i> ?)	Cobas WNV + sequence	[99]
France	2016	1/666	CSF	Idiopathic facial paralysis	Patients with infectious and/or neurological signs	RT-PCR panflavi + sequence	[98]
Austria	2017	6/12 047	Blood	Healthy	Blood donors	Cobas WNV + sequence	[100]
	2018	18/31 598	Blood	Healthy	Blood donors	Cobas WNV + specific RT-PCR + sequence	[102]
Seroprevalence ( <i>n</i> = 98)							
Country	Year	Number	Prevalence (%)	Studied population		Diagnostic method	ref
Italy	2009	4/359	1.1	Blood donors		ELISA + seroneutralisation	[101]
	2008–11	40/609	6.5	Healthy patients and various sick subjects		Seroneutralisation	[95]
	2010–11	14/6000	0.23	Blood donors		ELISA + seroneutralisation	[103]
	2012	24/3069	0.78	Blood donors		ELISA + seroneutralisation	[104]
	2014–15	6/33	18.1	Healthy forestry worker		Seroneutralisation	[105]
	2014–15	2/200	1	Blood donors		Seroneutralisation	[103]
Serbia	2015	7/93	7.5	Healthy exposed subjects		ELISA + seroneutralisation	[106]
Germany	2012	1/4200	0.02	Blood donors		ELISA, IF + seroneutralisation	[107]

CAR, Central African Republic.

of the strains. Parts of the NS5 gene that are targeted by pan-flavivirus RT-PCR have proven to be sufficiently selective for the characterisation of viral lineages [8, 10]. Since 2010, Mediterranean regions as Italy and southern France have been monitored for the risk of WNV. This monitoring now includes a veterinary component and a human component with awareness among clinicians of the presumptions for aseptic meningitis. The risk of the emergence of USUV, which shares many genetic, antigenic and epidemiological features with WNV, should lead to the inclusion of USUV in monitoring programmes. Clearly, there is a need to organise standard surveillance measures and early warning systems to detect WNV and USUV activity, and to assess the risk for public health, both at the national and European level. The information gathered through these surveillance programmes could be used to develop actions to prevent virus transmission, such as vector prevention and control, information campaigns to improve personal protection as well as screening tests for blood donations, tissue and organs. The inclusion of USUV together with WNV in surveillance plans is of primary importance and has been implemented mainly in Italy. The lack of specificity of USUV/WNV diagnostic tools, whether serological or molecular, could be an advantage in this situation, provided that there is a full characterisation of the positive cases by confirmatory serological assays (virus neutralisation tests) and by sequencing or by virus-specific RT-PCR.

## Conclusion

Responsible for recurrent epizootics since 1996 in the European avifauna, USUV is now recognised as being responsible for potentially severe neurological affections in humans. Its recent spread to a large number of European countries and co-circulation of different genetic strains deserve increased awareness and characterisation. Furthermore, USUV has been shown to co-circulate with WNV in different areas raising epidemiological and diagnostic issues. Serological cross-reactions can hamper rapid identification of circulating viruses in the absence of material allowing for direct diagnosis and can offer partial cross-protection against the other flaviviruses, possibly influencing its amplification and transmission patterns. As for any emerging arbovirus, a multidisciplinary approach involving virologists, clinicians, ornithologists, entomologists as well as closer intersectoral collaborations between operations (health, agriculture, environment) and stakeholders (involving environment, veterinary and human sectors) following the One Health approach should be established. This would help bridging the data gaps in USUV epidemiology and identifying the main risk factors, with the aim of implementing appropriate monitoring and prevention methods.

**Author ORCIDs.**  Y. Simonin, 0000-0002-3475-1369

## References

- Gould E and Solomon T (2008) Pathogenic flaviviruses. *The Lancet* **371**, 500–509.
- Calisher CH and Gould EA (2003) Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Advances in Virus Research* **59**, 1–19.
- Beck C *et al.* (2013) Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **10**, 6049–6083.
- Williams MC *et al.* (1964) The isolation of west Nile virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* (Theobald) in the Entebbe area of Uganda. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **58**, 367–374.
- McIntosh BM (1985) Usutu (SAAR 1776); nouvel arbovirus du groupe B. *Int Cat Arboviruses* **3**, 1059–1060.
- Bakonyi T *et al.* (2004) Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology* **328**, 301–310.
- Smit JM *et al.* (2011) Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses* **3**, 160–171.
- Cadar D *et al.* (2017) Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, Western Europe, 2016. *Eurosurveillance* **22**, 1–7.
- Nikolay B *et al.* (2013) Comparative full length genome sequence analysis of Usutu virus isolates from Africa. *Virology Journal* **10**, 1.
- Engel D *et al.* (2016) Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. *mBio* **7**, 1–12.
- Gaibani P *et al.* (2013) Comparative genomic and phylogenetic analysis of the first Usutu virus isolate from a human patient presenting with neurological symptoms. *PLoS ONE* **8**(5). doi: [10.1371/journal.pone.0064761](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064761).
- Bakonyi T *et al.* (2005) In vitro host-cell susceptibility to Usutu virus. *Emerging Infectious Diseases* **11**, 298–301.
- Cacciotti G *et al.* (2015) Variation in interferon sensitivity and induction between Usutu and West Nile (lineages 1 and 2) viruses. *Virology* **485**, 189–198.
- Barr KL *et al.* (2016) Working with Zika and Usutu viruses in vitro. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **10**, e0004931.
- Scagnolari C *et al.* (2013) Usutu virus growth in human cell lines: induction of and sensitivity to type I and III interferons. *Journal of General Virology* **94**, 789–795. doi: [10.1099/vir.0.046433-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.046433-0).
- Salinas S *et al.* (2017) Deleterious effect of Usutu virus on human neural cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **11**, e0005913.
- Blázquez AB *et al.* (2013) Infection with Usutu virus induces an autophagic response in mammalian cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**. doi: [10.1371/journal.pntd.0002509](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002509).
- Weissenböck H *et al.* (2004) Experimental Usutu virus infection of suckling mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination. *Acta Neuropathologica* **108**, 453–460.
- Blázquez A-B *et al.* (2015) Limited susceptibility of mice to Usutu virus (USUV) infection and induction of flavivirus cross-protective immunity. *Virology* **482**, 67–71.
- Rouffaer LO *et al.* (2018) Usutu virus epizootic and *Plasmodium* coinfection in Eurasian Blackbirds (*Turdus merula*) in Flanders, Belgium. *Journal of Wildlife Diseases* **54**, 859–862.
- Martin-Acebes MA *et al.* (2016) A recombinant DNA vaccine protects mice deficient in the alpha/beta interferon receptor against lethal challenge with Usutu virus. *Vaccine* **34**, 2066–2073.
- Nikolay B *et al.* (2011) Usutu virus in Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**, 1417–1423.
- Ben Hassine T *et al.* (2014) First detection of Co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids in the South-west of Tunisia. *Transboundary and Emerging Diseases* **61**, 385–389.
- Durand B *et al.* (2016) Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiology and Infection* **144**, 1857–1864.
- Mossel EC *et al.* (2017) Arboviruses isolated from mosquitoes collected in Uganda, 2008–2012. *Journal of Medical Entomology* **54**, 1403–1409.
- Mannasse B *et al.* (2017) Usutu virus RNA in mosquitoes, Israel, 2014–2015. *Emerging Infectious Diseases* **23**, 1699–1702.
- Weissenböck H *et al.* (2013) Usutu virus, Italy, 1996. *Emerging Infectious Diseases* **19**, 274–277.
- Ashraf U *et al.* (2015) Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses* **7**, 219–238.
- Kemenesi G *et al.* (2018) First genetic characterization of Usutu virus from *Culex pipiens* mosquitoes Serbia, 2014. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* **63**, 58–61.

30. Scheuch DE *et al.* (2018) Detection of Usutu, Sindbis, and Batai Viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in Germany, 2011–2016. *Viruses* **10**, 389.
31. Eiden M *et al.* (2018) Emergence of two Usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infection, Genetics and Evolution* **61**, 151–154.
32. Lecollinet S *et al.* (2016) Dual emergence of Usutu virus in common blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerging Infectious Diseases* **22**, 2225–2227.
33. Rijks JM *et al.* (2016) Widespread Usutu virus outbreak in birds in The Netherlands, 2016. *Eurosurveillance*. doi: [10.2807/1560-7917.ES.2016.21.45.30391](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.45.30391).
34. Michel F *et al.* (2018) West Nile virus and Usutu virus monitoring of wild birds in Germany. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **15**, 171.
35. Csank T *et al.* (2018) A serosurvey of flavivirus infection in horses and birds in Slovakia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **18**, 206–213.
36. Bażanów B *et al.* (2018) A survey on West Nile and Usutu viruses in horses and birds in Poland. *Viruses* **10**, 87.
37. Epidemiosurveillance Santé Animale (ESA) (2018) Bilan-de-la-circulation-du-virus-usutu-en-france. <https://www.platforme-esa.fr/article/bilan-de-la-circulation-du-virus-usutu-en-france-au-27-aout-2018>
38. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2018) West Nile fever in Europe in 2018. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-fever-europe-2018-human-cases-compared-previous-seasonsupdated-23>
39. Vázquez A *et al.* (2011) Usutu virus – potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveillance* **16**(31), pii: 19935.
40. Bahuon C *et al.* (2016) West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* **35**, 811–824.
41. Nikolay B (2015) A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **109**, 609–618.
42. Weissenböck H *et al.* (2002) Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerging Infectious Diseases* **8**, 652–656.
43. Buchebner N *et al.* (2013) Low Usutu virus seroprevalence in four zoological gardens in central Europe. *BMC Veterinary Research* **9**, 1.
44. Steinmetz HW *et al.* (2011) Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland – genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Veterinary Microbiology* **148**, 207–212.
45. Bakonyi T *et al.* (2007) Emergence of Usutu virus in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 3870–3874.
46. Chevalier V *et al.* (2009) Predicting West Nile virus seroprevalence in wild birds in Senegal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **9**, 589–596.
47. Becker N *et al.* (2012) Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS ONE* **7**. doi: [10.1371/journal.pone.0032604](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032604).
48. Chvala S *et al.* (2007) Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003–2005. *Veterinary Microbiology* **122**, 237–245.
49. Hubálek Z *et al.* (2014) Usutu virus in blackbirds (*Turdus merula*), Czech Republic, 2011–2012. *Transboundary and Emerging Diseases* **61**, 273–276.
50. Savini G *et al.* (2011) Usutu virus in ITALY: an emergence or a silent infection? *Veterinary Microbiology* **151**, 264–274.
51. Calzolari M *et al.* (2013) Usutu virus persistence and West Nile virus inactivity in the Emilia-Romagna Region (Italy) in 2011. *PLoS ONE* **8**. doi: [10.1371/journal.pone.0063978](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063978).
52. Bakonyi T *et al.* (2017) Usutu virus, Austria and Hungary, 2010–2016. *Emerging microbes & infections* **6**, e85.
53. Ziegler U *et al.* (2015) Epidemic spread of Usutu virus in southwest Germany in 2011 to 2013 and monitoring of wild birds for Usutu and West Nile viruses. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, NY)* **15**, 481–488.
54. Calzolari M *et al.* (2012) Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. *PLoS ONE* **7**, e38058.
55. Chvala S *et al.* (2004) Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. *Journal of Comparative Pathology* **131**, 176–185. doi: [10.1016/j.jcpa.2004.03.004](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.03.004).
56. Höfle U *et al.* (2013) Usutu virus in migratory song thrushes, Spain. *Emerging Infectious Diseases* **19**, 1173–1175.
57. Garigliany MM *et al.* (2014) Detection of Usutu virus in a bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*) and a great spotted woodpecker (*Dendrocopos major*) in north-west Europe. *Veterinary Journal* **199**, 191–193.
58. Cadar D *et al.* (2014) Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 1771–1773.
59. Gaibani P and Rossini G (2017) An overview of Usutu virus. *Microbes and Infection* **19**, 382–387.
60. Escribano-Romero E *et al.* (2015) West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Veterinary Microbiology* **176**, 365–369.
61. García-Bocanegra I *et al.* (2016) Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC Veterinary Research* **12**, 249.
62. Montagnaro S *et al.* (2018) Serological evidence of mosquito-borne flaviviruses circulation in hunting dogs in Campania Region, Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, NY)* **19**, 142–147.
63. Diagne M *et al.* (2019) Usutu virus isolated from rodents in Senegal. *Viruses* **11**, 181.
64. Vázquez González A *et al.* (2011) West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008–2009. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **85**, 178–181.
65. Ochieng C *et al.* (2013) Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya; 2007–2012. *Virology Journal* **10**, 1–10.
66. Camp JV, Kolodziejek J and Nowotny N (2019) Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus. *Parasites & vectors* **12**, 46.
67. Calzolari M *et al.* (2010) Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2009. *PLoS ONE* **5**, e14324.
68. Tamba M *et al.* (2011) Detection of Usutu virus within a West Nile virus surveillance program in Northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**, 551–557.
69. Mancini G *et al.* (2017) Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy. *Veterinaria italiana* **53**, 97–110.
70. Diallo D *et al.* (2019) Evaluation of the performance of different traps for sampling Usutu and West Nile viruses and mosquito (Diptera: Culicidae) vectors in Senegal. *Journal of Medical Entomology* **56**, 149–155.
71. Rudolf I *et al.* (2015) Co-circulation of Usutu virus and West Nile virus in a reed bed ecosystem. *Parasites & Vectors* **8**, 520.
72. Calzolari M *et al.* (2013) New incursions of West Nile virus lineage 2 in Italy in 2013: the value of the entomological surveillance as early warning system. *Veterinaria italiana* **49**, 315–319.
73. Ndiaye EH *et al.* (2018) Arboviruses isolated from the Barkedji mosquito-based surveillance system, 2012–2013. *BMC Infectious Diseases* **18**, 642.
74. Woodall J (1964) The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending December 1963. *Proc E Afr Acad* **2**, 141–146.
75. Vázquez A *et al.* (2011) Usutu virus – potential risk of human disease in Europe. *Eurosurveillance* **16**, 19935.
76. Sieg M *et al.* (2017) Outbreak and cocirculation of three different Usutu virus strains in Eastern Germany. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, NY)* **17**, 662–664.
77. Jöst H *et al.* (2011) Isolation of Usutu virus in Germany. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **85**, 551–553.
78. Puggioli A *et al.* (2017) Does *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) play any role in Usutu virus transmission in Northern Italy? Experimental oral infection and field evidences. *Acta tropica* **172**, 192–196.
79. Carletti F *et al.* (2019) Expanding Usutu virus circulation in Italy: detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. *Eurosurveillance* **24**. doi: [10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649).
80. Cerutti F *et al.* (2012) Evidence of mosquito-transmitted flavivirus circulation in Piedmont, north-western Italy. *Parasites & Vectors* **5**, 99.

