



HAL
open science

Rôle des protéines APOL1 et APOL3 lors de l'infection par le virus Zika

Sarah Lesage

► **To cite this version:**

Sarah Lesage. Rôle des protéines APOL1 et APOL3 lors de l'infection par le virus Zika. Biologie moléculaire. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7160 . tel-03273673

HAL Id: tel-03273673

<https://theses.hal.science/tel-03273673>

Submitted on 29 Jun 2021

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

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

Thèse de doctorat

de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université de Paris

Ecole doctorale n°562 Bio Sorbonne Paris Cité

Institut Pasteur de Paris, Département de Virologie

Rôle des protéines APOL1 et APOL3 lors de l'infection par le virus Zika

Par Sarah LESAGE

Thèse de doctorat de Virologie

Dirigée par le Dr Nolwenn JOUVENET

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 19 octobre 2020

Président du jury : Professeur Pierre-Emmanuel CECCALDI, Université de Paris
Rapporteurs : Docteur Caroline GOUJON, Institut de recherche en infectiologie de
Montpellier
Professeur Philippe ROINGEARD, Université de Tours
Examineurs : Docteur Ali AMARA, Hôpital Saint-Louis, Paris
Docteur Damien VITOUR, Ecole vétérinaire de Maison Alfort
Directeur de thèse : Docteur Nolwenn JOUVENET, Institut Pasteur de Paris

Résumés

Titre : Rôle des protéines APOL1 et APOL3 lors de l'infection par le virus Zika

Résumé : Lors d'une infection virale, la réponse immunitaire innée est rapidement induite. La reconnaissance des génomes viraux va déclencher des cascades de signalisation aboutissant à l'expression d'interféron de type I (IFN-I). Ainsi, plusieurs centaines de gènes stimulés par l'interféron (ISG) seront induits. L'approfondissement des connaissances sur le rôle des ISG lors d'infections virales est indispensable pour mieux comprendre la réponse immunitaire innée induite dans ce contexte et comment cette réponse peut être régulée ou contournée. Afin d'identifier des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée lors de l'infection par le virus Zika (ZIKV), nous avons réalisé un crible à haut débit à partir d'une banque d'ARN interférents (ARNi) permettant de cibler 386 gènes. Nous avons ainsi mis en évidence 21 gènes capables de moduler la réplication de ZIKV. Nous avons par la suite validé le rôle de 10 candidats par des méthodes de cytométrie en flux, de PCR quantitative et titration par plages de lyse.

A la suite de ces analyses, la protéine APOL3 est apparue comme favorisant l'infection et nous avons choisi de nous focaliser sur la caractérisation des mécanismes sous-jacents à cet effet. Nous avons également inclus dans la suite de notre étude une protéine de la même famille, APOL1, qui semble avoir le même impact sur l'infection virale. Nous avons mis en évidence que le rôle de ces protéines sur l'infection par ZIKV n'est pas lié à leur rôle cellulaire dans la production de PI4P. Nous avons également observé que ces protéines ne favorisent pas uniquement la réplication de ZIKV mais celles d'autres *flavivirus* et de virus non apparentés, tel que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Ces résultats laissent supposer un rôle large de ces candidats et non un effet virus-spécifique. Nous émettons l'hypothèse que les protéines APOL1 et APOL3 pourraient être des régulateurs négatifs de la voie Jak/STAT agissant directement ou indirectement sur la production d'ISGs. Bien que leurs fonctions restent à approfondir, notre étude a permis d'identifier des gènes de l'immunité ayant la capacité de moduler la réplication du virus ZIKV.

Mots clés : Virus Zika, crible haut débit, réponse interféron, gènes stimulés par l'interféron, APOL1, APOL3

Title: Role of APOL1 and APOL3 during Zika virus infection

Abstract: During a viral infection, the innate immune response is rapidly induced. Recognition of viral genomes by cellular sensors triggers signaling cascades that lead to the expression of type I interferon (IFN). Thus, several hundred of interferon-stimulated genes (ISG) will be induced. A deeper knowledge on the role of ISGs in viral infections is essential to better understand the innate immune response induced in this context and how this response can be regulated or bypassed.

In order to identify genes involved in the innate immune response during infection with Zika virus (ZIKV), we performed a high-throughput screen using a library of RNA (siRNA) targeting 386 genes. This analysis identified 21 genes able of modulating the replication of ZIKV. We validated the role of 10 candidates by flow cytometry, quantitative PCR and titration by plaque assays.

We selected one of the hits with proviral activity, APOL3, for in-depth analysis. We included in our analysis a protein from the same family, APOL1, which seems to have the same impact during viral infection. We have shown that the role of these proteins on ZIKV infection is not linked to their cellular role in the production of PI4P. We also observed that these proteins do not only promote the replication of ZIKV but those of other *flaviviruses* and unrelated viruses, such as vesicular stomatitis virus (VSV). These results suggest a broad proviral role for these proteins and not a virus-specific effect. We hypothesize that the proteins APOL1 and APOL3 could be negative regulators of the Jak / STAT pathway acting directly or indirectly on the production of ISGs.

Keywords: Zika Virus, high-throughput screen, interferon response, interferon stimulated genes, APOL1, APOL3

Remerciements

Table des matières

Introduction.....	1
I. Le virus Zika, une arbovirose majeure.....	1
1. Distribution du virus Zika et autres arbovirus dans le monde	1
2. Biologie moléculaire du virus Zika.....	9
II. Mise en place de la réponse immunitaire innée face au virus Zika	19
1. La reconnaissance des génomes viraux.....	19
2. Voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire innée	23
3. Les cytokines, des facteurs antiviraux.....	26
III. Rôle de l'interféron et des gènes stimulés par l'interféron dans la réponse antivirale.....	28
1. Les interférons.....	28
2. Voie de signalisation des IFN-I/III	30
3. Les gènes stimulés par l'interféron	32
IV. Les Apolipoprotéines L	38
1. APOL1	39
2. APOL3	43
Objectifs de la thèse.....	47
Matériels et Méthodes.....	49
I. Matériels.....	49
1. Cellules	49
2. Virus.....	50
3. Anticorps	51
II. Méthodes	52
1. Biologie cellulaire	52
2. Biologie moléculaire	55
3. Analyses statistiques	57
III. Crible à haut débit	58
1. Construction de la banque d'ARN interférents.....	58
2. Approche utilisée.....	58
3. Analyses des résultats du crible	59
Résultats partie I : Un crible à haut débit identifie des gènes de la réponse innée capable de moduler l'infection par le virus Zika.....	63
I. Outils pour la mise en place du crible à haut débit.....	63
II. Stratégie et optimisation des conditions du crible	66

III.	Le crible à haut débit	68
1.	Contrôle qualité du crible.....	68
2.	Analyses du crible et résultats.....	70
IV.	Validation des candidats	75
	Résultats partie II : Rôle des protéines APOL1 et APOL3 lors de l'infection par le virus Zika.....	79
I.	Validation de l'effet pro-viral des protéines APOL1 et APOL3	79
1.	Validation dans différents modèles cellulaires	79
2.	Etape du cycle viral potentiellement ciblé par APOL1 et APOL3	85
3.	Rôle d'APOL1 et APOL3 lors de l'infection par différents virus à ARN.....	88
II.	Lien entre métabolisme lipidique, APOLs et ZIKV	91
1.	Localisation cellulaire des APOLs.....	91
2.	Rôle des phospholipides PI(4)P lors de l'infection par ZIKV	92
III.	Effet des protéines APOL1 et APOL3 sur la voie IFN	95
1.	Régulation potentielle des voies IFN dans les lignées podocytes KO par APOL1 et APOL3.....	95
2.	Régulation potentielle des voies IFN dans les podocytes et les cellules microgliales traitées avec des ARNi ciblant APOL1 ou APOL3	99
3.	Questionnement sur les clones de podocytes KO APOL1 et KO APOL3.....	101
	Discussion.....	103
I.	Crible à haut débit pour identifier des gènes de la réponse innée modulant l'infection virale .	103
1.	Stratégie de criblage utilisée, quels avantages et quelles limites ?	103
2.	Mise en évidence de nouveaux candidats modulant la réplication du virus ZIKV	105
II.	Etude du rôle des protéines APOL1 et APOL3 lors de l'infection par ZIKV	110
1.	Rôle d'APOL1 et APOL3 dans les infections virales	110
2.	Validation du rôle des APOLs dans les lignées clonales podocytes KO	111
3.	Autres validations envisagées	113
4.	APOL1 et 3 n'impactent pas l'infection par ZIKV via le métabolisme lipidique	113
5.	Régulation potentielle des voies IFN par les APOL1 et 3	114
6.	Régulation de l'autophagie par APOL1.....	115
7.	Autres approches pour comprendre les fonctions pro-virales d'APOL1 et APOL3	116
	Conclusion générale.....	117
	Annexes.....	119
	Bibliographie.....	131

Table des illustrations

Introduction :

Figure 1. Distribution des arboviroses majeures dans le monde.....	3
Figure 2. Cycle de transmission de ZIKV.	5
Figure 3. Distribution de ZIKV dans le monde et épidémies majeures.....	7
Figure 4. Évolution génétique de ZIKV.....	8
Figure 5. Structure de la particule virale de ZIKV.....	10
Figure 6. Structure génomique de ZIKV.....	11
Figure 7. Cycle de réplication de ZIKV.....	14
Figure 8. Invagination du réticulum endoplasmique induite par ZIKV.....	16
Figure 9. Structure des RLRs.....	21
Figure 10. Détection de génome viraux par les PRR et contrôle par ZIKV.....	25
Figure 11. Voie de signalisation de l'IFN.....	31
Figure 12. Impact des ISGs sur le cycle viral de ZIKV.....	37
Figure 13. Organisation génomique de la famille de gènes APOL chez l'Homme.....	38
Figure 14. Organisation des domaines structuraux de la protéine APOL1.....	39
Figure 15. Implication d'APOL3 dans le métabolisme des lipides.....	44
Tableau 1. Principaux arbovirus pathogènes pour l'homme et les animaux domestiques.....	2
Tableau 2. Les protéines virales et leurs rôles.....	12
Tableau 3. PRRs dont l'activité antivirale est bien décrite.....	22
Tableau 4. Les interférons.....	29

Matériels et Méthodes :

Tableau 5. Virus utilisés au cours de l'étude.....	50
Tableau 6. Anticorps utilisés au cours de l'étude.....	51

Résultats – Partie I : Un crible à haut débit identifie des gènes de la réponse innée capable de moduler l'infection par le virus Zika