81. **Pautasso A et al.** (2016) Detection of West Nile and Usutu viruses in Italian free areas: entomological surveillance in Piemonte and Liguria Regions, 2014. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **16**, 292–294.
82. **Busani L et al.** (2011) West Nile virus circulation in Veneto region in 2008–2009. *Epidemiology and Infection* **139**, 818–825.
83. **Grisenti M et al.** (2015) Wide detection of *Aedes flavivirus* in north-eastern Italy – a European hotspot of emerging mosquito-borne diseases. *Journal of General Virology* **96**, 420–430.
84. **Busquets N et al.** (2008) Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerging Infectious Diseases* **14**, 861–863.
85. **Engler O et al.** (2013) European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *International Journal of Environmental Research and Public Health Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)* **10**, 4869–4895.
86. **Nikolay B et al.** (2012) Vector competence of *Culex neavei* (Diptera: Culicidae) for Usutu virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **86**, 993–996.
87. **Fros JJ et al.** (2015) Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-Western Europe. *One Health (Amsterdam, The Netherlands)* **1**, 31–36.
88. **Cook CL et al.** (2018) North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* are competent vectors for Usutu virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **12**, e0006732.
89. **Hernández-Triana LM et al.** (2018) Assessment of vector competence of UK mosquitoes for Usutu virus of African origin. *Parasites and Vectors* **11**, 1–7.
90. **Kilpatrick AM et al.** (2008) Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathogens* **4**, e1000092.
91. **Calzolari M et al.** (2017) Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and 2014. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* **51**, 255–262.
92. **Pecorari M et al.** (2009) Rapid communications First human case of Usutu virus neuro invasive infection, Italy, August–September 2009. *Euro Surveillance* **14**(50), pii=19446.
93. **Cavrini F et al.** (2009) Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August–September 2009. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* **14**. doi: [10.2807/ese.14.50.19448-en](https://doi.org/10.2807/ese.14.50.19448-en).
94. **Cavrini F et al.** (2011) A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Virology* **50**, 221–223.
95. **Grottola A et al.** (2017) Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clinical Microbiology and Infection* **23**, 33–37.
96. **Santini M et al.** (2014) First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August–September 2013: clinical and laboratory features. *Journal of NeuroVirology* **21**, 92–97.
97. **Vilibic-Cavlek T et al.** (2019) Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the ‘One health’ context, 2018. *Transboundary and emerging diseases*. tbed.13225.
98. **Simonin Y et al.** (2018) Human Usutu virus infection with atypical neurologic presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerging Infectious Diseases* **24**. doi: [10.3201/eid2405.171122](https://doi.org/10.3201/eid2405.171122).
99. **Cadar D et al.** (2017) Blood donor screening for west Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Eurosurveillance* **22**, 3051.
100. **Bakonyi T et al.** (2017) Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – raising awareness for diagnostic challenges. *Eurosurveillance* **22**. doi: [10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644).
101. **Gaibani P et al.** (2012) Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from Northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **12**, 431–433.
102. **Aberle SW et al.** (2018) Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Eurosurveillance* **23**, 1800545.
103. **Pierro A et al.** (2013) Detection of specific antibodies against West Nile and Usutu viruses in healthy blood donors in northern Italy, 2010–2011. *Clinical Microbiology and Infection* **19**, E451–E453.
104. **Faggioni G et al.** (2018) Prevalence of Usutu and West Nile virus antibodies in human sera, Modena, Italy, 2012. *Journal of Medical Virology* **90**, 1666–1668. doi: [10.1002/jmv.25230](https://doi.org/10.1002/jmv.25230).
105. **Percivalle E et al.** (2017) Usutu virus antibodies in blood donors and healthy forestry workers in the Lombardy Region, Northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **17**, vbz.2017.2126.
106. **Cvjetković IH et al.** (2016) Seroprevalence of mosquito-born and tick-born microorganisms in human population of south back district. *Arhiv Veterinarske Medicne* **9**, 23–30.
107. **Allering L et al.** (2012) Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012. *Eurosurveillance* **17**, 20341.
108. **Barzon L et al.** (2013) The complex epidemiological scenario of West Nile virus in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **10**, 4669–4689.
109. **Nikolay B et al.** (2014) Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *Journal of Virological Methods* **197**, 51–54.
110. **Patel P et al.** (2013) Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virology Journal* **10**, 58.
111. **Vina-Rodriguez A et al.** (2017) A novel pan-flavivirus detection and identification assay based on RT-qPCR and microarray. *BioMed Research International* **2017**, 1–12.
112. **Scaramozzino N et al.** (2001) Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 1922–1927.

REVIEW

Open Access

# Neurocognitive impacts of arbovirus infections



Marion Clé<sup>1</sup>, Patrick Eldin<sup>2</sup>, Laurence Briant<sup>2</sup>, Annie Lannuzel<sup>3,4</sup>, Yannick Simonin<sup>1</sup>, Philippe Van de Perre<sup>5</sup>, André Cabié<sup>6\*</sup> and Sara Salinas<sup>1\*</sup>

## Abstract

Arthropod-borne viruses or arbovirus, are most commonly associated with acute infections, resulting on various symptoms ranging from mild fever to more severe disorders such as hemorrhagic fever. Moreover, some arboviral infections can be associated with important neuroinflammation that can trigger neurological disorders including encephalitis, paralysis, ophthalmological impairments, or developmental defects, which in some cases, can lead to long-term defects of the central nervous system (CNS). This is well illustrated in Zika virus-associated congenital brain malformations but also in West Nile virus-induced synaptic dysfunctions that can last well beyond infection and lead to cognitive deficits. Here, we summarize clinical and mechanistic data reporting on cognitive disturbances triggered by arboviral infections, which may highlight growing public health issues spanning the five continents.

**Keywords:** Arbovirus, Nervous system, Long-term sequelae, Cognition

## Background

Neurological sequelae, including cognitive deficits, are emerging as potential long-term impairments associated with some arboviral infections. Among emerging viruses, some arboviruses are able to reach the central nervous system (CNS) and cause neuropathology. Accumulating evidence highlighted by follow-up studies is now showing that neurological symptoms such as memory, behavior, and other psychomotor deficits are found in patients, months after the initial infection and decrease in some cases their quality of life. The aim of this review is to provide a comprehensive view of the neurological impairments found in some arbovirus infections that can have long-lasting effects, and to correlate these observations with molecular and cellular studies aiming to decipher the effects of CNS arbovirus interaction.

## Introduction

Accumulating evidence illustrate now the fact that neurotropic viruses have developed numerous strategies to invade the brain and, depending on the mode of entry, cellular tropism and mechanism of infection, trigger a wide range of neuronal symptoms, which can lead in some cases to severe cognitive impairments [1–3]. Once in the brain, altered neuronal homeostasis triggered by long-term inflammatory microenvironment and/or viral replication can have dramatic effects and lead to cognitive disorders [1, 3, 4]. For example, around 50% of human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients are suffering from mild to severe neurological impairments in a syndrome called HIV-associated neurocognitive disorder (HAND) consisting of a range of cognitive deficits such as memory and attention disorders, motor and sensory impairment, mood and behavior changes and, in some extreme cases, dementia or HAD (HIV-associated dementia) [5]. HIV nervous system infection may also be linked to the etiology of some brain disorders such as amyotrophic lateral sclerosis [6] or Alzheimer's disease (AD) [7]. Another example is found among members of the *Herpesviridae* family, such as

\* Correspondence: [andre.CABIE@chu-martinique.fr](mailto:andre.CABIE@chu-martinique.fr); [sara.salinas@inserm.fr](mailto:sara.salinas@inserm.fr)

<sup>6</sup>INSERM CIC 1424, Infectious Disease and Tropical Medicine Unit, Martinique University Hospital, Université des Antilles EA4537, Martinique, France

<sup>1</sup>Pathogenesis and Control of Chronic Infections, INSERM, University of Montpellier, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

cytomegalovirus (CMV), which can be associated with neurodevelopmental defects, as well as herpes simplex virus 1 (HSV-1), which induces latent infection in the nervous system and in some cases can trigger encephalitis when reactivated. Notably, both viruses were found to induce significant cognitive impairment in the general population [8] and were also proposed to be involved in the etiology of AD [9, 10]. “Hit and run” mechanisms leading to progressive neuronal pathology may be also considered, such as subacute sclerosing panencephalitis, a rare progressive neurological disease caused by complications associated with measles virus infection, which can have major impact including behavioral impairment cognitive decline and seizures [11].

Due to its peculiar architecture, the central nervous system (CNS) is relatively protected from toxic and pathogenic factors that can be found in the blood, and in this light, it is considered as immune-privileged. This however does not exclude that some toxins, viruses, bacteria, or parasites can access this organ and cause mild to severe impairment. This can be done directly through pathogen-mediated effects on neurons, or indirectly through inflammation-associated mechanisms when glial cells are affected for instance. To reach the central and peripheral nervous systems (PNS), pathogens have been selected throughout evolution for their ability to interact with various barriers and machineries [12, 13]. Notably, the blood brain barrier (BBB) is a tight endothelium that physically separates systemic circulation from the parenchyma. It is formed by closely interacting cells, which form the neurovascular unit (NVU): vascular endothelial cells that actually form the barrier, pericytes, astrocytes, and neurons (Fig. 1) [14]. Endothelial cells are closely interacting through tight and adherens junctions (TJ and AJ respectively), which ensure the (relative) impermeability of the barrier, although anatomical sites, such as the choroid plexus (CP), are more vulnerable due to their loose inter-endothelial cell junctions. Selective passage nevertheless exists as small lipophilic molecules, cytokines, and cells of the immune system can cross the BBB using different mechanisms such as transcytosis through receptor-mediated endocytosis, transport with efflux/influx pumps, transcellular lipophilic pathways, and transcellular diapedesis [15]. Direct infection of endothelial cells can also provide viral access to both sides of the barrier. Numerous viruses have been shown to directly and/or indirectly (*e.g.*, through infection of cells of the immune system, a mechanism called “the Trojan horse”) cross the BBB [16–19] (Fig. 1).

Many arboviruses (for arthropod-borne viruses), the majority of which are responsible for acute infections, can also access the CNS and infect a variety of cell types [20]. Because encephalitic arboviruses encompass numerous viruses belonging to various families, one cannot

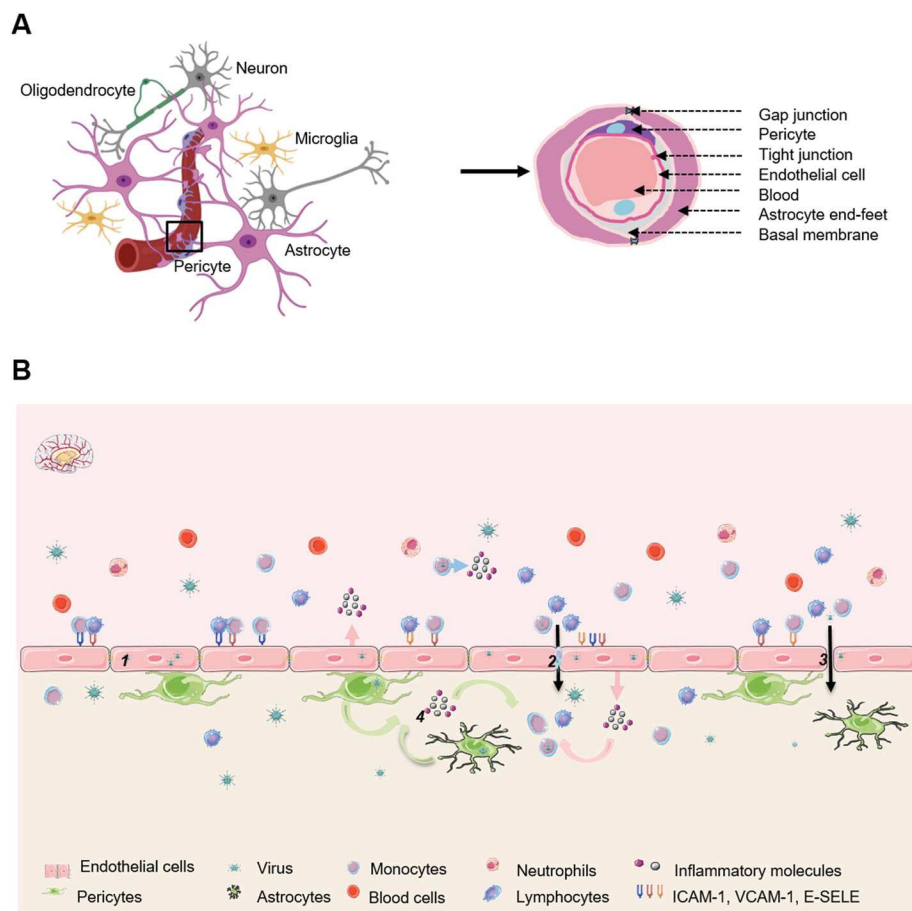
tend to generalize the (neuro) pathologies associated with these infections. However, these viruses are in the vast majority ribonucleic acid (RNA) viruses and transmitted by vectors such as mosquitoes, ticks, and sandflies during blood meals to a range of host including humans [21]. The replication cycle of arboviruses generally occurs in wild hosts such as birds and mammals. Vectors are then responsible for spreading infection among hosts in what is called an enzootic cycle [22]. In some situations, vectors can transmit viruses to animals that are not the natural host (*i.e.*, do not replicate the virus), which are called accidental or dead-end hosts. This is the case for example for horses and humans following West Nile virus (WNV) or Usutu virus (USUV) infections [23, 24]. Some arboviruses such as dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV), and chikungunya virus (CHIKV) are less relying on viral amplification in wild animals and can be transmitted to humans during an urban cycle, and therefore are found associated with major epidemic outbreaks [21, 22]. Arboviral CNS infections can happen with a wide range of arboviruses including WNV, ZIKV, CHIKV, USUV, and Japanese encephalitis virus (JEV) among others, and cause diseases such as meningitis, encephalitis, meningoencephalitis, myelitis, and acute paralysis [20, 25]. Because arboviral infections were mostly seen as acute, neurological symptoms, with the exception of neurodevelopmental impairment, were also largely reported on a short-time range. The recent ZIKV epidemic and the congenital syndromes associated (*e.g.*, microcephaly [26]) suggest however that arboviral infections may have long-lasting effects on the nervous system. We review here the clinical and basic studies aiming to characterize the long-term effects of arboviral infections, in particular regarding cognitive performance.

### Acute and long-term cognitive deficits in arbovirus infections—a clinical perspective

#### *Arboviral infections and symptoms*

Clinically, arboviral infections are acute (viremia is typically few days long) and most frequently asymptomatic (60–80% of patients) or trigger flu-like symptoms resulting in febrile state, mild to important fever, and, depending on the virus, can be accompanied by rash, conjunctivitis, myalgia, and cephalic pains [22]. In rare cases, severe symptoms such as hemorrhagic fever (*e.g.*, for DENV and Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHMV) infections) or neuropathology (*e.g.*, for WNV, Toscana virus, JEV, USUV, ZIKV...) can be found associated with arboviral infections. During epidemics however, even “moderate” symptoms (which still necessitate hospitalization) can be of a great burden, as it was well illustrated during the 2005–2006 CHIKV epidemic in the French island of La Réunion, which affected up to a third of the population and had a huge cost for the society [27, 28], or with DENV, which is





**Fig. 1** The NVU and pathways of CNS viral entry through the BBB. **a** The NVU is formed by astrocyte end feet, perivascular microglia, neurons, as well as brain pericytes, which are embedded in the basement membrane and envelop the endothelial cells lining cerebral capillaries. **b** Description of possible mechanisms of CNS virus through the BBB. (1) Direct infection of endothelial cells that release viruses in the brain. (2) Infection of monocytes infiltrating the CNS by the Trojan horse mechanism. (3) Infection of endothelial cells that disrupt the BBB by the release of inflammatory mediators. (4) CNS cells participate in the disruption of CNS homeostasis by producing inflammatory molecules and allowing the recruitment of immune cells. Images created with BioRender.com and SMART- Servier Médical ART

present in 130 countries and put up to 2.5 billion people at risk each year [29]. This is particularly relevant for endemic arboviruses, which should be closely considered by clinicians [30], but given the current globalization of travelers and merchandises, as well as climate change, it is more than likely than emerging and reemerging viruses will found “new” or naïve territories, similarly to what happened for ZIKV in South America or CHIKV in America [31, 32].

Moreover, long-term sequelae (lasting from weeks to years) can be found occurring after arboviral infections in some cases [33] (Table 1). CHIKV infections have been linked to lasting arthralgia and arthritis, among other symptoms, which directly impact the quality of life [68, 80, 81]. Ocular complications, reported for several arboviruses including WNV, CHIKV, DENV, and ZIKV among others, are often associated with long-term impairment [33, 43]. For instance, in ZIKV-infected adult patients suffering from visual impairment in the acute

phase of infection, follow-up studies showed partial recovery as permanent lesions due to ZIKV infection may be likely to persist [82, 83]. Recent data also point that ZIKV can persist in various body fluids for weeks to months, switching the paradigm of seeing (some) arbovirus infections as acute, towards more persistent or long-term infections [46, 84].

#### **Arboviral infections and neuroinflammation**

More worrying however, are the neurological impairments that can be directly triggered by arboviruses, both from congenital and adult infections (Table 1). CNS pathology during arbovirus infection can be due to direct neuronal infection, but also from indirect effects due to global neuroinflammation and post-infectious mechanisms that can occur in distinct anatomical regions. Regarding the brain, while inflammation isolated to the meninges triggers meningitis, viral replication in the brain

**Table 1** Neurological disorders associated with arboviral infections

Virus	Neurological disorders	Long-term sequelae in children and in adults	References
WNV	Encephalitis, meningitis, meningoencephalitis, and acute flaccid paralysis	Neurological sequelae, confusion, seizure, memory impairment, speech disability, depression, and ocular complications	[34–42]
DENV	Encephalopathy, meningitis, stroke, cerebellar syndrome, myelitis, and guillain-barré syndrome	Neurological sequelae, mood-, personality-, behavior- disorders, and ocular complications	[29, 43–45]
ZIKV	Meningoencephalitis, guillain-barré syndrome, microcephaly, and congenital Zika syndrome	Mental retardation, seizure, epileptic behavior, communication-, social cognition-, and mobility-abnormalities, autism spectrum disorder, intellectual disability, memory and learning deficits, and ocular pathology	[46–62]
JEV	Encephalitis, aseptic meningitis and acute flaccid paralysis	Motor and language deficit, learning difficulties, behavioral problems, mental retardation, neurological-, neuropsychiatric-, and cognitive sequelae	[63–67]
CHIKV	Encephalitis, myelopathy, neuropathy, myeloneuropathy, myopathy, and paralysis	Arthralgia, arthritis, neurological sequelae, cognitive disturbance, and ocular complications	[68–73]
TBEV	Encephalitis, meningitis, meningoencephalitis, and myelitis	Cognitive sequelae, behavior-, memory-, and language- dysfunctions	[74–77]
EEEV, WEEV	Encephalitis	Seizures, cognitive defects, psychiatric illness, motor dysfunction, behavioral impairments, and intellectual impairment	[78, 79]

parenchyma results in encephalitis. Aseptic meningitis is classically defined as non-bacterial inflammation of the tissues lining the brain. Any inflammation or pathology that also involves the parenchyma is referred to as meningoencephalitis. “Neurotropic” (*i.e.*, able to reach the CNS) arboviruses are classically associated with encephalitis [63, 78, 85–87] but can also cause meningitis, for instance in infections by St. Louis encephalitis virus (SLEV) [88], tick-borne encephalitis virus (TBEV) [89], DENV [90], WNV [91], CHIKV [92], ZIKV, Powassan virus (POWV), and Eastern Equine encephalitis virus (EEEV) [93]. During Toscana virus meningitis, serum levels of IFN- $\alpha$ , IP-10, and eotaxin are significantly increased in the acute phase of infection in comparison with healthy controls [94], which could participate to an ensuing CNS infiltration of neutrophils, monocytes, and antiviral CD8<sup>+</sup> lymphocytes. In patients suffering from encephalitis or meningoencephalitis due to WNV, perivascular and meningeal inflammation is found, both in the brain and in the spinal cord, which is associated with seizures and paralysis [20]. This illustrates the potential neuroinflammation found in some arboviral infections, which can cause acute and long-term neurological impairments [95].

#### ***Congenital and pediatric arboviral infections and neurodevelopment***

Congenital arbovirus infections have been particularly reported for ZIKV, mostly due to the extent of the epidemic [47]. In this setting, microcephaly (which results in a decrease in head circumference and brain growth) and other cerebral malformations (called altogether congenital Zika syndrome or CZS) have been consistently reported

throughout the American continent, but also elsewhere in the globe [47–51]. Moreover, retrospective studies in past epidemics, such as the one from French Polynesia, showed indeed that microcephaly and cerebral malformations were associated with ZIKV infection [52, 53]. Lissencephaly (malformation in the cortical structures of the brain) has also been reported in ZIKV-infected infants, which could result in mental retardation in affected children [54]. Importantly, there are now follow-up studies showing the effects from ZIKV-associated brain malformations or subtler damages. Such studies in infants with CZS confirmed strong neurological disabilities, in particular ocular and motor impairment, as well as epileptic manifestation [48, 55–60]. A study assessed over 1400 children of at least 1 year of age born from ZIKV-infected mothers and showed important rates of neurodevelopmental defects (up to 14% with seizure or, neurodevelopmental delays) [61]. Report on more than 200 children born from ZIKV-infected mothers in the region of Rio de Janeiro also showed important neurodevelopmental, including cognitive, impairment in around 30% of patients 2 years after birth [62]. The microcephaly status was shown to be altered in some children, either resolving or appearing [62]. Appearance or further development of neurological impairments can be also occur, consistent with observations that ZIKV can persist in infants after birth for a period of months (which is adding from the several weeks of ZIKV infection *in utero*) [54].

However, other arboviruses have been reported to be associated with pediatric and/or congenital neuronal disorders, in particular DENV [44], CHIKV [80, 69], and rarely WNV [96]. CHIKV infection is now well

established as triggering serious neurological sequelae, particularly in children [70, 71]. Vertical transmission has been documented in several studies and highlights the risk of congenital infection associated with this virus [71–73]. Neurocognitive outcome of a La Réunion cohort of 33 CHIKV-perinatal exposed infants showed neurodevelopmental delays in around 50% of children compared to controls [69]. Cases of encephalopathy, microcephaly, and cerebral palsy were also described, some of them not detectable at birth and developing afterward, similarly to ZIKV-infected children [69]. Moreover, in a cohort of 87 children CHIKV<sup>+</sup> (CHIKV RNA found in cerebrospinal fluid (CSF)) (55 infants less than 1 year old with an acute infectious syndrome and 32 children 2 to 10 years old with a convulsive attack or encephalopathy), evaluated 3.5 to 4.5 years after acute chikungunya, 20% of children presented developmental delays including cognitive impairment (our unpublished data).

Infants and children are also particularly at risk for DENV infection, potentially with severe forms [29]. Among these disorders, severe encephalopathy can be found (e.g. [45, 90],) but no long-term follow-up that suggests potential cognitive sequelae was reported as far as we know. This would definitely need to be addressed as DENV affects hundreds of thousand persons each year. Noteworthy, Rift valley fever virus (RVFV) is associated with vertical transmission and fetal demises in animals and with neurological and ocular impairment in humans [97]. Its epidemic potential is strongly considered as the WHO classified it as “severe emerging disease with potential to generate a public health emergency, and for which no, or insufficient, preventive and curative solutions exist” and is reported as a category A priority pathogen [98]. Rare human vertical transmission have been reported, one of which resulted in infant death within a week [99]. Whether this is due to intrinsic properties of the virus (see below) or of poor surveillance diagnosis needs to be characterized. WNV vertical transmission does not seem a common feature but infections in children occur regularly [100]. These infections can give rise to meningitis, encephalitis, and acute flaccid paralysis, the latter of which can cause long-lasting disabilities but, curiously, neuroinvasive disease in children is less frequently found than in adults [100]. TBEV can also affect children but, similarly to WNV, infections are in general milder than in adults [74]. However, European cohort’s studies in children demonstrate important rate of neurological and cognitive sequelae after TBEV infection [74, 75]. In the same light, other arboviral infections such as JEV or La Cross Virus (LACV) in children may be associated in some cases with neurological and cognitive sequelae [63, 87]. In a follow-up study over 2 years post-JEV

infection in children showed mental retardation in over 20% of patients [64].

Altogether, these observations highlight the existence of potential risks associated with arboviral infections during pregnancy or in early life for child neuronal development [101]. In this context, it was also discussed that the neurodevelopmental defects associated with ZIKV infection *in utero* could potentially favor autism spectrum disorder [102]. Moreover, generally infectious encephalopathies in children represent important risks to develop neurological and cognitive sequelae [103], suggesting that arboviral infections in children may have severe consequences for the neuronal health of the individuals.