Figure 16. Conception de la banque.....	64
Figure 17. Déroulement du crible.....	66
Figure 18. Optimisation du traitement IFN et conditions d'infection.....	67
Figure 19. Contrôle qualité des réplicats du crible de la banque.....	69
Figure 20. Stratégies d'analyse du crible.....	71
Figure 21. Résultats du crible suite à l'analyse 1.....	72
Figure 22. Résultats du crible suite à l'analyse 2.....	73
Figure 23. Comparaison des analyses 1 et 2 du crible.....	73
Figure 24. Efficacité des ARNi.....	75
Figure 25. Validation des candidats.....	76
Tableau 7. Contrôle qualité de la transfection.....	70
Tableau 8. Candidats retenus.....	74

Résultats – Partie II : Rôle des protéines APOL1 et APOL3 lors de l'infection par le virus Zika

Figure 26. Différence d'expression des protéines APOL1 et 3 dans les HMC3 et podocytes.....	80
Figure 27. Validation du rôle d'APOL3 et APOL1 par ARN interférence.....	82
Figure 28. Validation des lignées podocytes KO.....	83
Figure 29. Validation du rôle de APOL3 et APOL1 dans les lignées KO APOL3 et APOL1.....	84
Figure 30. Impact d'APOL2 sur l'infection par ZIKV.....	85
Figure 31. Cinétique d'infection des lignées podocytes KO et WT.....	86
Figure 32. Test d'attachement et d'entrée des virions de ZIKV dans les lignées podocytes KO et WT..	87
Figure 33. Test de fusion BlaM-Vpr dans les lignées podocytes KO et WT.....	88
Figure 34. Rôle d'APOL3 et APOL1 lors de l'infection par différents virus dans les HMC3 et podocytes	89
Figure 35. Localisation cellulaire des APOLs.....	92
Figure 36. Rôle des PI4P dans l'infection par ZIKV.....	93
Figure 37. Induction des ISG dans lignées podocytes KO.....	96
Figure 38. Absence d'induction d'IFN-I dans lignées podocytes KO.....	98
Figure 39. Contrôle d'ISRE par APOL3.....	98
Figure 40. Induction des ISG dans cellules HMC3 et les podocytes exprimant moins d'APOL1 ou APOL3.	100
Figure 41. Comportement de différents clones podocytes KO APOL3 lors de l'infection par ZIKV.....	102

Discussion :

Figure 42. MTA2 inhibe l'infection par ZIKV dans les cellules HMC3 et les cellules Huh7.....	107
Figure 43. . La réplication de YFV et WNV est inhibée par MTA2 dans les cellules traitées à l'IFN α	107

Annexes :

Figure 44. Localisation cellulaire des APOLs.....	128
Tableau 9. Liste des gènes présents dans la banque d'ARNi.....	119
Tableau 10. Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes en RT-qPCR.....	126
Tableau 11. Séquences protéiques des APOLs dans les lignées podocytes KO.....	129

Abréviations

ADNc :	ADN complémentaire
APOL :	apolipoprotéine
ARNi :	ARN interférents
BSA :	Albumine de sérum bovin
CHIKV :	virus chikungunya
CLR :	C lectine-like receptor
CRISPR :	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CVB3 :	coxackie virus B3
db :	double brin
DENV :	virus de la dengue
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
GFP :	green fluorescente protéine, protéine fluorescente verte
HCV :	virus de l'hépatite C
IFN :	interféron
IL :	interleukine
ISG :	interferon-stimulated gene, gène stimulé par l'interféron
ISRE :	interferon-stimulated response element
JEV :	japanese encephalitis virus, virus de l'encéphalite japonaise
kDa :	kilodalton
KO :	knock out
MDA5 :	melanoma differentiation-associated gene 5
MOI :	multiplicity of infection
NI :	non infecté
NLR :	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor
NS :	non structurale
NT :	non targeting
OMS :	organisation mondiale de la santé
PAMPs :	pathogen-associated molecular pattern
pb :	paire de bases
PI(4)P :	phosphatidylinositol-4-phosphate
PRR :	pattern recognition receptor
PSB :	phosphate saline buffer

RE :	réticulum endoplasmique
RIG-I :	Retinoic acid-inducible gene I
RLR :	Retinoic acid-inducible gene I-like receptor
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR :	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
sb :	simple brin
SVF :	sérum de veau fétal
TBEV :	tique borne encephalitis, virus de l'encéphalite à tique
TLR :	Toll-like receptor
UTR :	untranscribed region, région non transcrite
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
VSV :	virus de la stomatite vésiculaire
WNV :	west nil virus, virus du nil occidental
WT :	wild type, sauvage
YFV :	yellow fever virus, virus de la fièvre jaune
ZIKV :	virus Zika

Introduction

Introduction

I. Le virus Zika, une arbovirose majeure

1. Distribution du virus Zika et autres arbovirus dans le monde

a. Les Arboviroses dans le monde

Les arbovirus (*arthropod-borne viruses*) sont des virus qui se transmettent obligatoirement par un vecteur *arthropode* et sont parfois à l'origine d'une pathologie chez l'homme, appelée arbovirose. Les vecteurs sont principalement des moustiques, des tiques et des moucherons et transmettent le virus lors d'un repas sanguin. Dans une forte proportion des cas, le mammifère développera une pathologie. Les arbovirus appartiennent à une grande variété de familles virales. À ce jour, plus de 500 virus ont été caractérisés comme étant rattachés à ce groupe (CDC, 2020). Toutefois, seulement une cinquantaine est décrite comme pathogène pour certains animaux (dont l'homme)(Hubálek et al., 2014). Le **tableau 1** regroupe les arbovirus les plus pathogènes pour l'homme ou les animaux domestiques.

Les arbovirus sont actuellement à l'origine d'un problème de santé publique majeur. De nombreuses arboviroses ont émergé ou ré-émergé ces dix dernières années, touchant particulièrement l'hémisphère sud (Leta et al., 2018) (**Figure 1**). Les virus responsables des arboviroses les plus virulentes à l'heure actuelle sont les virus de la fièvre jaune (YFV), de la dengue (DENV), le virus Chikungunya (CHIKV) ainsi que le virus Zika (ZIKV) (**Figure 1**). Tous ces virus sont transmis principalement par les moustiques du genre *Aedes*. Ci-dessous sont détaillées les caractéristiques principales de ces arboviroses. Faisant l'objet de cette étude, le virus Zika sera détaillé dans la suite de l'introduction.

Genre	Famille virale	Génome	Enveloppe	Principaux Virus	Principaux hôtes	Principaux vecteurs
<i>Asfviridae</i>	<i>Asfivirus</i>	ADNdb	oui	ASFV	Sangliers et cochons domestiques ou sauvages	Tiques du genre: <i>Ornithodoros</i>
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Bunyavirus</i>	ARN sb (-)	oui	Virus Bunyamwera	Ruminants sauvages ou bétail	Moustiques des genres: <i>Culex</i> , et <i>Aedes</i>
	<i>Nairovirus</i>			CCFV		
	<i>Phlebovirus</i>			RVFV		
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	ARN sb (+)	oui	ZIKV, YFV, DENV 1-4, WNV, JEV, TBEV	Primates (dont homme), oiseaux et cochons	Moustiques des genres: <i>Haemagogus</i> , <i>Culex</i> et <i>Aedes</i> Tiques du genre : <i>Ixodes</i> <i>Hemaphysalis</i> et <i>Dermacentor</i>
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Thogotovirus</i>	ARN sb(-)	oui	Virus Thogoto	Bétail, chameaux	Tiques des genres: <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i> et <i>Boophilus</i>
<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	ARN db	non	BTV	Ruminants sauvages ou bétail	Moucheron du genre: <i>Culicoides</i>
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	ARN sb (+)	oui	CHIK, RRV, SFV, ONNV, VEEV, Mayao	Rongeurs sauvages, chevaux, cochons et homme	Moustiques des genres: <i>Culex</i> , <i>Mansonia</i> , <i>Anopheles</i> et <i>Aedes</i>

Tableau 1. Principaux arbovirus pathogènes pour l'homme et les animaux domestiques. Abréviations utilisées : ASFV, *African swine fever virus* ou virus de la peste porcine africaine ; CCFV, virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo ; RVFV, virus de la fièvre de la vallée du Rift ; ZIKV, virus Zika ; YFV, virus de la fièvre jaune ; DENV 1-4, virus de la dengue (4 sérotypes) ; WNV, virus du Nil occidental ; JEV, virus de l'encéphalite japonaise ; TBEV, virus de l'encéphalite à tique ; BTV, *Bluetongue virus* ou virus de la fièvre catarrhale ovine ; VSV, virus de la stomatite vésiculeuse ; CHIKV, virus chikungunya ; RRV, virus de la Rivière Ross ; SFV, virus de la forêt Semliki ; ONNV, virus O'Nyong-Nyong ; VEEV, virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (Hubálek et al., 2014).

Le virus de la fièvre jaune a été le premier arbovirus décrit comme pouvant être transmis à l'homme par le biais du vecteur *Aedes aegypti* (Reed, 1902). Pour ce virus, nous disposons d'un vaccin efficace chez l'homme. Il est important de noter qu'il existe également des vaccins contre d'autres *Flavivirus* que sont le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) et le virus de l'encéphalite à tique (TBEV) (Ishikawa et al., 2014). Pour le virus de la fièvre jaune, s'agit d'un vaccin vivant atténué issu de la souche Asibi qui a pu être obtenu après passages successifs sur des macaques, puis sur des tissus embryonnaires de souris et enfin sur embryons de poulet, utilisés dans un premier temps, dans leur intégralité puis décérébrés (Barrett, 2017). La phase d'infection se caractérise par des symptômes grippaux et peut évoluer dans 20 % des cas vers une jaunisse ou une insuffisance rénale ou hépatique. Dans les cas symptomatiques, le taux de mortalité peut atteindre 50 % (Chen and Wilson, 2020). A l'heure actuelle, 34 pays d'Afrique et 13 pays d'Amérique du Sud sont considérés comme régions endémiques. L'OMS estimait en 2013 que le virus était à l'origine de 200 000 cas de fièvre jaune par an et 30 000 décès avec une majorité des cas concentrés en Afrique (90 %) (WHO 2020a). Depuis 2015, une réémergence a pu être observée, avec notamment une épidémie en Angola s'étendant à la République Démocratique du Congo et un nombre de cas en très forte augmentation au Nigéria ces dernières années (Kraemer et al., 2017 ; WHO 2019). L'Amérique du Sud a aussi été touchée, avec de nombreux cas au Brésil dûs à une faible couverture vaccinale. Cependant l'absence de l'établissement du cycle de transmission urbain a pu prévenir une épidémie de plus grande ampleur (Faria et al., 2018 ; Silva et al., 2020).