#### ***Arboviral infections and acute and long-term cognitive impairment in adults***

Encephalitis, meningitis, and other neuronal complications following arboviral infections are also found in adults, with sometimes long-term cognitive impacts. In particular, neurological sequelae have been well described in WNV adult patients [34–39]. For instance, in a 1-year post-infection follow-up study of WNV patients who were diagnosed neuroinvasive disease, several neurological sequelae were reported including memory impairment, speech disability, and depression [34]. Similarly, mental health and social functioning were altered in some Canadian neuro-WNV patients in a 2-year follow-up study [40] and in another 2 to 4-year follow-up study [41]. Moreover, in 1–3 and 8–11 year follow-up study of the Houston West Nile Cohort, new neurological symptoms developed in some patients, highlighting the need to closely monitor post-encephalitic patients [42]. Similarly, the highly neurotropic JEV when infecting adults also led to significant increase in cognitive and behavior impairment in patients several years post-infection [65]. A prospective study of over 1300 Indian adult patients initially diagnosed with JEV infection highlighted the potential risk to develop neurological and cognitive sequelae after JEV infection: the authors showed in these patients of four epidemics between 1978 and 1989, neuropsychiatric and neurological sequelae at the time of discharge [66]. Some of these patients were then enrolled in follow-up studies (up to 14 years) that showed important neuronal sequelae including corticospinal impairment such as hyperkinetic movement and dystonia and seizures [67]. Psychiatric and psychological disturbances were also observed as long lasting: some patients were reported even though some recovery occurred [67]. Intellectual disability, memory, and learning deficits were also seen in a small proportion of patients [67].

Cognitive sequelae are also clearly associated with TBEV infection in adults; here, it can sometime be associated with neurological symptoms such as meningitis, encephalitis, and meningoencephalitis. Long-term

follow-up studies highlighted the risk for cognitive sequelae: for instance, in a study following 36 Polish farmers diagnosed with TBEV infection during the 1994–2001 period, the authors reported cognitive impairment related to the pre-dementia stage of AD or memory and language dysfunction [76]. Similarly, in a Scandinavian adult cohort of 96 TBE patients, cognitive disorders such as changes in behavior and learning disabilities were reported in a follow-up study 2 to 15 years post-infection [77]. CHIKV can also lead to neurological disorders in adults, mainly encephalitis but also acute paralysis [71]. Importantly, neurological sequelae, including cognitive disturbance were found in adults who developed at the time of infection CNS disorders in a 2-year follow-up examination [85]. Albeit neurological complications associated with ZIKV infections have been mainly described in pediatric cases, adults can also develop brain disorders [104]. For instance, behavioral changes were observed up to 15 weeks in a ZIKV-infected teenager [105].

Exposure to other emerging neurotropic arboviruses can have long-term deleterious effect on mental health as illustrated by a case of a 73-year-old patient infected with California Serogroup Virus who developed post-encephalitic dementia and was transferred to a nursing home [106]. More than 6 months post-infection, the patient still scored low on a mental state examination (11/30) [106]. Evenly worrisome, a follow-up study concerning Murray Valley encephalitis virus showed that even in patients discharged without evident sequelae, long-term cognitive disturbance such as depression and cognitive dysfunction were reported [107]. Alphaviruses have also been associated with neuronal impairment with long-term effects. Eastern, Western, and Venezuelan Equine encephalitis virus (EEEV, WEEV, VEEV) human infections have also been described, some of which led to cognitive sequelae [78, 108, 109]. Outbreaks of WEEV in the USA and in Canada in the 40–50s were proposed to be associated with important neuronal sequelae including behavioral impairments [79, 110]. Follow-up studies of later WEEV outbreaks showed that some children and adult suffered from intellectual impairment [108].

#### **Impairment of neuronal functions by arboviruses—molecular and cellular mechanisms**

Cognitive deficits can stem from different mechanisms, whether from impairment of neuronal development, neuronal dysfunction from a direct impairment of neuronal homeostasis (e.g., direct neuronal infection and function perturbation), or through indirect effects mediated by inflammatory molecules released by infected glia or immune cells. To understand the interaction and its effects between arboviruses and the nervous system, numerous studies aimed at characterizing the effect of

infections on brain development, CNS entry mechanisms, and the cellular and molecular effects associated with brain infection and neuroinflammation.

#### **Mechanisms of neuronal development modulation by arboviruses**

Studies in animal models clearly showed that *in utero* or early post-natal ZIKV infections may have deleterious effect on neurodevelopment and trigger cognitive disorders in growing mice [111–113]. Importantly, ZIKV has been shown to potently cross the placenta using several mechanisms including infection of trophoblasts in the placenta, which further allow spread in the fetal nervous system [114].

Further studies showed that other arboviruses can infect human placenta and could be associated with fetal demise in animal models: a study showed that in human placental explants ZIKV, WNV, Mayaro virus (MAYV), and POWV, but not CHIKV, were able to replicate within different components of the tissue [115]. Similarly, RVFV can cross rat placenta and trigger deleterious effects on developing embryos [116]. Importantly, high viral load was detected in the pup brains [99]. Moreover, human placenta explants were also found permissive to RVFV replication [116], confirming the observations of human vertical transmission [99].

Numerous studies showed potent ZIKV infection of neuroprecursors and important neurodevelopmental defects (e.g. [117]). This infection is deleterious for the subsequent neuronal differentiation and the establishment of synapses [118]. Globally, *in utero* ZIKV infection led to cortical thinning resulting from neuronal growth defect and neuronal death [119]. This was accompanied by a reduction in neuronal network, suggesting important neurodevelopmental defects in developing animals, consistent with cognitive disturbances observed [112, 120]. Cell cycle dysfunction has been linked with ZIKV infection of neuroprogenitors [119, 121–123], which is likely to explain effects in neuronal differentiation and apoptosis as progenitor division is strictly necessary for neurogenesis. Due to extensive research following ZIKV epidemic and with the above observations in mind, researchers and clinicians agree around a consensus regarding the cause of ZIKV-mediated microcephaly: potent infection of neuroprogenitors, coupled with cell death, differentiation, and neuronal network impairment are believed to be responsible for this congenital brain development disorder [124]. Regarding effects on the developing brain, much less data is available for other arboviruses. Similarly, JEV impairs subventricular zone neuroprogenitor proliferation and cell cycle progression through modulation of checkpoint proteins in wild-type (WT) mouse pups and *in vitro* [125]. Surprisingly, albeit clear

neurodevelopmental and cognitive impairment have been shown in CHIKV-infected children [69], very little information is found on the physiopathology associated with these effects, albeit it was hypothesized that CHIKV could target neural progenitors and affecting neurogenesis [126]. Even though rare cases of congenital infections have been reported with WNV, *in utero* infection in a mouse model showed effect on brain development [115]. These studies corroborate observations in arboviral congenital or perinatal infections and their effect on neurodevelopment and cognitive functions.

#### **Mechanisms of arbovirus brain access**

To reach the adult CNS, neurotropic arboviruses use different mechanisms at the BBB such as direct viral infection of brain vascular endothelial cells or using cells of the immune system (“Trojan horse” pathway) [127]. It was proposed that WNV enters the CNS by infecting monocytes, dendritic cells, or macrophages that naturally cross the BBB [128, 129]. Similarly, JEV and DENV have been shown to use such pathways [127]. Direct infection of endothelial cells may have different outcomes for viral access: some viruses such as ZIKV may not have important effect on BBB integrity but can be released through the basolateral compartment and reach the CNS [130]. Others may have more potent effects on BBB permeability through production of inflammatory cytokines, which can modulate BBB integrity. For instance, WNV by infecting directly brain vascular endothelial cells will lead to the production of inflammatory molecules that will disrupt BBB integrity and further allow virus CNS access through the Toll-like receptor (TLR)-3 response and tumor necrosis factors alpha (TNF- $\alpha$ ) secretion, resulting in a transient change BBB permeability [131]. DENV can directly infect human microvascular endothelial cells and induce cell apoptosis [132]. Moreover, modulation of TJ and AJ protein expression by arboviruses can also occur and increase viral and immune cell CNS access by paracellular pathway [133]. Studies also showed that neurotropic arboviruses can upregulate cell adhesion molecules in brain vascular endothelial cells, which in turn favor leukocyte recruitment and CNS invasion [134, 135]. Furthermore, some arboviruses can invade the brain at the blood-CSF interface [136–138]. Some flaviviruses are able to use the olfactory pathway to enter the CNS such as Murray Valley encephalitis virus and Saint Louis encephalitis virus. Others will use retrograde axonal transport to access it using peripheral nerves such as WNV [139–141].

#### **Arbovirus and interaction with the neurovascular unit**

Once in the brain, neurotropic arboviruses can also infect others types of NVU cells such as pericytes, astrocytes, neurons, and microglia and lead to general neuroinflammation

and BBB impairment [14, 142]. Because astrocytes are mediators of neuroinflammation, these infections may further impair BBB homeostasis [143] and disrupt neuronal viability and induce cognitive dysfunction [144, 145]. Astrocytes can be infected by numerous arboviruses such as TBEV, WNV, ZIKV, and JEV [146]. In this context, WNV-infected astrocytes have been shown to secrete various inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase (MMP), which will lead to BBB disruption [147, 148]. ZIKV-infected human astrocytes produce pro-inflammatory cytokines that induce neuroinflammation [149] and in mouse embryo brain, astrocytes-infected ZIKV induce progressive astrogliosis, which disrupts BBB properties and function [119]. Similarly, astrocytes infected with JEV lead to secretion of MMP, interleukin (IL)-6, and vascular endothelial growth factor (VEGF) and led to BBB destabilization [150]. JEV-infected astrocytes also led to an increase of the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10) production, which modulates the migration of natural killer (NK) cells and monocytes into the CNS [151]. Moreover, arbovirus infection of astrocytes often results in the production of cytokines such as IL-6, TNF- $\alpha$ , or IL-1- $\beta$ , which have been shown to modulate BBB permeability by several mechanisms, including downregulation or relocalization of junction proteins such as occludin and zona occludens (ZO)-1 [147, 152–154]. The NVU is also composed of pericytes, which support BBB homeostasis and function, and are emerging as key regulators in neuroinflammation [155, 156]. JEV, WNV, and ZIKV have been shown to target pericytes. JEV-infected pericytes in turn induce a degradation of TJ proteins such as zonula occludens (ZO)-1 protein and an upregulation of ubiquitin E3. Moreover, JEV-infected pericytes produce IL6, which disrupted the integrity of endothelial barrier [157, 158]. Noteworthy, the BBB is also impaired during congenital infection as *in utero* ZIKV infection in mice led to abnormal vasculature, which triggered BBB leakage [119].

Arboviral interaction/modulation with the NVU may have important and potentially long-term effects as BBB and vasculature impairment are associated with cognitive disturbance either in an acute fashion, or in a long-term manner, for instance in aging [14]. Neurodegenerative disorders such as AD are multifactorial. In this context, vascular impairment has been proposed to contribute to the etiology of such diseases [14, 159]. BBB dysfunction, coupled to pericyte degeneration may provoke toxic accumulation in the brain and neuronal dysfunction [14]. Similarly, repeated BBB injuries have been proposed to trigger neurodegeneration and neurocognitive dysfunction [160, 161].

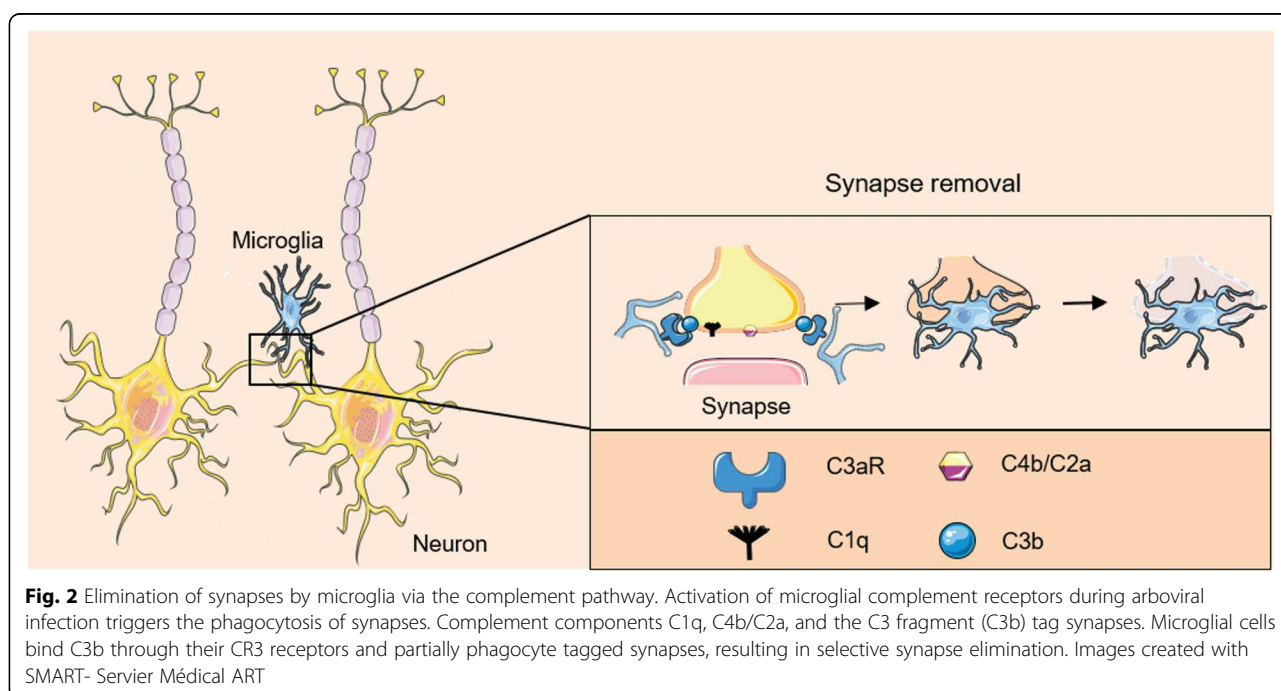
#### **Arbovirus and modulation of synaptic function**

Some studies aimed to address synaptic homeostasis both during and after arboviral infections using animal

models, which allow testing for cognitive disturbance. Cognition is a complex and multifactorial mechanism, whereupon synaptic plasticity plays a central role. This is occurring early in development when synaptogenesis and maintenance are taking place, and during adulthood with a balanced regulation of synapse formation and removal, collectively termed synaptic plasticity [162]. To these mechanisms can be added adult neurogenesis, in particular in the hippocampus, where new neurons are constantly generated and integrated in existing circuits to modulate learning and memory mechanisms [163]. In the context of arboviral infections, mature neurons can be directly infected by some arboviruses including ZIKV, WNV, TBEV, and JEV among others [139, 164–166]. For instance, ZIKV has been shown to replicate in mature neurons *ex vivo* in human cortex and *in vivo* in mouse models [165]. However, synaptic plasticity does not only involve only neurons but also interactions with glial cells such as astrocytes and microglia [162]. Microglia are key regulator of neurodevelopment, neuroinflammation, and BBB integrity [167]. An important mechanism involved in cognition is microglia-dependent synaptic removal, which allows synapse remodeling called synapse pruning [167]. This mechanism, when exacerbated, can cause cognitive dysfunction [168, 169]. In an infection paradigm, activated microglia can be directly associated with neurodegeneration and cognitive defects [170].

Microglia infection/modulation has been described in several cases: ZIKV can lead to a potent inflammatory response in human fetal brain microglia [171]. JEV and DENV have also been shown to target microglia, which

induce inflammatory environment [172, 173]. Using the rat as an animal model, authors showed that JEV led to behavioral changes including memory impairment that could be correlated with a decrease in the synaptic protein choline acetyl transferase (ChAT), a marker of dopaminergic neuron function [174]. Microglia-dependent synaptic pruning has been proposed as a potential mechanism underlying neurocognitive impairment in patients recovering from WNV neuroinvasive disease. Indeed, observations in mice infected with a WNV mutant NS5 (E218A) suggest that the complement components (C3 and C3aR) mediate presynaptic terminal loss in the hippocampi of mice that exhibit spatial learning defects during recovery from neuroinvasive disease [175] (Fig. 2). Microglia and recognition of C3 cleavage products by the complement receptor C3aR were shown responsible for this process [175]. Indeed, disease-recovered animals (who survived the neuroinvasive disease) showed learning deficits that were mirrored by the presence of engulfing microglia at synapses in the hippocampus. In particular, synaptic terminal of the C3 regions were reduced both in animal models and in biopsies of human patients [175]. Furthermore, in adult mice that recovered from WNV and ZIKV infections, activated microglia through the release of interferon (IFN)- $\gamma$  from infiltrating T cells were responsible of synaptic removal without repair in the case of WNV, and with associated neuronal apoptosis for ZIKV [176, 177]. It was proposed that CD8<sup>+</sup> T cells, through the release of inflammatory molecules and microglia activation and subsequent



synaptic removal, were participating in the establishment of post-infection cognitive sequelae [176]. In another study, ZIKV replication in the hippocampus was shown to lead to the inhibition of long-term potential, a key mechanism regulating cognitive process such as memory [165]. The authors demonstrated the presence of activated microglia in close proximity to synaptic terminals and memory impairment in infected mice [165].

Some studies also point towards the modulation of adult neurogenesis by some arboviruses. During the acute phase of WNV infection, myeloid cell-derived IL1 alters the proliferation and differentiation fates of neural progenitor cells, leading to a shift from neurogenesis to astrogenesis [178]. Data indicate that the combinatorial effect of synapse loss and reduced neurogenesis can negatively impact hippocampal spatial learning and memory long beyond the initial episode of infection via a shift in sources of cytokines cells [178]. ZIKV-infection on human astrocytes led to disruption of pathways and cellular protein levels involved in synaptogenesis axonal guidance signaling [179]. This could also participate to ZIKV-induced impairment of neuronal circuits and network development [179]. ZIKV also targets adult neuroprogenitors and was shown to alter hippocampal neurogenesis by inhibiting neuroprogenitor development [180]. The modulation of adult neurogenesis, for instance during inflammatory process, has been clearly linked to cognitive disturbances [181]. Whether modulation of adult neurogenesis is a process commonly find in arboviral brain infection still remained to be addressed but could contribute, partly, to acute and potentially long-term cognitive impairment.

#### **Modulation of the neuro-epigenome by arboviruses**

Another crucial mechanism in brain development and maintenance and associated cognitive functions, are the regulation of neuroepigenetic modifications [182, 183]. The ability of some arboviruses to establish productive infection in brain cells, to evade their antiviral responses, and to impair neurodevelopment and neuronal homeostasis relies on their intrinsic capacity to evolve complex and multifaceted modes of interactions with their various cellular hosts. Among these modes of virus-host relationship, manipulation of the viral and cellular epigenome and epitranscriptome during infection has recently appeared as a complex and dynamic landscape of deoxyribonucleic acid (DNA) and RNA “decorations” that can be hijacked by arboviruses to promote their replication and could also participate to neuropathogenesis and long-term defects. ZIKV has been shown to alter the DNA methylome of neural progenitors, astrocytes, and differentiated neurons at genes that have been implicated in the pathogenesis of a number of brain disorders, most prominently mental retardation, autism,

and schizophrenia [184]. The virus-mediated alteration of gene and gene products of DNA modifiers involved in the control of the dynamic cycle of methylation/demethylation of cytosine is currently investigated [185, 186]. These studies might reveal how arboviruses may take over the dynamic C/5mC/5hmC switching process known to be critical for normal brain development and neuronal functions [187]. Manipulation of the viral and cellular epitranscriptome by positive-sense RNA viruses during infection may also control cellular and viral RNA stability and translatability drive subversion of the host and evasion of cellular surveillance systems [188, 189], preferentially promoting viral RNA translation, and eventually facilitating viral production. RNA modifications, including several nucleoside methylations, have long been known to be essential in the proper function of transfer (t)RNA and ribosomal (r)RNA. Recent analysis of RNA post-transcriptional modifications (PTMs) in the context of arboviral infections has underscored their complex and dynamic nature on either cellular or viral RNAs. In infected target cells, erasure of N6-methyladenosine (m6A), the most abundant modification of messenger (m)RNA, was shown to be profitable for particle production for several flaviviruses including hepatitis C virus (HCV) and ZIKV [190, 191]. In contrast, Flaviviridae infection has recently been shown to increase the expression of specific cellular factors (such as R1OK3 and CIRBP) that turned to enhance viral infection, through the modification of the m6A levels on their corresponding mRNAs [192]. Moreover, virus-specific PTMs (such as dimethylcytosine species m5Cm and m44C) were only present in the ZIKV and HCV RNA genomes isolated from virions and enhanced viral replication through the recruitment of the nuclear DEAD-box containing RNA helicase DDX6 [193]. In addition, members of the IFIT family of antiviral RNA-binding proteins restrict infection by cytoplasmic RNA viruses through their ability to strongly bind 5' capped non-self mRNAs (cap0) thereby preventing their translation. Alphaviruses antagonize IFIT1 function directly by inhibiting association with viral RNA through the generation of stable secondary structures in the 5'-UTR (untranslated region) [194]. The control of RNA PTM could therefore play a critical role in the ability of RNA viruses to escape innate antiviral responses.

The remarkable diversity of PTMs that have already been identified on both cellular [192] and viral RNAs [193] suggests not only very broad functional consequences, but also the likelihood that the high degree of modification of the PTM landscape induced by RNA viruses, illustrated by the Zika-induced alteration of m6A topology in host mRNAs, may have deleterious effects on a wide range of mechanisms involved in the development and control of cognitive function.

## Conclusions

Acute or chronic neuroinflammation is emerging as a key mechanism in various neuronal disorders [95, 195]. Viruses are now strongly considered as potential environment factors favoring the onset of brain diseases. For instance, viral “hit and run” occurring during pediatric Measles infection can be linked with the appearance of neuronal disorders few years after the initial infection [11]. In this context, arboviral infections may have long-lasting effects on the nervous system, as a result of the direct interaction of viruses with cells of the brain, or, indirectly, because of the neuroinflammatory status found associated with the infections. However, the mechanisms underlying potential viral persistence and the contribution of neuroinflammation to CNS pathophysiology are unclear. Notably, other environmental factors such as toxins and chemicals are now well linked to neurological diseases. Among these multifactorial causes, one has to consider the burden of arboviral infections, in particular in endemic regions where annual epidemics are occurring. Cohort studies are still highly needed, in particular to study long-term sequelae.

## Abbreviations

AD: Alzheimer’s disease; AJ: Adherens junctions; BBB: Blood brain barrier; CCHMV: Crimean-Congo hemorrhagic fever virus; ChAT: Choline acetyl transferase; CHIKV: Chikungunya virus; CMV: Cytomegalovirus; CNS: Central nervous system; CP: Choroid plexus; CSF: Cerebrospinal fluid; CXCL10: Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; CZS: Congenital Zika syndrome; DENV: Dengue virus; DNA: Deoxyribose nucleic acid; EEEV: Eastern Equine encephalitis virus; HAD: HIV-associated dementia; HAND: HIV-associated neurocognitive disorders; HCV: Hepatitis C virus; HIV: Human immunodeficiency virus; HSV-1: Herpes simplex virus-1; IFN: Interferon; IL: Interleukin; JEV: Japanese encephalitis virus; LACV: La Crosse virus; MAYV: Mayaro virus; m6A: N6-methyladenosine; MMP: Matrix metalloproteinase; mRNA: Messenger RNA; NK: Natural killer; NVU: Neurovascular unit; PNS: Peripheral nervous system; POWV: Powassan virus; PTM: Post-transcriptional modification; RVFV: Rift valley fever virus; RNA: Ribonucleic acid; TBEV: Tick-borne encephalitis virus; TJ: Tight junctions; TLR: Toll-like receptor; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factors alpha; USUV: Usutu virus; VEEV: Venezuelan Equine encephalitis virus; WEEV: Western Equine encephalitis virus; WNV: West Nile virus; ZIKV: Zika virus; ZO-1: Zona occludens 1

## Acknowledgements

Not applicable

## Authors’ contributions

MC, PE, AC, and SS researched the literature and drafted the manuscript. LB, AL, PVDP, and YS critically reviewed and edited the work. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This work is supported by grants from Montpellier University of Excellence (ANR-16-IDEX-0006) and the Labex EpiGenMed “Investissements d’avenir” program (ANR-10-LABX-12-01).

## Availability of data and materials

Not applicable

## Ethics approval and consent to participate

Not applicable

## Consent for publication

Not applicable

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Author details

<sup>1</sup>Pathogenesis and Control of Chronic Infections, INSERM, University of Montpellier, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France. <sup>2</sup>Institute of Research in Infectiology of Montpellier, CNRS, University of Montpellier, Montpellier, France. <sup>3</sup>Neurology Unit, INSERM CIC 1424, Guadeloupe University Hospital, Université des Antilles, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France. <sup>4</sup>INSERM U1127, CNRS, UMR7225, Brain and Spine Institute, Sorbonne University Medical School, Paris, France. <sup>5</sup>Pathogenesis and Control of Chronic Infections, INSERM, University of Montpellier, Etablissement Français du Sang, CHU Montpellier, Montpellier, France. <sup>6</sup>INSERM CIC 1424, Infectious Disease and Tropical Medicine Unit, Martinique University Hospital, Université des Antilles EA4537, Martinique, France.

Received: 27 May 2020 Accepted: 17 July 2020

Published online: 10 August 2020

## References

- Ludlow M, Kortekaas J, Herden C, Hoffmann B, Tappe D, Trebst C, et al. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol.* Springer. Berlin Heidelberg. 2016;131:159–84.
- Agner SC, Klein RS. Viruses have multiple paths to central nervous system pathology. *Curr Opin Neurol.* 2018;31:313–7.
- De Chiara G, Marcocci ME, Sgarbanti R, Civitelli L, Ripoli C, Piacentini R, et al. Infectious agents and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2012;46:614–38.
- Mattson MP. Infectious agents and age-related neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev.* 2004;3:105–20.
- Thakur KT, Boubour A, Saylor D, Das M, Bearden DR, Birbeck GL. Global HIV neurology: a comprehensive review. *AIDS.* 2018;1.
- Alfahad T, Nath A. Retroviruses and amyotrophic lateral sclerosis. *Antiviral Res.* Elsevier B.V.; 2013;99:180–7.
- Canet G, Dias C, Gabelle A, Simonin Y, Gosselet F, Marchi N, et al. HIV neuroinfection and Alzheimer’s disease: similarities and potential links? *Front Cell Neurosci.* 2018;12:1–13.
- Tarter KD, Simanek AM, Dowd JB, Aiello AE. Persistent viral pathogens and cognitive impairment across the life course in the third national health and nutrition examination survey. *J Infect Dis.* 2014;209:837–44.
- Itzhaki RF. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer’s disease: increasing evidence for a major role of the virus. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:202.
- Lurain NS, Hanson BA, Martinson J, Leurgans SE, Landay AL, Bennett DA, et al. Virological and immunological characteristics of human cytomegalovirus infection associated with Alzheimer disease. *J Infect Dis.* 2013;208:564–72.
- Garg RK, Mahadevan A, Malhotra HS, Rizvi I, Kumar N, Uniyal R. Subacute sclerosing panencephalitis. *Rev Med Virol.* Rev Med Virol. 2019;29.
- Koyuncu OO, Hogue IB, Enquist LW. Virus infections in the nervous system. *Cell Host Microbe.* Elsevier Inc.; 2013;13:379–93.
- Salinas S, Schiavo G, Kremer EJ. A hitchhiker’s guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:645–55.
- Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic B V. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell.* Elsevier Inc.; 2015;163:1064–78.
- Banks WA, Erickson MA. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis.* Elsevier B.V.; 2010;37:26–32.
- Miner JJ, Diamond MS. Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood-brain barrier. *Curr Opin Immunol.* Elsevier Ltd. 2016;38:18–23.
- Zhang Y-L, Ouyang Y-B, Liu L-G, Chen D-X. Blood-brain barrier and neuro-AIDS. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19:4927–39.
- Williams DW, Anastos K, Morgello S, Berman JW. JAM-A and ALCAM are therapeutic targets to inhibit diapedesis across the BBB of CD14 + CD16+ monocytes in HIV-infected individuals. *J Leukoc Biol.* 2015;97:401–12.
- Dittmar S, Harms H, Runkler N, Maisner A, Kim KS, Schneider-Schaulies J. Measles virus-induced block of transendothelial migration of T lymphocytes and infection-mediated virus spread across endothelial cell barriers. *J Virol.* 2008;82:11273–82.