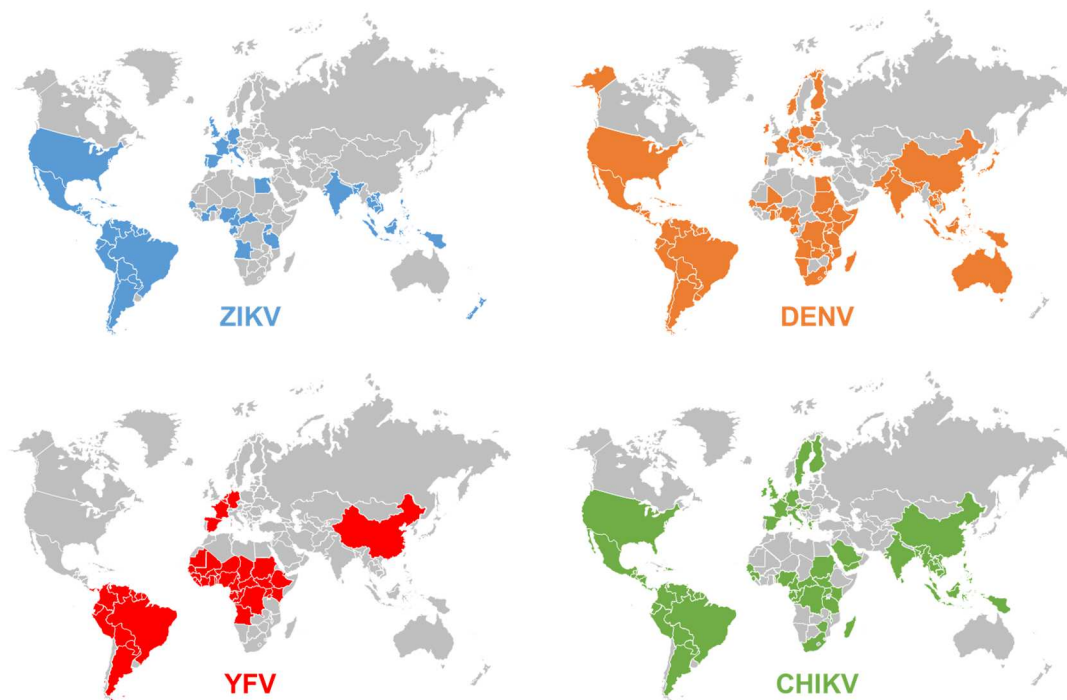


Figure 1. Distribution des arboviroses majeures dans le monde. En couleur sont représentés les pays pour lesquels ont été recensés des cas pour les différents arbovirus, qu'il s'agisse de cas avec transmission par un vecteur autochtone ou de cas importés par mouvements de population humaine. (Leta et al., 2018)

Le virus de la dengue est responsable de l'arbovirose la plus répandue dans le monde avec une estimation par l'OMS en 2018 de 390 millions d'infections par an. Sur le total d'individus infectés, 500 000 ont besoin d'hospitalisation et 20 000 personnes meurent chaque année. Il touche principalement l'Asie et l'Amérique du Sud (WHO 2018). Il existe 4 sérotypes différents pour le virus de la Dengue. Pour la majorité des malades, les symptômes sont comparables à un syndrome grippal. Dans certains cas, l'individu va développer une forme sévère de la maladie dite hémorragique qui peut être favorisée s'il a été précédemment infecté par un autre sérotype du virus. Cependant l'infection par un sérotype donné va conférer une immunité spécifique contre ce sérotype (Izmirly et al., 2020).

Le virus Chikungunya, contrairement aux deux virus décrits précédemment, n'est pas un *Flavivirus* mais un *Alphavirus*. Ce virus est à l'origine de douleurs articulaires modérées à sévères. Par ailleurs, les douleurs peuvent devenir chroniques et entraîner une importante invalidité (van Aalst et al., 2017). La première épidémie rapportée a eu lieu en Tanzanie entre 1953 et 1954 (Robinson, 1955). Entre 2004 et 2007, le virus a réémergé au Kenya et s'est propagé à différentes îles de l'océan Indien (Kariuki Njenga et al., 2008). Cette épidémie a touché en 2005 l'île de la Réunion, infectant environ 34 % de la population. Durant cette épidémie, une mutation est apparue dans l'une des protéines d'enveloppe du virus, ce qui lui a permis d'être transmis par le moustique *Aedes albopictus*. Cette capacité a joué un rôle indéniable pour favoriser la dissémination de CHIKV (Tsetsarkin et al., 2007 ; Stapleford et al., 2014).

b. La découverte du virus Zika

Le virus Zika (ZIKV) a été isolé pour la première fois en 1947, dans la forêt Zika en Ouganda, chez un singe Rhésus. Quelques mois plus tard, il est retrouvé chez un moustique *Aedes africanus*, mettant en évidence sa transmission vectorielle (Dick et al., 1952). Les premières caractérisations de la maladie dûe à ZIKV ont été faites en 1954. Le virus a été directement isolé à partir d'un patient infecté pour la première fois au Nigeria (MacNamara, 1954). Ce n'est qu'en 1966 que ZIKV est détecté sur le continent asiatique, en Malaisie, chez un moustique *Aedes aegypti*, montrant dans le même temps que le virus peut être transmis par ce vecteur, présent en zone rurale comme en zone urbaine (Marchette et al., 1969). Toutefois, à cette période, aucun cas de maladie lié à la circulation de ZIKV n'a été recensé en Asie.

c. Rôle du vecteur dans la dissémination

Les vecteurs arthropodes femelles vont transmettre les arbovirus à un hôte vertébré lors d'un repas sanguin qui leur est indispensable pour permettre la maturation de leurs œufs. Ils vont jouer un rôle

décisif pour la dissémination des virus. Les seuls arthropodes non insectes sont les tiques qui appartiennent à la classe des arachnides et à la sous-classe des acariens. Le vecteur qui est à l'origine de la transmission du nombre le plus important de virus est le moustique. Néanmoins, parmi les plus de 3500 espèces décrites, moins de 100 permettent la transmission de pathogènes dangereux pour l'homme. Malgré cette équation, le moustique reste l'animal responsable de la plus grande mortalité indirecte chez l'homme (Harbach and Besansky, 2014).

Selon les virus, le cycle de transmission sera plus ou moins complexe et impliquera plus ou moins d'hôtes intermédiaires. Pour le virus Zika, le cycle de transmission peut être détaillé en trois composantes différentes (Young, 2018 ; Vasilakis and Weaver, 2017). La **figure 2** représente ces différentes étapes. Le cycle sylvatique dit enzootique, se déroule dans la forêt tropicale et a surtout été décrit en Afrique. Il maintient le virus entre le vecteur et les animaux sauvages. Dans le cas de ZIKV, les moustiques du genre *Aedes* vont transmettre le virus à des primates non-humains notamment à des macaques, babouins ou singes mangabey. Au total, ZIKV a été détecté chez une vingtaine d'espèces de primate (Valentine et al., 2019).

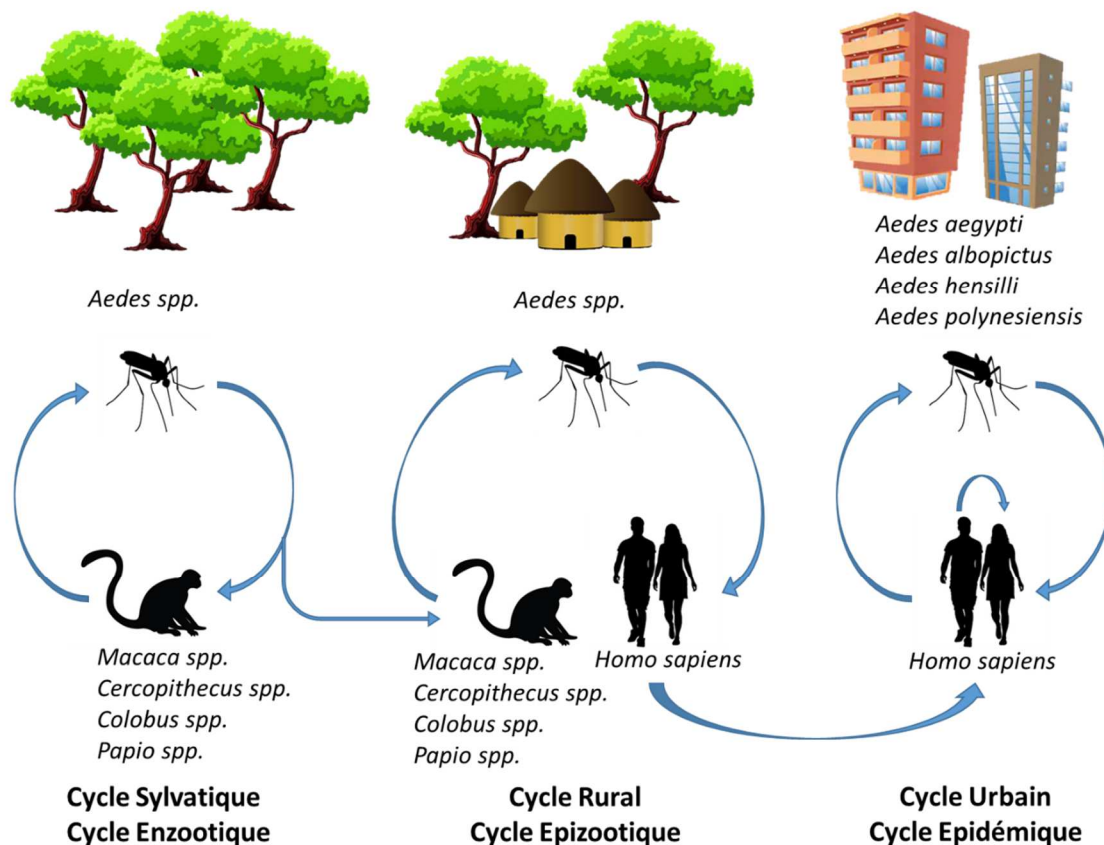


Figure 2. Cycle de transmission de ZIKV. Trois types de cycles sont impliqués dans la transmission du virus Zika. Sont indiquées les espèces de moustiques et de primates nécessaires au maintien de ces cycles. Spp signifie plusieurs espèces. (Richard et al. 2016 ; Ledermann et al. 2014 ; Valentine et al. 2019)

Ce cycle peut évoluer vers un cycle épizootique, ou cycle rural, si le vecteur se nourrit et transmet le virus à un animal domestique ou un être humain présent en zone d'émergence située en bordure de forêt. Vient ensuite le cycle urbain, durant lequel une personne ou un animal domestique infecté se rend en zone urbaine où il va jouer le rôle d'hôte amplificateur et permettre, par l'intermédiaire du vecteur urbain, la transmission du virus à une autre personne. Lors de ce cycle, le moustique anthropophile *Aedes aegypti* semble être le principal vecteur responsable de la transmission du virus Zika (Guerbois et al., 2016). Cependant, il a été suggéré que d'autres moustiques du genre *Aedes* pourraient jouer ce rôle (Richard et al., 2016 ; Ledermann et al., 2014). Il est important de noter que le virus Zika peut également se maintenir dans la population vectorielle par transmission verticale de la femelle à sa progéniture (Costa et al., 2018).

Transmission inter-humaine. Une fois introduit dans la population humaine, ZIKV, contrairement à d'autre *Flavivirus*, peut être transmis d'homme à homme. Le premier cas de transmission sexuelle a été rapporté en 2011 (Foy et al.). Ce mode de transmission pourrait être responsable de 3 % des cas (Gao et al., 2016). Il apparaît également qu'il y a eu transmission suite à des transfusions sanguines réalisées lors de l'épidémie au Brésil en 2016 (Motta et al., 2016).

La transmission du virus de la mère à l'enfant est également possible. On distingue deux cas. Tout d'abord, une transmission trans-placentaire a été mise en évidence chez de nombreuses femmes enceintes (Grishott et al., 2016). Le virus a été détecté dans le liquide amniotique, le placenta, le cerveau du fœtus et le cordon ombilical (Calvet et al., 2016 ; Martines, 2016 ; Driggers et al., 2016). Pour finir, la transmission via l'allaitement maternel a aussi été démontrée. En effet, plusieurs études montrent que le virus peut être présent dans le lait maternel et peut se retrouver au niveau des glandes mammaires (Dupont-Rouzeyrol et al., 2016 ; Sotelo et al. 2017 ; Hubert et al., 2019). Cependant, malgré sa présence dans le lait, la transmission du virus via cette route reste très questionnée. L'ONU préconise tout de même que les mères susceptibles d'être infectées continuent l'allaitement car les avantages de celui-ci serait supérieur au risque de transmission de ZIKV (Mann et al., 2018 ; Hemachudha et al., 2019).

d. Distribution de ZIKV dans le monde et récentes épidémies

Depuis sa découverte en 1947, les cas de maladie dûs à ZIKV n'étaient que sporadiques. C'est en 2007 que la première épidémie a été recensée sur l'île de Yap, dans les états fédérés de Micronésie, pendant laquelle il a été estimé que 73 % de la population avait été infectée (Duffy et al., 2009). La seconde épidémie de grande ampleur a touché la Polynésie Française 6 ans plus tard, en 2013. Jusqu'en 2014, l'épidémie s'est étendue dans l'océan pacifique touchant la Nouvelle Calédonie, les îles Cook et les îles

Salomon (Musso et al., 2015 ; Derraik and Slaney, 2015). Puis, en début d'année 2015, l'épidémie a touché le Brésil (Zanluca et al., 2015). Avant la fin 2016, plus de 200 000 cas brésiliens avaient été recensés (Lowe et al., 2018). Enfin, le virus s'est propagé sur le continent Américain dans 25 pays (PAHO, 2016) (**Figure 3**).

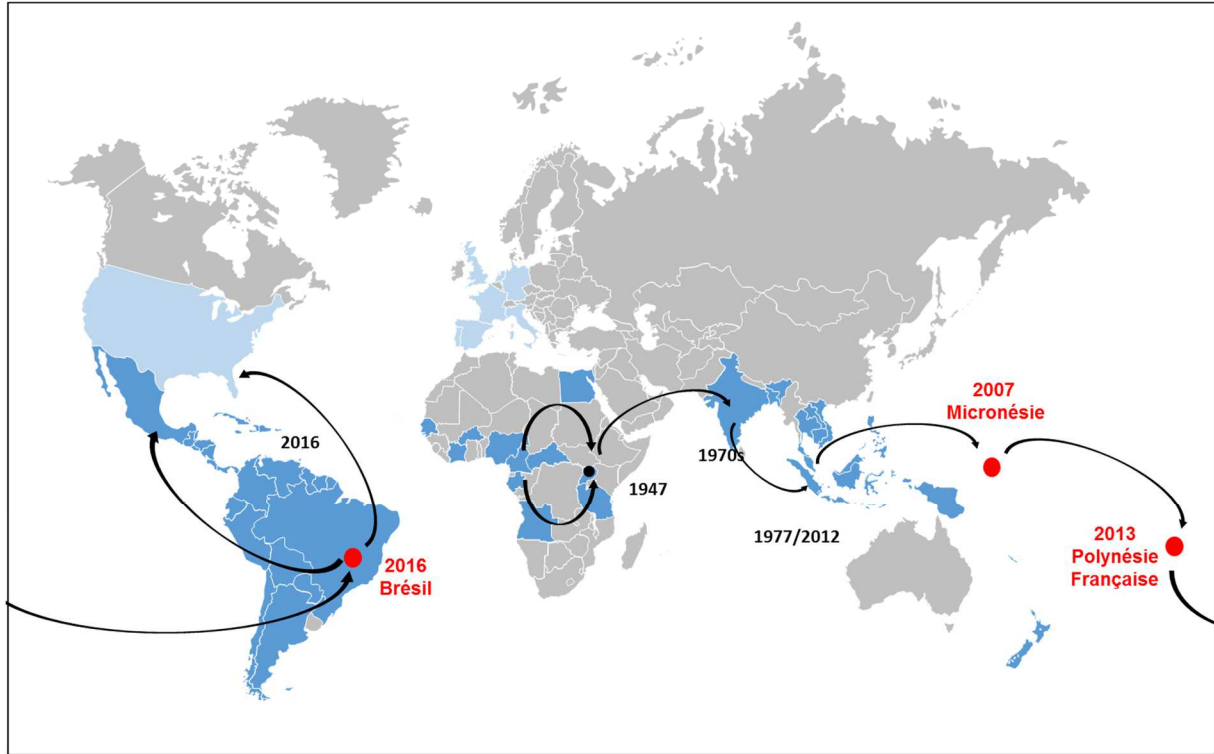


Figure 3. Distribution de ZIKV dans le monde et épidémies majeures. En bleu foncé sont représentés les pays pour lesquels des cas de transmission du virus Zika par un vecteur autochtone ont été recensés. En bleu clair figurent les cas importés liés à des voyages. Le point noir permet de localiser la première isolation du virus et les points rouges les lieux des épidémies de grande ampleur.

e. Évolution génétique de ZIKV

Un seul sérotype est décrit pour le virus Zika. Cependant, depuis sa découverte en Ouganda, le virus a évolué et l'on retrouve à l'heure actuelle deux lignages différents (**Figure 4**). Le lignage Africain est le plus ancien, il contient notamment la souche MR766 issue de la première isolation. Il apparaît que les différentes souches du lignage asiatique, y compris les virus isolés en Amérique du sud et Amérique centrale, dérivent toutes d'une même souche isolée en 1966 en Malaisie (Ye et al., 2016). Cependant, certains auteurs considèrent qu'il existe un lignage américain ou sous-lignage, dérivant du lignage asiatique (Gubler et al., 2017).

Tous les virus ayant provoqué l'établissement d'une épidémie proviennent du lignage asiatique. Les deux lignages principaux divergent sur plusieurs points pouvant expliquer leurs différences

phénotypiques. En effet, bien que les deux lignages permettent tous deux la mise en place d'une réponse immunitaire innée, les souches asiatiques semblent induire plus fortement la production d'interféron que les souches africaines. (Österlund et al., 2019).

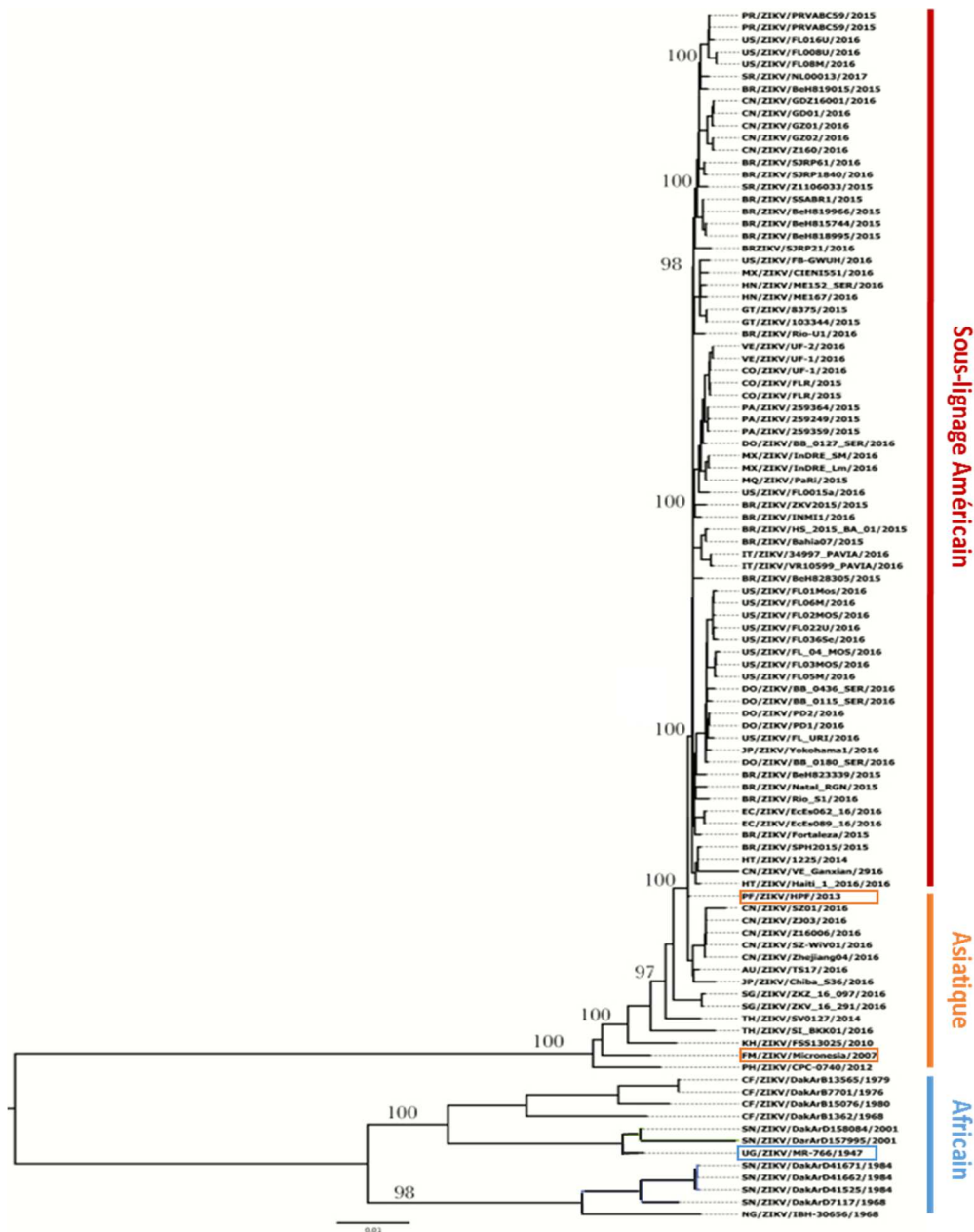


Figure 4. Évolution génétique de ZIKV. Arbre phylogénétique construit sur 93 séquences codantes entières d'après la méthode du maximum de vraisemblance. En bleu est représenté les souches issues du lignage africain (encadrée figure la première souche isolée), en orange les souches du lignage asiatique (encadrée figure les souches isolées durant les épidémies de Micronésie et Polynésie Française), en rouge les souches du sous-lignage américain. Adapté de Gubler et al. 2017