20. Salimi H, Cain MD, Klein RS. Encephalitic arboviruses: emergence, clinical presentation, and neuropathogenesis. *Neurotherapeutics*. 2016;13:514–34.
21. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*. NIH Public Access. 2010;85:328–45.
22. Barzon L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol*. Elsevier. 2018;107:38–47.
23. Troupin A, Colpitts TM. Overview of West Nile virus transmission and epidemiology. *Methods Mol Biol*. 2016. p. 15–8.
24. Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, et al. Usutu virus: a new threat? *Epidemiol Infect*. 2019;147:e232.
25. Tyler K. Emerging viral infections of the central nervous system: Part 1. *Arch Neurol*. 2009;66:939–48.
26. Kleber de Oliveira W, Cortez-Escalante J, De Oliveira WTGH, do Carmo GMI, Henriques CMP, Coelho GE, et al. Increase in reported prevalence of microcephaly in infants born to women living in areas with confirmed Zika virus transmission during the first trimester of pregnancy — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65:242–7.
27. Soumahoro M-K, Boelle P-Y, Gaüzere B-A, Atsou K, Pelat C, Lambert B, et al. The Chikungunya epidemic on La Réunion Island in 2005–2006: a cost-of-illness study. Powers AM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science; 2011;5:e1197.
28. de Valk H, Balleydier E, Solet J-L, Illef D, Rachou E, Larrieu S, et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Réunion Island, France, 2005–2006. *Am J Trop Med Hyg*. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2007;77:727–31.
29. Li G-H, Ning Z-J, Liu Y-M, Li X-H. Neurological manifestations of dengue infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7.
30. Sigfrid L, Reusken C, Eckerle I, Nussenblatt V, Lipworth S, Messina J, et al. Preparing clinicians for (re-)emerging arbovirus infectious diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect*. Elsevier Ltd. 2018;24:289–94.
31. JA G-S, GF R-A. Chikungunya virus: history, geographic distribution, clinical picture, and treatment. *P R Health Sci J*. P R Health Sci J; 2018;37.
32. Van Bortel W, Dorleans F, Rosine J, Blateau A, Rousseau D, Matheus S, et al. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control; 2014;19:20759.
33. LaBeaud AD, Bashir F, King CH. Measuring the burden of arboviral diseases: the spectrum of morbidity and mortality from four prevalent infections. *Popul Health Metr*. 2011;9:1–11.
34. Carson PJ, Konewko P, Wold KS, Mariani P, Goli S, Bergloff P, et al. Long-term clinical and neuropsychological outcomes of West Nile virus infection. *Clin Infect Dis*. 2006;43:723–30.
35. Anastasiadou A, Kakoulidis I, Butel D, Kehagia E, Papa A. Follow-up study of Greek patients with West Nile virus neuroinvasive disease. *Int J Infect Dis*. International Society for Infectious Diseases; 2013;17:e494–e497.
36. Sadek JR, Pergam SA, Harrington JA, Echevarria LA, Davis LE, Goade D, et al. Persistent neuropsychological impairment associated with West Nile virus infection. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2010;32:81–7.
37. Sejvar JJ. The long-term outcomes of human West Nile virus infection. *Clin Infect Dis*. 2007;44:1617–24.
38. Klee AL, Maidin B, Edwin B, Poshni I, Mostashari F, Fine A, et al. Long-term prognosis for clinical West Nile virus infection. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1405–11.
39. Petersen LR, Carson PJ, Biggerstaff BJ, Custer B, Borchardt SM, Busch MP. Estimated cumulative incidence of West Nile virus infection in US adults, 1999–2010. *Epidemiol Infect*. 2013;141:591–5.
40. Ouhoumanne N, Lowe A-M, Fortin A, Kairy D, Vibien A, K-Lensch J, et al. Morbidity, mortality and long-term sequelae of West Nile virus disease in Québec. *Epidemiol Infect*. 2018;146:867–74.
41. Samaan Z, McDermid Vaz S, Bawor M, Potter TH, Eskandarian S, Loeb M. Neuropsychological impact of West Nile virus infection: an extensive neuropsychiatric assessment of 49 cases in Canada. Klein RS, editor. *PLoS One*. 2016;11:e0158364.
42. Weatherhead JE, Miller VE, Garcia MN, Hasbun R, Salazar L, Dimachkie MM, et al. Long-term neurological outcomes in West Nile virus-infected patients: an observational study. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92:1006–12.
43. Merle H, Donnio A, Jean-Charles A, Guyomarch J, Hage R, Najjioullah F, et al. Ocular manifestations of emerging arboviruses: dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. *J Fr Ophtalmol*. Elsevier Masson SAS. 2018;41:e235–43.
44. Paixão ES, Teixeira MG, Costa M da CN, Barreto ML, Rodrigues LC. Symptomatic dengue during pregnancy and congenital neurologic malformations. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:1748–50.
45. Cam BV, Fonsmark L, Hue NB, Phuong NT, Poulsen A, Heegaard ED. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:848–51.
46. Chimelli L, Pone SM, Avvad-Portari E, Vasconcelos ZFM, Zin AA, Cunha DP, et al. Persistence of Zika virus after birth: clinical, virological, neuroimaging, and neuropathological documentation in a 5-month infant with congenital Zika syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018;77:193–8.
47. Platt DJ, Miner JJ. Consequences of congenital Zika virus infection. *Curr Opin Virol*. 2017;27:1–7.
48. Satterfield-Nash A, Kotzky K, Allen J, Bertolli J, Moore CA, Pereira IO, et al. Health and development at age 19–24 months of 19 children who were born with microcephaly and laboratory evidence of congenital Zika virus infection during the 2015 Zika virus outbreak — Brazil, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017;66:1347–51.
49. Chimelli L, Melo ASO, Avvad-Portari E, Wiley CA, Camacho AHS, Lopes VS, et al. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection. *Acta Neuropathol*. Springer. Berlin Heidelberg. 2017;133:983–99.
50. Reynolds MR, Jones AM, Petersen EE, Lee EH, Rice ME, Bingham A, et al. Vital signs: update on Zika virus-associated birth defects and evaluation of all U.S. infants with congenital Zika virus exposure — U.S. Zika Pregnancy Registry, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017;66:366–73.
51. WHO Zika situation report. Zika virus microcephaly Guillain-Barré syndrome. World Health Organization. 1 September 2016:2016.
52. Besnard M, Eyrolle-Guignot D, Guillemette-Artur P, Lastère S, Bost-Bezeaud F, Marcelis L, et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Euro Surveill*. 2016;21.
53. Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-artur P, Eyrolle-guignot D, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013 – 15: a retrospective study. *Lancet*. Elsevier Ltd; 2016;6736:1–8.
54. Russo FB, Jungmann P, Beltrão-Braga PCB. Zika infection and the development of neurological defects. *Cell Microbiol*. 2017;19:1–6.
55. Pessoa A, van der Linden V, Yeargin-Allsopp M, Carvalho MDCG, Ribeiro EM, Van Naarden BK, et al. Motor abnormalities and epilepsy in infants and children with evidence of congenital Zika virus infection. *Pediatrics*. 2018;141:5167–79.
56. van der Linden H, Carvalho MD, van der Linden V, Pessoa A, Carneiro ML, et al. Epilepsy profile in infants with congenital Zika virus infection. *N Engl J Med*: Lacerda KM; 2018.
57. Lockrow J, Tully H, Saneto RP. Epileptic spasms as the presenting seizure type in a patient with a new “O” of TORCH, congenital Zika virus infection. *Epilepsy Behav Case Reports*. 2019;11:1–3.
58. Marques FJP, Teixeira MCS, Barra RR, de Lima FM, Dias BLS, Pupe C, et al. Children born with congenital Zika syndrome display atypical gross motor development and a higher risk for cerebral palsy. *J Child Neurol*. 2019;34:81–5.
59. AL C, P V, T T, I B, C B, R L. Cerebral palsy in children with congenital Zika syndrome: a 2-year neurodevelopmental follow-up. *J Child Neurol*. J Child Neurol; 2020;35.
60. Pereira HVFS, Dos Santos SP, Amâncio APRL, de Oliveira-Szejnfeld PS, Flor EO, de Sales TJ, et al. Neurological outcomes of congenital Zika syndrome in toddlers and preschoolers: a case series. *Lancet Child Adolesc Heal*. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020;4:378–87.
61. Lebov JF, Brown LM, MacDonald PDM, Robertson K, Bowman NM, Hooper SR, et al. Review: evidence of neurological sequelae in children with acquired Zika virus infection. *Pediatr Neurol*. Elsevier Inc.; 2018;85:16–20.
62. Nielsen-Saines K, Brasil P, Kerin T, Vasconcelos Z, Gabaglia CR, Damasceno L, et al. Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. *Nat Med*. Springer US. 2019;25.
63. Nanishi E, Hoshina T, Sanefuji M, Kadoya R, Kitazawa K, Arahata Y, et al. A nationwide survey of pediatric-onset Japanese encephalitis in Japan. *Clin Infect Dis*. 2019;68:2099–104.
64. Kumar R, Mathur A, Singh KB, Sitholey P, Prasad M, Shukla R, et al. Clinical sequelae of Japanese encephalitis in children. *Indian J Med Res*. 1993;97:9–13.