Par ailleurs, une étude a montré que les séquences codantes des lignages asiatique et africain divergent de 75 à 100 acides aminés, alors que celles des souches issues du lignage asiatique et du sous-lignage américain ne varient que de 10 à 30 acides aminés, suggérant qu'un faible nombre de mutations peuvent avoir un réel impact phénotypique (Smith et al., 2018). Il a aussi été mis en évidence qu'une seule substitution dans la polyprotéine au niveau de la région prM était suffisante pour favoriser la neurovirulence du virus Zika chez la souris. Cela aurait eu pour conséquence une importante augmentation du nombre de cas de microcéphalies et autres malformations congénitales lors de l'épidémie qui a récemment touché le continent Américain (Yuan et al., 2017a). Pour finir, une mutation de la protéine NS1 a été identifiée chez une souche épidémique du lignage asiatique. Cette mutation permet à NS1 de se lier à TBK1, protéine impliquée dans la voie de signalisation de l'interféron, et ainsi contrecarrer la réponse antivirale. Cette mutation est suffisante pour augmenter la neurovirulence d'une souche non épidémique de ZIKV chez la souris (Xia et al., 2018a).

2. Biologie moléculaire du virus Zika

a. Structure de ZIKV

Le virus Zika appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. Le virus Zika possède la même organisation structurale que les autres *Flavivirus* comme le virus du Nil Occidental ou le virus de la dengue (Kostyuchenko et al., 2016 ; Sirohi et al., 2016). Les virions produits sont sphériques, de diamètre d'environ 50 à 60 nm. Ils sont enveloppés et possèdent 180 glycoprotéines d'enveloppe (E) associées à 180 protéines de membrane (M) enchâssées au niveau de leur domaine transmembranaire sur la bicouche lipidique de la membrane de la particule. Les protéines E et M sont organisées de telle façon que le virion possède une structure icosaédrique et est composé de 30 « rafts », eux-mêmes formés par trois dimères de protéines E (**Figure 5**). Une étude récente a montré que les virions des *Flavivirus* pouvaient présenter une morphologie variée. En effet, à haute température, des virions de DENV-3 présentent une structure non sphérique, appelée « club-shaped particules », composée d'une queue cylindrique et d'une tête en forme de disque (Morrone et al., 2020).

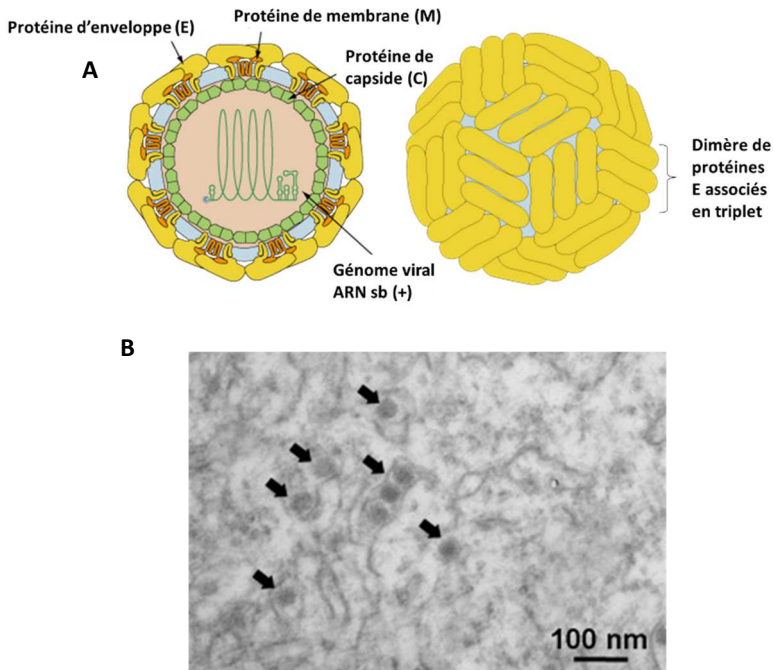


Figure 5. Structure de la particule virale de ZIKV. (A) Structure d'un virion de Flavivirus. Les protéines E et M forment l'enveloppe de la particule. La protéine C, arrangée en icosaèdre forme la capside qui renferme le génome viral (Adapté de Viralzone). (B) Image de microscopie électronique par transmission de fibroblastes primaires infectés par le virus Zika. Les flèches noires indiquent les particules virales (Hamel et al. 2015).

Le virus Zika possède un génome simple brin à ARN de polarité positive de 10,8 kilobases. Il contient un seul cadre ouvert de lecture flanqué à ses deux extrémités de régions non traduites : 5'UTR et 3' UTR, respectivement de 106 et 428 pb. À l'extrémité 5' du génome, une coiffe de type I (m7Gppp) est présente. Cette structure est nécessaire pour l'initiation de la traduction de la polyprotéine ainsi que pour protéger le génome de la dégradation (Zhou et al., 2007 ; Coutard et al., 2017). L'extrémité 3' du génome des *Flavivirus* ne possède pas de queue polyA mais une séquence très riche en structures secondaires (Brinton et al., 1986). La polyprotéine synthétisée lors de la traduction du génome va être clivée par des protéases cellulaires et virales pour permettre la production de 10 protéines virales. Ainsi, on retrouve 3 protéines structurales qui permettront la formation de la particule virale et 7 protéines non-structurales qui seront indispensables à la réplication (**Figure 6**).

La protéine de capsid (C) est une des protéines structurales (**Tableau 2**). Elle est présente en homodimère et possède, d'une part, un domaine d'interaction avec l'ARN viral et, d'autre part, un domaine lui permettant d'interagir avec la membrane lipidique de la particule (Shang et al., 2018). La protéine précurseur de membrane, prM, est enchâssée sur cette membrane lipidique et sera clivée après l'assemblage du nouveau virion pour permettre la formation d'une particule mature. La troisième protéine dite structurale est la protéine d'enveloppe (E) qui est associée à prM. Elle est majoritairement impliquée dans l'attachement du virion et la fusion membranaire nécessaire à

l'entrée du virus dans la cellule. Par ailleurs, des anticorps dirigés contre la protéine E peuvent, *in vitro* et *in vivo*, neutraliser le virus (Dai et al., 2016).

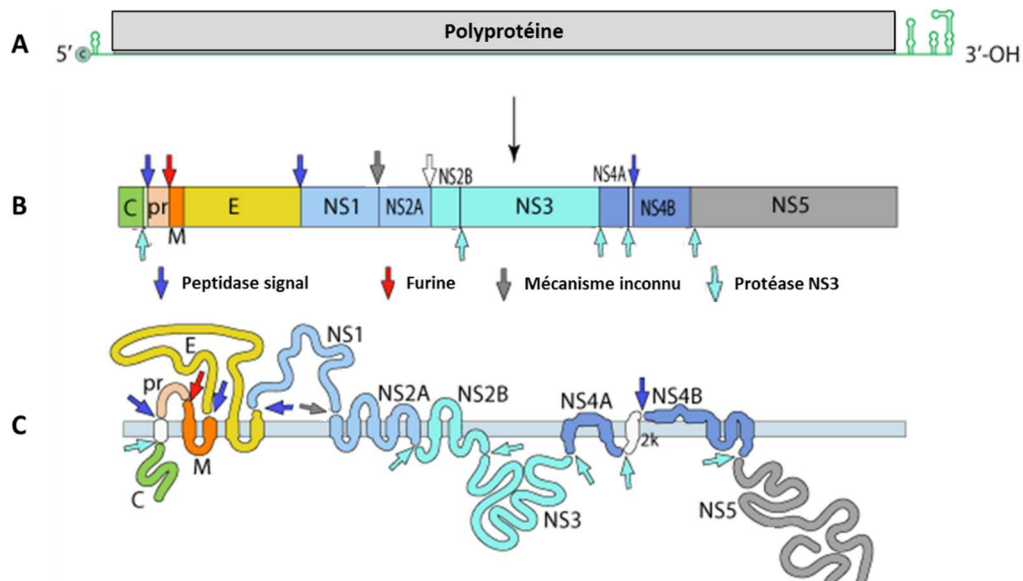


Figure 6. Structure génomique de ZIKV. (A) Structure du génome codant pour la polyprotéine virale. (B) Sites de clivage de la polyprotéine par la protéase NS3 ou par des protéases cellulaires. (C) Arrangement des protéases virales sur la membrane du RE et sites de clivage par les protéases. Adapté de Viralzone (<https://viralzone.expasy.org>)

La séquence codant pour les 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) est localisée en 3' du génome viral. Ces protéines jouent toutes un rôle indispensable lors de l'infection virale (**Tableau 2**). La protéine NS1 est la seule à être sécrétée. Elle est importante pour la réplication virale mais aussi la traduction et la production de la particule (sous sa forme de dimère) (Rastogi et al., 2016). Les protéines NS1, NS2B/3, NS4 et NS5 sont impliquées, quant à elles, dans le contrôle de la réponse immunitaire innée (Nelson et al., 2019). Ces mécanismes d'évasion seront détaillés dans le paragraphe III.2.b. La protéine NS3, qui a pour co-facteur la protéine NS2B, est une protéase qui permettra en partie le clivage de la polyprotéine. Pour finir, NS5 est une méthyl-transférase qui sera nécessaire pour la mise en place de la coiffe en 5' du génome mais également une polymérase ARN - ARN dépendante qui permettra la réplication du génome viral (Zhao et al., 2017).

	Type	Taille (aa)	Localisation	Activité enzymatique	Fonction durant le cycle de réplication	Contrôle de la réponse immunitaire
C (Capside)	Structurale	122	Cytoplasme	Non	Formation de la nucléocapside	Non décrit pour ZIKV, rôle décrit pour WNV et DENV
PrM (Membrane)	Structurale	178	Cytoplasme	Non	Formation de l'enveloppe de la particule, rôle dans la fusion	Non décrit pour ZIKV, rôle décrit pour WNV et DENV
E (Enveloppe)	Structurale	500	Cytoplasme	Non	Formation de l'enveloppe de la particule, rôle dans l'attachement, la fusion et l'entrée	Non décrit
NS1	Non - Structurale	384	Cytoplasme Secrétée	Non	Rôle dans le bourgeonnement et la réplication, nécessaire pour la virulence, réarrangement des membranes du RE	Inhibition du complément et de la voie de signalisation RLR via interaction avec TBK1
NS2A	Non - Structurale	226	Cytoplasme	Non	Rôle dans la transcription et l'assemblage, réarrangement des membranes du RE	Non décrit pour ZIKV, rôle décrit pour WNV et DENV
NS2B	Non - Structurale	130	Cytoplasme	Non	Co-facteur de NS3	Avec NS3, inhibition de la détection de l'ADN cytoplasmique via le clivage de STRING
NS3	Non - Structurale	617	Cytoplasme	Oui	Rôle d'hélicase nécessaire à la réplication, protéase nécessaire au clivage de la polyprotéine	Avec NS2B, inhibition de la détection de l'ADN cytoplasmique via le clivage de STRING
NS4A	Non - Structurale	127	Cytoplasme	Non	Constituant du complexe de réplication, réarrangement des membranes du RE	Inhibition de la voie RLR via attachement à MAVS
NS4B	Non - Structurale	252	Cytoplasme	Non	Constituant du complexe de réplication, réarrangement des membranes du RE	Non décrit pour ZIKV, rôle décrit pour YFV, WNV et DENV
NS5	Non - Structurale	902	Cytoplasme Noyau	Oui	Réplication du génome virale, synthèse de la coiffe	Inhibition de la production d'interféron via la dégradation de STAT2, inhibition de la voie RLR via attachement à TBK1

Tableau 2. Les protéines virales et leurs rôles. Présentation des différentes protéines virales et de leurs fonctions durant le cycle de réplication ainsi que dans le contrôle de la réponse immunitaire par le ZIKV. RE : réticulum endoplasmique. (Neufeldt et al., 2018 ; Javed et al., 2018 ; Xia et al., 2018 ; Conde et al., 2016 ; Ding et al., 2018 ; Ma et al., 2018 ; Chatel-Chaix et al., 2016 ; Grant et al., 2016 ; Lin et al., 2019)

b. Cycle de réplication

Chez les *Flavivirus* quelques différences lors du cycle de réplication existent, notamment en ce qui concerne l'entrée. Cependant, ils partagent une stratégie de réplication similaire. Les observations faites pour l'un sont souvent extrapolées aux autres. Les étapes de réplication des *Flavivirus* dans les cellules de mammifère sont détaillées dans les paragraphes ci-dessous et dans la **figure 7**.

Attachement et entrée. L'entrée des *Flavivirus* dans la cellule hôte se fait, dans un premier temps, par la reconnaissance des glycoprotéines d'enveloppe par des facteurs d'attachement présent à la surface cellulaire. Leur rôle est de concentrer les virions à la surface des cellules pour faciliter leur internalisation par le récepteur. Plusieurs facteurs ont été décrits comme jouant un rôle pour l'attachement du virus de la Dengue. Les héparanes sulfates semblent important, ainsi que DC-SIGN qui lui, joue un rôle lors de l'infection des cellules dendritiques (Chen et al., 1997 ; Tassaneetrithep et al., 2003). Pour le virus Zika, le rôle des héparanes sulfates dans l'attachement est discuté (Gao et al., 2019). Cependant, les protéines de la famille TIM et TAM (TYRO3 et AXL), qui régulent la suppression des cellules apoptotiques, apparaissent être des récepteurs spécifiques pour ces deux virus. Elles permettent la reconnaissance des phosphatidylsérines exposées à la surface des virions et vont permettre leur internalisation (Meertens et al., 2012 ; Hamel et al., 2015). Par ailleurs, AXL joue également un rôle dans le contrôle de la réponse antivirale lors de l'infection des cellules microgliales. En effet, AXL possède une activité de kinase qui sera activée lors de son interaction avec ZIKV. Cette activité est nécessaire à l'inhibition de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Bhattacharyya et al., 2013 ; Meertens et al., 2017). La présence des facteurs d'attachement et de récepteurs d'entrée va déterminer le tropisme du virus. Le récepteur AXL est exprimé à la surface des cellules microgliales et astrocytaires, ce qui explique le neurotropisme de ZIKV (Meertens et al., 2017). Ce neurotropisme a également été validé sur un modèle murin (Li et al., 2016). De plus, il a été mis en évidence que ZIKV infecte et induit l'apoptose des progéniteurs neuronaux. Il infecte cependant, dans une moindre mesure, les neurones matures (Dang et al., 2016 ; Tang et al., 2016). Le virus est également détectable au niveau de l'appareil reproducteur de la femme comme de l'homme (Murray et al., 2017 ; Barzon et al., 2016). ZIKV peut aussi être observé au niveau d'autres tissus comme les yeux et le placenta (Miner and Diamond, 2017).

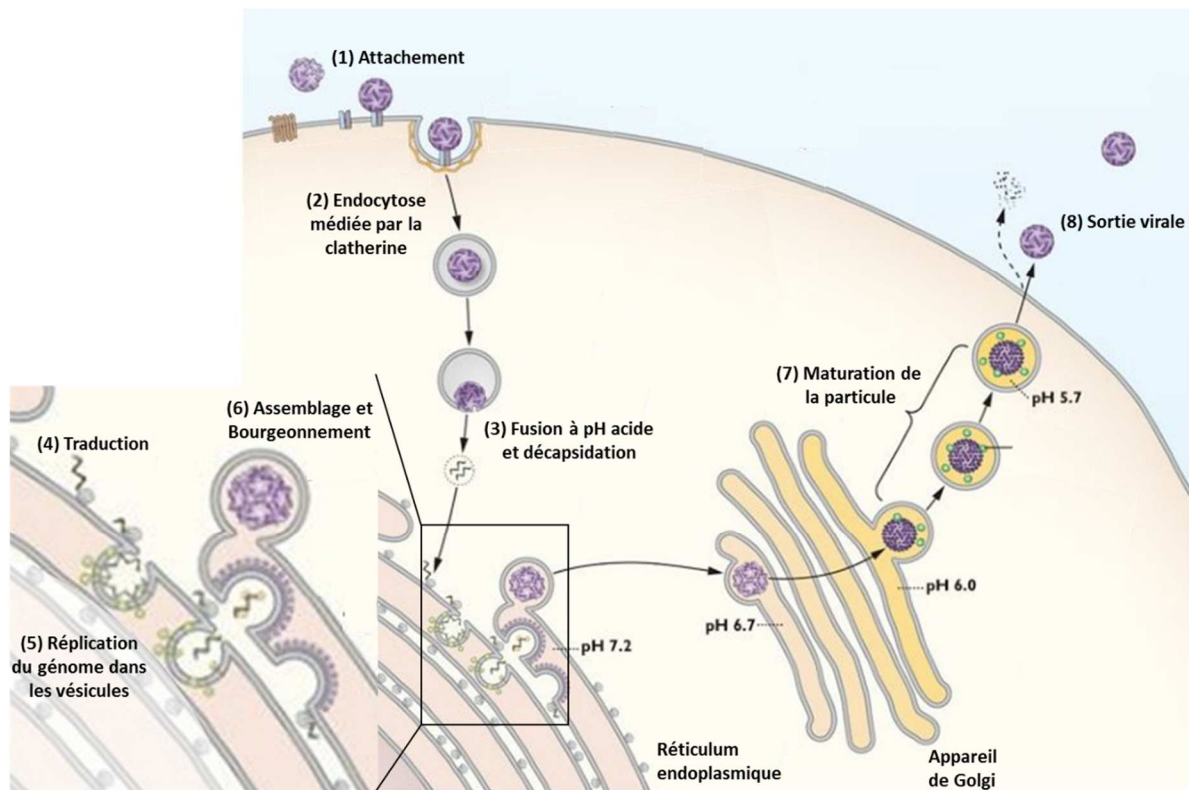


Figure 7. Cycle de réplication de ZIKV. (1) Attachement à la surface cellulaire via des facteurs spécifiques. (2) Endocytose médiée par la clathrine. (3) Fusion de la membrane de la particule à la membrane de l'endosome tardif dans un contexte d'acidification du pH et décapsidation. (4) Traduction de la polyprotéine à la surface du RE. (5) Réplication du génome viral au niveau d'invagination présente sur la membrane du RE. (6) Assemblage, encapsidation et bourgeonnement de la particule à la membrane du RE. (7) Maturation du virion dans l'appareil de Golgi et clivage du domaine pr de prM. (8) Sortie du virion par exocytose et relargage du domaine pr de prM. Adapté de Fields, sixth edition, 2013

Endocytose, fusion et décapsidation. Après l'attachement, les particules virales vont entrer dans la cellule via leur récepteur. Pour le virus Zika, l'entrée se fait par endocytose dépendante de la clathrine (Persaud et al., 2018 ; Rinkenberger and Schoggins, 2019). La maturation de l'endosome précoce en endosome tardif est accompagnée d'une acidification du pH à l'intérieur de la vésicule. La protéine E des *Flavivirus* est une glycoprotéine de classe II. Une fois au contact du pH acide de l'endosome tardif, les dimères de protéines E vont se dissocier et exposer à la surface de la particule la boucle de fusion. L'exposition de ce domaine va permettre la fusion de la membrane du virion à la membrane de l'endosome (Kaufmann and Rossmann, 2011). Ce mécanisme permet la libération de la capside dans le cytoplasme. Vient alors l'étape de décapsidation pour permettre le relargage du génome, cependant cette étape est encore très mal décrite à l'heure actuelle.