65. Yin Z, Wang X, Li L, Li H, Zhang X, Li J, et al. Neurological sequelae of hospitalized Japanese encephalitis cases in Gansu province, China. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92:1125–9.
66. Sarkari NBS, Thacker AK, Barthwal SP, Mishra VK, Prapann S, Srivastava D, et al. Japanese encephalitis (JE). Part I: clinical profile of 1,282 adult acute cases of four epidemics. *J Neurol.* 2012;259:47–57.
67. Sarkari NBS, Thacker AK, Barthwal SP, Mishra VK, Prapann S, Srivastava D, et al. Japanese encephalitis (JE) part II: 14 years' follow-up of survivors. *J Neurol.* 2012;259:58–69.
68. de Andrade DC, Jean S, Clavelou P, Dallel R, Bouhassira D. Chronic pain associated with the Chikungunya fever: long lasting burden of an acute illness. *BMC Infect Dis.* 2010;10:31.
69. Gérardin P, Sampéris S, Ramful D, Boumahni B, Bintner M, Alessandri JL, et al. Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child Chikungunya virus infection: the CHIMERE cohort study on Reunion Island. Powers AM, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* Public Library of Science; 2014;8:e2996.
70. Barr K, Vaidhyanathan V. Chikungunya in infants and children: is pathogenesis increasing? *Viruses.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019;11:294.
71. Mehta R, Gérardin P, de Brito CAA, Soares CN, Ferreira MLB, Solomon T. The neurological complications of chikungunya virus: a systematic review. *Rev Med Virol.* 2018;28.
72. Contopoulos-Ioannidis D, Newman-Lindsay S, Chow C, LaBeaud AD. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:1–20.
73. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Réunion. Chretien J-P, editor. *PLoS Med.* Public Library of Science; 2008;5:e60.
74. Steffen R. Tick-borne encephalitis (TBE) in children in Europe: epidemiology, clinical outcome and comparison of vaccination recommendations. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019;10:100–10.
75. Engman M-L, Lindström K, Sallamba M, Hertz C, Sundberg B, Hansson MEA, et al. One-year follow-up of tick-borne central nervous system infections in childhood. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31:570–4.
76. Gustaw-Rothenberg K. Cognitive impairment after tick-borne encephalitis. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008;26:165–8.
77. Veje M, Nolskog P, Petzold M, Bergström T, Lindén T, Peker Y, et al. Tick-borne encephalitis sequelae at long-term follow-up: a self-reported case-control study. *Acta Neurol Scand.* John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2016; 134:434–41.
78. Carrera J-P, Forrester N, Wang E, Vittor AY, Haddow AD, López-Vergès S, et al. Eastern equine encephalitis in Latin America. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society. 2013;369:732–44.
79. MULDER DW, PARROTT M, THALER M. Sequelae of western equine encephalitis. *Neurology.* 1951;1:318–27.
80. van Aalst M, Nelen CM, Goorhuis A, Stijnen C, Grobusch MP. Long-term sequelae of chikungunya virus disease: a systematic review. *Travel Med Infect Dis.* 2017;15:8–22.
81. de Souza CG, da Costa JF, de Sousa Dantas D, de Abreu Freitas RP, Lopes JM, Okano AH. Evaluation of pain, functional capacity and kinesiophobia in women in the chronic stage of chikungunya virus infection: a cross-sectional study in northeastern Brazil. *Acta Trop.* 2019;199:104853.
82. Henry CR, Al-Attar L, Cruz-Chacón AM, Davis JL. Chorioretinal lesions presumed secondary to Zika virus infection in an immunocompromised adult. *JAMA Ophthalmol.* American Medical Association; 2017;135:386.
83. Manangeeswaran M, Kielczewski JL, Sen HN, Xu BC, Ireland DDC, McWilliams IL, et al. ZIKA virus infection causes persistent chorioretinal lesions. *Emerg Microbes Infect.* Nature Publishing Group; 2018;7:96.
84. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika virus in body fluids — final report. *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society. 2018;379:1234–43.
85. Gérardin P, Couderc T, Bintner M, Tournebize P, Renouil M, Lémant J, et al. Chikungunya virus-associated encephalitis: a cohort study on La Réunion Island, 2005–2009. *Neurology.* 2016;86:94–102.
86. DellaBadia J, Jaffe SL, Singh J, Minagar A. An occipital lobe epileptogenic focus in a patient with West Nile encephalitis. *Eur J Neurol.* 2004;11:111–3.
87. McJunkin JE, de los Reyes EC, Irazuzta JE, Caceres MJ, Khan RR, Minnich LL, et al. La Crosse encephalitis in children. *N Engl J Med.* 2001;344:801–7.
88. Curren EJ, Lindsey NP, Fischer M, Hills SL. St. Louis encephalitis virus disease in the United States, 2003–2017. *Am J Trop Med Hyg.* Am J Trop Med Hyg; 2018;99:1074–1079.
89. Krbková L, Štroblová H, Bednářová J. Clinical course and sequelae for tick-borne encephalitis among children in South Moravia (Czech Republic). *Eur J Pediatr.* Eur J Pediatr. 2015;174:449–58.
90. Marinho PES, Bretas de Oliveira D, Candiani TMS, Crispim APC, Alvarenga PPM, Castro FC dos S, et al. Meningitis associated with simultaneous infection by multiple dengue virus serotypes in children, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:115–8.
91. N P, B M, A U, J P, L L, J N, et al. Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. *Euro Surveill.* Euro Surveill; 2013;18.
92. Saha S, Ramesh A, Kalantar K, Malaker R, Hasanuzzaman M, Khan LM, et al. Unbiased metagenomic sequencing for pediatric meningitis in Bangladesh reveals neuroinvasive chikungunya virus outbreak and other unrealized pathogens. *MBio.* mBio; 2019;10.
93. Wright WF, Pinto CN, Palisoc K, Baghli S. Viral (aseptic) meningitis: a review. *J Neurol Sci.* J Neurol Sci. 2019;398:176–83.
94. Rauch J, Zammarchi L, Corti G, Bartoloni A, Schlaphof A, Schmidt-Chanasit J, et al. Serum cytokine and chemokine changes during Toscana virus meningitis. *Med Microbiol Immunol.* Med Microbiol Immunol. 2019;208:727–30.
95. Hong H, Kim BS, Im H. Pathophysiological role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Int Neurol J.* 2016; 20:52–7.
96. Rasmussen SA, Meaney-Delman DM, Petersen LR, Jamieson DJ. Studying the effects of emerging infections on the fetus: experience with West Nile and Zika viruses. *Birth Defects Res.* 2017;109:363–71.
97. Ikegami T, Makino S. The pathogenesis of rift valley fever. *Viruses.* 2011;3: 493–519.
98. Hartman A. Rift Valley fever. *Clin Lab Med.* 2017;37:285–301.
99. Arishi HM, Aqeel AY, Al Hazmi MM. Vertical transmission of fatal Rift Valley fever in a newborn. *Ann Trop Paediatr.* 2006;26:251–3.
100. Barzon L, Pacenti M, Sinigaglia A, Berto A, Trevisan M, Palù G. West Nile virus infection in children. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13:1373–86.
101. Charlier C, Beaudoin MC, Couderc T, Lortholary O, Lecuit M. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. *Lancet Child Adolesc. Heal.* 2017. p. 134–46.
102. Vianna P, Gomes J do A, Boquett JA, Fraga LR, Schuch JB, Vianna FSL, et al. Zika virus as a possible risk factor for autism spectrum disorder: neuroimmunological aspects. *Neuroimmunomodulation.* 2018;25:320–7.
103. Khandaker G, Jung J, Britton PN, King C, Yin JK, Jones CA. Long-term outcomes of infective encephalitis in children: a systematic review and meta-analysis. *Dev. Med. Child Neurol.* 2016. p. 1108–15.
104. da Silva IRF, Frontera JA, Bispo de Filippis AM, Nascimento OJM do. Neurologic complications associated with the Zika virus in Brazilian adults. *JAMA Neurol.* American Medical Association; 2017;74:1190.
105. Zucker J, Neu N, Chiriboga CA, Hinton VJ, Leonardo M, Sheikh A, et al. Zika virus-associated cognitive impairment in adolescent, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2017. p. 1047–8.
106. Webster D, Dimitrova K, Holloway K, Makowski K, Safronetz D, Drebot MA. California serogroup virus infection associated with encephalitis and cognitive decline, Canada, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2017;23:1423–4.
107. Selvey LA, Speers DJ, Smith DW. Long-term outcomes of Murray Valley encephalitis cases in Western Australia: what have we learnt? *Intern Med J.* 2016;46:193–201.
108. Earnest MP, Goolishian HA, Calverley JR, Hayes RO, Hill HR. Neurologic, intellectual, and psychologic sequelae following western encephalitis: a follow-up study of 35 cases. *Neurology.* 1971;21:969.
109. Ronca SE, Dineley KT, Paessler S. Neurological sequelae resulting from encephalitic alphavirus infection. *Front Microbiol.* Frontiers. 2016;7:959.
110. PALMER RJ, FINLEY KH. Sequelae of encephalitis; report of a study after the California epidemic. *Calif Med.* 1956;84:98–100.
111. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell.* Elsevier Inc.; 2016;1–7.
112. Shi Y, Li S, Wu Q, Sun L, Zhang J, Pan N, et al. Vertical transmission of the Zika virus causes neurological disorders in mouse offspring. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2018;8:3541.
113. Wu Y-H, Cui X-Y, Yang W, Fan D-Y, Liu D, Wang P-G, et al. Zika virus infection in hypothalamus causes hormone deficiencies and leads to

- irreversible growth delay and memory impairment in mice. *Cell Rep.* Elsevier Company; 2018;25:1537-1547.e4.
114. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell.* Elsevier Inc; 2016;1-11.
115. Platt DJ, Smith AM, Arora N, Diamond MS, Coyne CB, Miner JJ. Zika virus-related neurotropic flaviviruses infect human placental explants and cause fetal demise in mice. *Sci Transl Med.* 2018;10:1-11.
116. McMillen CM, Arora N, Boyles DA, Albe JR, Kujawa MR, Bonadio JF, et al. Rift Valley fever virus induces fetal demise in Sprague-Dawley rats through direct placental infection. *Sci Adv.* 2018;4:eau9812.
117. Bayless NL, Greenberg RS, Swigut T, Wysocka J, Blish CA. Zika virus infection induces cranial neural crest cells to produce cytokines at levels detrimental for neurogenesis. *Cell Host Microbe.* Elsevier Inc; 2016;20:423-8.
118. Rosa-Fernandes L, Cugola FR, Russo FB, Kawahara R, de Melo Freire CC, Leite PEC, et al. Zika virus impairs neurogenesis and synaptogenesis pathways in human neural stem cells and neurons. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:64.
119. Shao Q, Herrlinger S, Yang S-L, Lai F, Moore JM, Brindley MA, et al. Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. *Development.* 2016;143:4127-36.
120. Stanelle-Bertram S, Walendy-Gnirß K, Speiseder T, Thiele S, Asante IA, Dreier C, et al. Male offspring born to mildly ZIKV-infected mice are at risk of developing neurocognitive disorders in adulthood. *Nat Microbiol.* 2018;3:1161-74.
121. Ferraris P, Wicht S, Wolf B, Busso C. Open Biol: Zika virus causes supernumerary foci with centriolar proteins and impaired spindle positioning; 2017.
122. Onorati M, Li Z, Liu F, Sousa AMM, Nakagawa N, Li M, et al. Zika virus disrupts phospho-TBK1 localization and mitosis in human neuroepithelial stem cells and radial glia. *Cell Rep.* 2016;0:R151-R162.
123. Simonin Y, Loustalot F, Desmetz C, Foulongne V, Constant O, Fournier-Wirth C, et al. Zika virus strains potentially display different infectious profiles in human neural vells. *EBioMedicine.* The Authors. 2016;12:161-9.
124. Gorshkov K, Shiryayev SA, Fertel S, Lin Y-W, Huang C-T, Pinto A, et al. Zika virus: origins, pathological action, and treatment strategies. *Front Microbiol.* 2019;9:3252.
125. Das S, Basu A. Japanese encephalitis virus infects neural progenitor cells and decreases their proliferation. *J Neurochem.* 2008;106:1624-36.
126. Das T, Jaffar-Bandjee MC, Hoarau JJ, Krejbich Trotot P, Denizot M, Lee-Pat-Yuen G, et al. Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus. *Prog Neurobiol.* Pergamon. 2010;91:121-9.
127. Mustafá YM, Meuren LM, Coelho SVA, de Arruda LB. Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. *Front Microbiol.* 2019;10.
128. Bai F, Kong K-F, Dai J, Qian F, Zhang L, Brown CR, et al. A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J Infect Dis.* 2010;202:1804-12.
129. Paul AM, Acharya D, Duty L, Thompson EA, Le L, Stokic DS, et al. Osteopontin facilitates West Nile virus neuroinvasion via neutrophil "Trojan horse" transport. *Sci Rep.* Springer US; 2017;7:4722.
130. Papa MP, Meuren LM, Coelho SVA, Lucas CG de O, Mustafá YM, Lemos Matassoli F, et al. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without Barrier Disruption. *Front Microbiol.* 2017;8:2557.
131. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 2004;10:1366-73.
132. Vásquez Ochoa M, García Cordero J, Gutiérrez Castañeda B, Santos Argumedo L, Villegas Sepúlveda N, Cedillo BL. A clinical isolate of dengue virus and its proteins induce apoptosis in HMEC-1 cells: a possible implication in pathogenesis. *Arch Virol.* Springer Vienna. 2009;154:919-28.
133. Verma S, Lo Y, Chapagain M, Lum S, Kumar M, Gurjav U, et al. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology.* 2009;385:425-33.
134. Velandia-Romero ML, Calderón-Peláez M-A, Castellanos JE. In vitro infection with dengue virus induces changes in the structure and function of the mouse brain endothelium. *PLoS One.* 2016;11:e0157786.
135. Roe K, Orillo B, Verma S. West Nile virus-induced cell adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells regulate leukocyte adhesion and modulate permeability of the in vitro blood-brain barrier model. Toborek M, editor. *PLoS One.* 2014;9:e102598.
136. Suen WW, Prow NA, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H. Mechanism of West Nile virus neuroinvasion: a critical appraisal. *Viruses.* 2014;6:2796-825.
137. Puccioni-Sohler M, Rosadas C. Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection. *Arq Neuropsiquiatr.* 2015;73:698-703.
138. J K, B A, M H, EM H, J J, H S, et al. Zika virus infects pericytes in the choroid plexus and enters the central nervous system through the blood-cerebrospinal fluid barrier. *PLoS Pathog.* 2020;16:e1008204.
139. Samuel M a, Wang H, Siddharthan V, Morrey JD, Diamond MS. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:17140-17145.
140. Hunsperger EA, Roehrig JT. Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice. *J Neurovirol.* Springer-Verlag. 2006;12:129-39.
141. Monath TP, Cropp CB, Harrison AK. Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab Invest.* 1983;48:399-410.
142. Banks WA, Kovac A, Morofuji Y. Neurovascular unit crosstalk: Pericytes and astrocytes modify cytokine secretion patterns of brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;0271678X1774079.
143. Michinaga S, Koyama Y. Dual roles of astrocyte-derived factors in regulation of blood-brain barrier function after brain damage. *Int J Mol Sci.* 2019;20:571.
144. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell.* Cell Press. 2011;144:810-23.
145. Habbas S, Santello M, Becker D, Stubbe H, Zappia G, Liaudet N, et al. Neuroinflammatory TNF $\alpha$  impairs memory via astrocyte signaling. *Cell.* Cell Press. 2015;163:1730-41.
146. Potokar M, Jorgačevski J, Zorec R. Astrocytes in flavivirus infections. *Int J Mol Sci.* 2019;20:691.
147. Daniels BP, Holman DW, Cruz-Orengo L, Jujjavarapu H, Durrant DM, Klein RS. Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *MBio.* 2014;5:1-13.
148. Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S, Nerurkar VR. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology.* Academic Press. 2010;397:130-8.
149. Stefanik M, Formanova P, Bily T, Vancova M, Eyer L, Palus M, et al. Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neurosci.* BioMed Central. 2018;19:1-8.
150. Chang C-Y, Li J-R, Chen W-Y, Ou Y-C, Lai C-Y, Hu Y-H, et al. Disruption of *in vitro* endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-infected astrocytes. *Glia.* 2015;63:1915-32.
151. Bhowmick S, Duseja R, Das S, Appaiahgiri MB, Vrati S, Basu A. Induction of IP-10 (CXCL10) in astrocytes following Japanese encephalitis. *Neurosci Lett.* 2007;414:45-50.
152. Soung A, Klein RS. Viral encephalitis and neurologic diseases: focus on astrocytes. *Trends Mol Med.* Elsevier Ltd. 2018;24:950-62.
153. Erickson MA, Banks WA. Neuroimmune axes of the blood-brain barriers and blood-brain interfaces: bases for physiological regulation, disease states, and pharmacological interventions. *Pharmacol Rev.* 2018;70:278-314.
154. Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelhä M, Rösner J, Schneider UC, et al. Interleukin 6-mediated endothelial barrier disturbances can be attenuated by blockade of the IL6 receptor expressed in brain microvascular endothelial cells. *Transl Stroke Res.* 2018;9:631-42.
155. Rustenhoven J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. Brain pericytes as mediators of neuroinflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38:291-304.
156. Rudziak P, Ellis CG, Kowalewska PM. Role and molecular mechanisms of pericytes in regulation of leukocyte diapedesis in inflamed tissues. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:1-9.
157. Chang CY, Li JR, Ou YC, Lin SY, Wang YY, Chen WY, et al. Interplay of inflammatory gene expression in pericytes following Japanese encephalitis virus infection. *Brain Behav Immun.* Elsevier Inc; 2017;66:230-43.
158. Chen C-J, Ou Y-C, Li J-R, Chang C-Y, Pan H-C, Lai C-Y, et al. Infection of pericytes in vitro by Japanese encephalitis virus disrupts the integrity of the endothelial barrier. *J Virol.* 2014;88:1150-61.
159. Snyder HM, Corriveau RA, Craft S, Faber JE, Greenberg SM, Knopman D, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia including Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* Elsevier. 2015;11:710-7.

160. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier / neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005;57:173–85.
161. Marchi N, Bazarian JJ, Puvenna V, Janigro M, Ghosh C, Zhong J, et al. Consequences of repeated blood-brain barrier disruption in football players. Dhandapani KM, editor. *PLoS One.* 2013;8:e56805.
162. Stogsdill JA, Eroglu C. The interplay between neurons and glia in synapse development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2017;42:1–8.
163. Koehl M, Abrous DN. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2011;33:1101–14.
164. Hirano M, Yoshii K, Sakai M, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H. Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures. *J Gen Virol.* 2014;95:849–61.
165. Figueiredo CP, Barros-Aragão FGQ, Neris RLS, Frost PS, Soares C, Souza INO, et al. Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. *Nat Commun.* Springer US; 2019;10:3890.
166. Nazmi A, Mukhopadhyay R, Dutta K, Basu A. STING mediates neuronal innate immune response following Japanese encephalitis virus infection. *Sci Rep.* 2012;2:347.
167. Ikegami A, Haruwaka K, Wake H. Microglia: lifelong modulator of neural circuits. *Neuropathology.* 2019;39:173–80.
168. Azevedo EP, Ledo JH, Barbosa G, Sobrinho M, Diniz L, Fonseca ACC, et al. Activated microglia mediate synapse loss and short-term memory deficits in a mouse model of transthyretin-related oculoleptomeningeal amyloidosis. *Cell Death Dis.* 2013;4:e789.
169. Rajendran L, Paolicelli RC. Microglia-mediated synapse loss in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2018;38:2911–9.
170. Adle-Biassette H, Chrétien F, Wingertsmann L, Héry C, Ereau T, Scaravilli F, et al. Neuronal apoptosis does not correlate with dementia in HIV infection but is related to microglial activation and axonal damage. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1999;25:123–33.
171. Lum F-M, Low DKS, Fan Y, Tan JLL, Lee B, Chan JKY, et al. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. *Clin Infect Dis.* 2017; 64:914–20.
172. Thounaojam MC, Kaushik DK, Kundu K, Basu A. MicroRNA-29b modulates Japanese encephalitis virus-induced microglia activation by targeting tumor necrosis factor alpha-induced protein 3. *J Neurochem.* John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2014;129:143–54.
173. Bhatt RS, Kothari ST, Gohil DJ, D'Souza M, Chowdhary AS. Novel evidence of microglial immune response in impairment of dengue infection of CNS. *Immunobiology.* 2015;220:1170–6.
174. Chauhan PS, Misra UK, Kalita J, Chandravanshi LP, Khanna VK. Memory and learning seems to be related to cholinergic dysfunction in the JE rat model. *Physiol Behav.* 2016;156:148–55.
175. Vasek MJ, Garber C, Dorsey D, Durrant DM, Bollman B, Soung A, et al. A complement–microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature.* 2016;534:538–43.
176. Garber C, Soung A, Vollmer LL, Kanmogne M, Last A, Brown J, et al. T cells promote microglia-mediated synaptic elimination and cognitive dysfunction during recovery from neuropathogenic flaviviruses. *Nat Neurosci.* Springer US. 2019;22.
177. J T-G, M G. Microglia in memory decline from Zika virus and West Nile virus infection. *Trends Neurosci.* Trends Neurosci; 2019;42.
178. Garber C, Vasek MJ, Vollmer LL, Sun T, Jiang X, Klein RS. Astrocytes decrease adult neurogenesis during virus-induced memory dysfunction via IL-1 article. *Nat Immunol.* 2018;19:151–61.
179. Sher AA, Glover KKM, Coombs KM. Zika virus infection disrupts astrocytic proteins involved in synapse control and axon guidance. *Front Microbiol.* Frontiers Media SA; 2019;10:596.
180. Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Chai G, Sheets N, Tang W, et al. Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. *Cell Stem Cell.* Elsevier Inc.; 2016;19:593–8.
181. Kohman R a, Rhodes JS. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun.* Elsevier Inc.; 2013;27:22–32.
182. Fagioliini M, Jensen CL, Champagne F. a. Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* Elsevier Ltd. 2009;19: 207–12.
183. Christopher MA, Kyle SM, Katz DJ. Neuroepigenetic mechanisms in disease. *Epigenetics Chromatin.* BioMed Central; 2017;10:47.
184. Janssens S, Schotsaert M, Karnik R, Balasubramaniam V, Dejoze M, Meissner A, et al. Zika virus alters DNA methylation of neural genes in an organoid model of the developing human brain. Gilbert JA, editor. *mSystems.* 2018;3.
185. Garcez PP, Correia Loiola E, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science (80- ).* 2016;352:816–8.
186. Garcez PP, Minardi J, Mota J, Vasc D, Madeiro R, Delvecchio R, et al. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Sci Rep.* 2016:1–10.
187. Szulwach KE, Li X, Li Y, Song C-X, Wu H, Dai Q, et al. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci.* 2011;14:1607–16.
188. Eldin P, Papon L, Oteiza A, Brocchi E, Lawson TG, Mechti N. TRIM22 E3 ubiquitin ligase activity is required to mediate antiviral activity against encephalomyocarditis virus. *J Gen Virol.* 2009;90:536–45.
189. Nisole S, Stoye JP, Saib A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:799–808.
190. Gokhale NS, McIntyre ABR, McFadden MJ, Roder AE, Kennedy EM, Gandara JA, et al. N6-methyladenosine in Flaviviridae viral RNA genomes regulates infection. *Cell Host Microbe.* 2016;20:654–65.
191. Lichinchi G, Zhao BS, Wu Y, Lu Z, Qin Y, He C, et al. Dynamics of human and viral RNA methylation during Zika virus infection. *Cell Host Microbe.* 2016;20:666–73.
192. Gokhale NS, McIntyre ABR, Mattocks MD, Holley CL, Lazear HM, Mason CE, et al. Altered m6A modification of specific cellular transcripts affects Flaviviridae infection. *Mol Cell: Cell Press;* 2019.
193. McIntyre W, Netzband R, Bonenfant G, Biegel JM, Miller C, Fuchs G, et al. Positive-sense RNA viruses reveal the complexity and dynamics of the cellular and viral epitranscriptomes during infection. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46:5776–91.
194. Hyde JL, Diamond MS. Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation. *Virology.* 2015;479–480:66–74.
195. Fourrier C, Singhal G, Baune BT. Neuroinflammation and cognition across psychiatric conditions. *CNS Spectr.* 2019;24:4–15.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

**At BMC, research is always in progress.**

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## RÉSUMÉ

De nos jours, de nombreux facteurs tels que les modifications écologiques, l'augmentation des déplacements animaliers et de la densité de la population mondiale ainsi que l'amélioration des moyens de transport favorisent l'apparition des virus émergents et facilitent leur transmission. L'émergence de ces nouveaux virus illustrent le défi complexe et constant pour la santé humaine puisqu'ils peuvent être à l'origine de maladies parfois inconnues et potentiellement graves notamment neuroinvasives. C'est le cas, par exemple, avec l'émergence récente de deux virus neurotropes : Zika (ZIKV) et Usutu (USUV). ZIKV a été responsable d'épidémies principalement en Polynésie Française en 2013 et en Amérique Latine en 2015-2016, où il a été la cause chez certains patients, d'atteintes neurologiques (encéphalite, méningo-encéphalite, syndrome de Guillain-Barré, microcéphalie, etc.). USUV, quant à lui, a émergé récemment en Europe, où il a été impliqué dans une importante mortalité aviaire (principalement chez le merle noir) mais aussi dans des infections neuroinvasives chez l'Homme (encéphalite, méningo-encéphalite, etc.). Malgré cela, la pathogenèse de ces deux virus reste peu explorée. L'objectif de cette thèse était de caractériser l'effet de l'infection du ZIKV sur la structure et l'homéostasie de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ainsi que d'évaluer et de comparer la neuropathogénicité de différentes lignées d'USUV en combinant des approches *in vivo* et *in vitro*. Nos résultats suggèrent premièrement une interaction complexe entre le ZIKV et la BHE qui pourrait déclencher une inflammation locale, le recrutement de leucocytes et une éventuelle perturbation vasculaire cérébrale sur du long terme. Deuxièmement, pour USUV, nos résultats corrélaient avec les pathologies inflammatoires cérébrales engendrées chez l'Homme comme l'encéphalite. De plus, suite à l'analyse des lignées circulantes d'USUV, nos résultats suggèrent que certaines lignées d'USUV peuvent avoir une neurovirulence plus importante, notamment la lignée Europe 2. Prises ensemble, ces données permettent une meilleure caractérisation des mécanismes physiopathologiques de la neurovirulence liés à l'infection par ZIKV et USUV, et suggèrent que les symptômes causés par ces virus dépendent de plusieurs facteurs, notamment le tropisme cellulaire ainsi que la réponse immunitaire de l'hôte. Pour ces raisons, il est nécessaire de s'intéresser aux biomarqueurs de la neuroinflammation dans le plasma et/ou dans le liquide céphalo-rachidien des patients infectés afin d'étudier les facteurs prédictifs ou les facteurs associés aux formes graves des infections à arbovirus dans le but de favoriser un diagnostic précoce.

Mots clés: Virus Zika, Virus Usutu, *flavivirus*, système nerveux central, neurovirulence et neurotropisme

## ABSTRACT

Nowadays, many factors such as ecological changes, increased animal movements, world population density, and improved means of transportation are contributing to the appearance and transmission of emerging virus. The emergence of these new viruses constitutes a complex and constant challenge to human health since they can sometimes cause unknown and potentially serious disorders, particularly neuroinvasive diseases. This is the case, for example, with the recent emergence of two neurotropic viruses: Zika virus (ZIKV) and Usutu virus (USUV). ZIKV is responsible for epidemics in French Polynesia in 2013 and Latin America in 2015-2016, where it was also responsible for neurological disorders (encephalitis, meningoencephalitis, Guillain-Barré syndrome, microcephaly, and others) in some patients. USUV has recently emerged in Europe, where it has been implicated in significant avian mortality, mainly in blackbirds, but also in neuroinvasive infections in humans (encephalitis, meningoencephalitis, and others). Despite this, the pathogenesis of these two emerging viruses remains poorly explored. The objective of this thesis was to characterize the effects of ZIKV infection on the blood-brain barrier (BBB) structure and homeostasis and to evaluate and compare the neuropathogenicity of different USUV lineages by combining *in vivo* and *in vitro* approaches. Our results first suggest a complex interaction between ZIKV and the BBB that could trigger local inflammation, leukocyte recruitment, and possible long-term cerebrovascular impairment. Secondly, regarding USUV, our data suggest that the virus can reach the brain and cause massive inflammation leading to the recruitment of immune cells, which correlates with human brain inflammatory pathologies such as encephalitis. Also, following the analysis of circulating USUV lineages, our results suggest that some USUV lineages may have a higher degree of neurovirulence, notably the Europe 2 lineage. Taken together, these data allow a better characterization of the pathophysiology mechanisms of neurovirulence related to ZIKV and USUV infections, and suggest that the symptoms caused by these viruses depend on several factors, including cellular tropism as well as the host immune response. For these reasons, it is necessary to study biomarkers of neuroinflammation in the plasma and/or cerebrospinal fluid of infected patients in order to study predictive factors, or associated with severe forms of arbovirus infections to promote early diagnosis.

Key Words: Zika Virus, Usutu Virus, *flavivirus*, central nervous system, neurovirulence and neurotropism