Traduction. Le génome des *Flavivirus* étant composé d'une molécule d'ARN de polarité positive, la traduction se fait dès la décapsidation. Au niveau de la coiffe, en 5', des facteurs cellulaires vont être recrutés et vont permettre l'initiation de la traduction avec le recrutement des ribosomes. Cette initiation coiffe dépendante ne semble pas être l'unique stratégie adoptée par les *Flavivirus*. En effet, certaines études ont montré, pour le virus de la dengue et le virus Zika, que la traduction pouvait avoir lieu indépendamment de la coiffe. L'ARN viral ne possède pas d'IRES (*internal ribosome entry site*), cependant l'extrémité 5' semble jouer un rôle similaire (Edgil et al., 2006 ; Song et al., 2019). L'unique cadre de lecture est traduit par la machinerie cellulaire en une polyprotéine de 3419 acides aminés. Un peptide signal, présent à l'extrémité N-ter, va permettre l'adressage à la surface du réticulum endoplasmique (RE). La polyprotéine enchâssée sur la membrane du RE va alors être clivée en 10 protéines virales par la protéase/hélicase NS3, qui agit du côté cytoplasmique, et par la peptidase signal qui agit, elle, au niveau de la lumière du RE (**Figure 6C**).

Réplication du génome. Après traduction des protéines, des réarrangements et invaginations au niveau du RE sont observés, provoquant une augmentation de la surface membranaire. De façon dépendante du type cellulaire, les invaginations, ou vésicules de réplication, observées lors de l'infection par ZIKV vont varier d'un diamètre de 60 à 80 nm (**Figure 8**) (Rossignol et al., 2017 ; Cortese et al., 2017). Ces vésicules vont permettre de concentrer les facteurs cellulaires et viraux indispensables à la réplication mais également de protéger les différents composants viraux de la détection par le système immunitaire. Les protéines NS3 et NS5 sont au cœur du mécanisme de réplication du génome viral. Tout d'abord, NS5, la polymérase ARN - ARN dépendante va synthétiser un brin d'ARN négatif, utilisant le génome positif comme matrice et formant ainsi un intermédiaire double brin. NS5 va reconnaître la structure secondaire SLA présente en 5'UTR du génome qui agira comme promoteur (Lodeiro et al., 2009). Par ailleurs, les séquences 3' et 5'UTR possèdent des identités de séquence qui vont permettre la formation temporaire d'un génome circulaire (circularisation) qui sera nécessaire à la NS5 pour interagir avec l'extrémité 3'UTR et ainsi initier la synthèse du brin négatif (Ng et al., 2017). L'ARN db formé sera alors déroulé par l'activité hélicase de NS3 pour permettre la génération d'un brin positif d'une part et d'un brin négatif d'autre part. Le brin négatif servira alors de matrice pour une production importante de nouveaux génomes viraux (Xu et al., 2019). Des coiffes vont être synthétisées à l'extrémité 5' des génomes néosynthétisés grâce à l'activité triphosphatase de la protéine NS3 et aux activités méthyl-transférase et guanylyl-transferase de NS5 (Zhou et al., 2007 ; Saeedi and Geiss, 2013). Ce mécanisme de réplication est asymétrique et induit la synthèse d'une plus forte proportion d'ARN sb (+), ce qui permet une production de génomes à encapsider dans les nouvelles particules mais également de nombreuses matrices pour la synthèse des protéines virales.

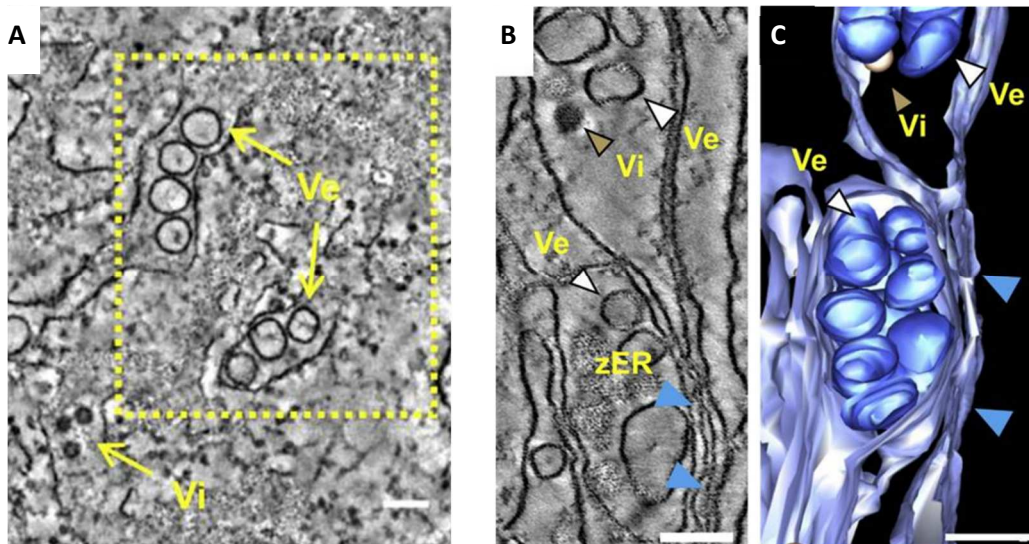


Figure 8. Invaginations du réticulum endoplasmique induites par ZIKV. (A) Progéniteurs neuronaux humains infectés par ZIKV, fixés 24h post-infection, inclus dans de la résine époxy et analysés par tomographie électronique. L'encadré jaune montre une zone de réarrangements du RE. (B) Hépatocytes Huh7 infectés par ZIKV, fixés 24h post-infection, inclus dans de la résine époxy et analysés par tomographie électronique. (C) Reconstitution 3D des structures observées en (B). Ve : vésicules formées par ZIKV dans le RE ; Vi : virion ZIKV ; flèche bleue/zER : zippered Endoplasmic reticulum (réarrangement du RE fréquemment observé lors de l'infection par ZIKV) ; Barre d'échelle 100nm. Adapté de Cortese et al. 2017

Encapsidation. L'encapsidation des génomes des *Flavivirus* est encore mal connue à ce jour, cependant certaines études nous permettent de penser qu'elle aurait lieu de façon concomitante à la réplication au niveau des invaginations du RE (Khromykh et al., 2001). L'interaction de la protéine de capsid avec l'ARN viral permet sûrement de favoriser cette étape (Shang et al., 2018).

Assemblage. L'assemblage du nouveau virion a lieu au niveau du RE. La nucléocapside (protéine C associée au génome viral) va bourgeonner dans la lumière du RE et ainsi acquérir son enveloppe composée d'une membrane lipidique recouverte des protéines E et prM ainsi que de phosphatidylsérines qui jouent un rôle clé dans l'entrée virale. L'assemblage est, là encore, très peu décrit. Il semblerait qu'il puisse faire également intervenir des facteurs cellulaires (Xu and Hobman, 2012). Le virion ainsi formé est une particule immature dont la structure a été résolue, pour le virus Zika, en 2017 (Prasad et al., 2017). Cette particule est composée d'un assemblage de triplets d'hétérodimères de protéine E et prM de façon à ce que la boucle de fusion de E soit protégée, évitant ainsi une fusion prématurée due à un éventuel changement de pH.

Maturation et exocytose. Une fois formée, la particule immature va transiter par l'appareil de Golgi où elle sera maturée grâce à deux phénomènes. Tout d'abord un changement de pH qui va induire un réarrangement des glycoprotéines. Ce changement va permettre l'exposition du site de clivage présent sur prM, ce qui aboutit à la seconde étape de maturation qui est le clivage par la furine du domaine pr

de prM. Ce domaine sera libéré dans le milieu extracellulaire lors de l'exocytose des virions (Yu et al., 2008). La sortie des virions se faisant par exocytose, elle n'est pas lytique dans la plupart des types cellulaires.

c. Maladie et symptômes

La première description des symptômes induits par le virus Zika a été faite en 1954 sur un jeune homme s'étant porté volontaire pour être infecté (Bearcroft, 1956). Il est important de noter que l'infection est asymptomatique dans environ 80 % des cas. L'infection symptomatique par le virus est, quant à elle, à l'origine d'un syndrome grippal associé à l'apparition de rougeurs mais aussi d'arthralgie, de myalgie et peut également provoquer des conjonctivites (Duffy et al., 2009). La période d'incubation est de 3 à 11 jours (Foy et al. 2020).

Durant les récentes épidémies, il a été mis en évidence que le virus Zika pouvait également être à l'origine de troubles neurologiques sévères. Le plus alarmant est l'association de l'infection avec l'apparition de malformations congénitales et de microcéphalies chez les nouveau-nés. La microcéphalie est définie chez un nouveau-né par une circonférence crânienne inférieure à la normale. Elle peut impliquer des troubles neurologiques sévères comme l'épilepsie, des infirmités motrices, cérébrales, des troubles de l'apprentissage, de l'audition ou de la vue. Pour certains des enfants, le développement sera entièrement normal (WHO, 2020b). Une étude rétrospective de l'épidémie de Polynésie Française a permis d'estimer le risque de microcéphalie à 95 pour 10 000 femmes infectées lors du premier trimestre de grossesse (Cauchemez et al., 2016). Pour l'épidémie ayant touché le Brésil, de nombreuses études montrent une très forte augmentation de la prévalence des microcéphalies (plus de 4700 cas diagnostiqués en 2015 contre 200 cas par an avant cette année). Toutefois nous devons nuancer ces chiffres qui semblent en partie surestimés, même s'il est indéniable que l'incidence de microcéphalies a au moins doublé sur cette période au Brésil (Victora et al., 2016).

Le syndrome de Guillain-Barré, autre trouble neurologique, a été décrit comme associé à l'infection par ZIKV. Ce syndrome est une maladie auto-immune qui affecte le système nerveux périphérique en induisant la démyélinisation des nerfs périphériques et qui peut être à l'origine de la paralysie des bras, jambes ou muscles du visage chez le patient malade. Dans 20 à 30 % des cas, les muscles thoraciques peuvent être atteints et être la cause de difficultés respiratoires. Pour finir, dans 2 à 3 % des cas, le syndrome de Guillain-Barré peut entraîner la mort (WHO, 2020c). Le premier cas associé à l'infection par le virus Zika a été décrit en 2013 lors de l'épidémie ayant touché la Polynésie Française. La fréquence d'apparition du syndrome de Guillain-Barré était alors 20 fois supérieure à la normale (Musso et al., 2014 ; Oehler et al., 2014b). L'augmentation des cas de Guillain-Barré a également été

observée dans sept pays d'Amérique du Sud et d'Amérique Centrale lorsque le virus Zika circulait entre 2015 et 2016 (dos Santos et al., 2016). Cette corrélation a également été observée au Brésil durant l'épidémie de 2015-2016 (Araujo et al., 2016).

d. Moyen de lutte contre ZIKV

A l'heure actuelle aucun traitement prophylactique n'a été mis au point. Cependant, les études se multiplient et, en 2018, il y avait déjà une quinzaine de candidats vaccins en essai clinique. Différentes pistes sont explorées notamment celles des vaccins ADN, inactivés, atténués ou sous-unitaires (Garg et al., 2018). En ce qui concerne les antiviraux, des anti-protéases dirigés contre NS2B-NS3 ont été très étudiés *in vitro* et *in vivo* (Yuan et al., 2017 ; Voss and Nitsche, 2020). Une autre cible virale souvent privilégiée est NS5. Certaines équipes se focalisent sur le développement de traitements ciblant des facteurs cellulaires nécessaires à la réplication virale (Baz and Boivin, 2019).

Enfin, la lutte anti-vectorielle est elle aussi considérée sérieusement avec différentes stratégies mises en place dans les régions endémiques. Les moyens les plus simples mis en œuvre sont l'élimination des gîtes larvaires ou le développement de protections personnelles pour éviter les contacts avec les moustiques. L'utilisation d'insecticides est elle aussi très répandue avec le dichlorodiphényl-trichloroéthane (DDT). Toutefois, cette stratégie connaît des limites avec un impact avéré sur la santé et l'environnement et l'apparition d'insectes résistants (Marcombe et al., 2012). Plus récemment l'arrivée de nouvelles technologies (notamment CRISPR-Cas 9) a permis la mise en place de nouvelles stratégies, comme celle du « forçage génétique » pour permettre la propagation d'une mutation ou suppression d'un gène dans une population de moustiques (Kistler et al., 2015 ; Liu et al., 2019).

II. Mise en place de la réponse immunitaire innée face au virus Zika

Le système immunitaire a su s'adapter pour faire face à différents types de pathogènes. La première ligne de défense est la réponse immunitaire innée. Elle implique différents acteurs cellulaires indispensables à sa mise en place rapide, que sont les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules « natural killer », les mastocytes ou encore les neutrophiles. Elle implique également un nombre important d'acteurs moléculaires, dont les cytokines pro-inflammatoires. Les paragraphes qui suivent décrivent la mise en place de cette réponse par la détection de l'infection par ZIKV, puis les mécanismes déployés par l'organisme pour contrôler cette infection et conduire à la mise en place d'un état antiviral de la cellule infectée.

1. La reconnaissance des génomes viraux

La reconnaissance cellulaire des pathogènes est médiée par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ou « *pattern recognition receptors* » (PRRs). Ces PRRs, vont permettre la détection de motifs moléculaires associés aux pathogènes ou « *pathogen-associated molecular patterns* » (PAMPs). Nous pouvons identifier 4 classes différentes parmi ces PRRs. Les récepteurs de type Toll (ou *Toll-like receptor*, TLR), ceux de type *Retinoic acid-inducible gene 1* (ou *RIG-like receptor*, RLR), ceux de types *nucleotide-binding oligomerization domain* (ou *NOD-like receptor*, NLR) et ceux de type lectine C (CLR). Plus récemment, l'enzyme cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) a été identifiée comme un PRR pouvant détecter l'ADN cytosolique (Sun et al., 2013). Le **tableau 3** regroupe les principaux PRRs, les stimuli qu'ils reconnaissent ainsi que les virus qu'ils permettent de détecter. En ce qui concerne la reconnaissance des *Flavivirus*, les TLRs, RLRs et cGAS semblent jouer un rôle important dans l'induction de la réponse antivirale ; nous nous focaliserons donc sur ceux-ci dans la suite de cette partie.

a. Contrôle de l'infection par les TLRs

Les TLRs sont au nombre de 10 chez l'homme. Ils permettent la détection d'un panel très varié de PAMPs présents dans le milieu extracellulaire ou dans les endosomes. Les TLRs 3 et 7 ont la capacité de détecter respectivement les ARNs double brin et simple brin et sont les seuls à avoir été décrits comme pouvant contrôler l'infection par des *Flavivirus*. Tout d'abord, le TLR3 semble reconnaître l'intermédiaire ARN double brin formé lors de la réplication virale. Sa surexpression est corrélée à une inhibition de l'infection par DENV dans les fibroblastes HEK-293 (Tsai et al., 2009). Dans le même sens, l'inhibition de son expression induit, pour ZIKV, une augmentation de la réplication virale dans les

fibroblastes HFF-1 (Hamel et al., 2015). Le TLR7 est également capable de détecter les acides nucléiques de DENV et ZIKV dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes et des monocytes humains (Wang et al., 2006 ; Vanwalscappel et al., 2018). Ces deux TLRs sont insérés dans la membrane des endosomes, avec leur domaine de reconnaissance de l'ARN situé dans le lumen des endosomes. Si l'on inhibe la fusion endosomale lors de l'infection, l'induction d'interféron de type I (IFN-I) médiée par la reconnaissance par le TLR7 est diminuée dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, ce qui prouve que cette étape est cruciale pour la détection (Wang et al., 2006). Peu de travaux font état de l'implication des autres TLRs dans la reconnaissance des *Flavivirus*. Les TLR2, 4 et 6 pourraient être importants pour la détection de la protéine NS1 de DENV. Ces études ne sont cependant pas consensuelles en ce qui concerne l'implication des TLR2 et 6 (Modhiran et al., 2017 ; Chen et al., 2015).

b. Contrôle de l'infection par les RLRs

Les RLRs représentent une famille protéique plus restreinte composée de 3 protéines, *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) et la protéine *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2). Tandis que les TLRs peuvent détecter les PAMPs à la surface cellulaire ou à l'intérieur des endosomes, les RLRs ont, quant à eux, évolué pour permettre la reconnaissance des PAMPs au niveau cytosolique. LGP2 est connu pour être un régulateur négatif de RIG-I et, à l'inverse, un régulateur positif de MDA5 (Yoneyama et al., 2005 ; Saito et al., 2007 ; Sanchez David et al., 2019). RIG-I et MDA5 possèdent une organisation très similaire, avec la présence de 2 domaines d'activation et de recrutement de caspase (CARD) à l'extrémité N terminale (**Figure 9**) (Streicher and Jouvenet, 2019). Ces domaines seront nécessaires pour l'interaction avec la protéine MAVS, qui est impliquée dans l'activation de la voie de signalisation découlant de la détection des ARN viraux (détaillé dans la partie II.2). Le domaine central comprend un domaine DECH box / ATPase et, à l'extrémité C terminale, un domaine de régulation. RIG-I et MDA5 ne possèdent pas de motif de liaison à l'ARN classique, il est possible que ce soit le domaine C-terminal qui joue ce rôle (Cui et al., 2008). Les différents RLRs ont des spécificités quant à la reconnaissance des ARN viraux. Les ARN simple brin possédant une extrémité 5' triphosphate sont préférentiellement reconnus par RIG-I (Pichlmair et al., 2006 ; Hornung et al., 2006). Les ARN 5' triphosphate de l'hôte ne sont pas reconnus par ce mécanisme, car avant translocation dans le cytoplasme, les phosphates font être clivés ou une coiffe sera synthétisée pour protéger l'extrémité. De plus, une étude a également montré que la taille des ARN joue un rôle, avec une reconnaissance des ARN double brin courts par RIG-I et des ARN double brin de longueur plus importante par MDA5 (Kato et al., 2008). Il est clair à l'heure actuelle que les *Flavivirus*, notamment DENV et ZIKV, sont pour leur part détectés par ces deux RLRs mais préférentiellement par RIG-I. En effet, lors de l'infection par le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), des souris n'exprimant

pas RIG-I sont beaucoup plus sensible à l'infection que des souris n'exprimant pas MDA5. Cela s'explique par une forte inhibition de la production d'interféron dans les souris RIG-I $-/-$ (Kato et al., 2006). Une autre étude a également montré l'importance de RIG-I dans la détection de ZIKV. Suite à l'infection de cellules dendritiques humaines, un traitement par un agoniste de RIG-I est suffisant pour induire une très forte inhibition de l'infection (Bowen et al., 2017). Pour finir, une étude récemment menée au laboratoire a permis de mettre en évidence le rôle préférentiel de RIG-I par rapport à MDA5 dans la détection des génomes des *Flavivirus*. L'inhibition de l'expression de RIG-I dans les cellules HEK-293T révèle son importance pour l'induction de la réponse antivirale lors de l'infection par DENV-2 et DENV-4. L'inhibition de ce RLR, lors de l'infection, induit une forte diminution de la production d'interféron de type I et par conséquent une baisse de l'activation des gènes antiviraux stimulés par l'interféron. Par ailleurs, dans cette étude il apparaît que la région 5' du génome viral (de 1 à 2000 nucléotides environ) est la région reconnue par RIG-I et est indispensable à la mise en place de la réponse immunitaire innée. Il apparaît également que MDA5 joue un rôle très mineur dans cette détection. Au contraire de RIG-I, aucun ARN viral immuno-stimulateur n'est retrouvé associé à MDA5 (Chazal et al., 2018).

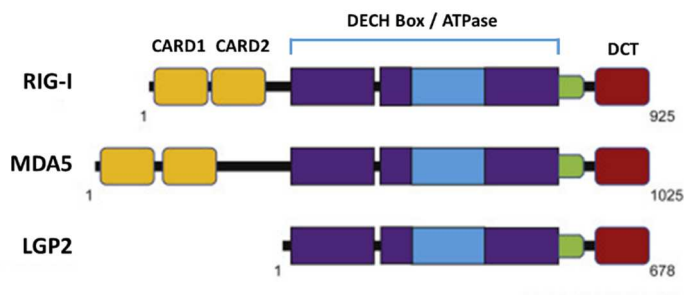


Figure 9. Structure des RLRs. En jaune apparaissent les domaines CARD nécessaires à l'interaction entre les RLRs et MAVS pour activer la cascade de signalisation, en bleu le domaine DECH box / ATPase, et en rouge le domaine C terminal (DCT). En vert est représentée une région intermédiaire, le pincer, reliant le DCT au domaine DECH Box / ATPase. (Streicher and Jouvenet, 2019)

c. Contrôle de l'infection par cGas

La protéine cGAS permet donc, comme précisé plus haut, la détection d'ADN double brin cytosolique qui est reconnu par la cellule comme un danger. En temps normal, l'ADN cellulaire est strictement contenu dans le noyau ou au niveau de la mitochondrie. Certains facteurs cellulaires vont être importants pour permettre une activation efficace de cGAS, comme TRIM56 ou G3BP1. Une fois activé, cGAS interagit avec la protéine STING indispensable à l'activation de la cascade de signalisation (Seo et al., 2018 ; Liu et al., 2019). Dans ce contexte, le rôle de cGAS dans l'induction de la réponse antivirale est majoritairement décrit pour les virus possédant un génome ADN (Li et al., 2013b). Cependant, les virus ayant un génome ARN vont pouvoir également induire une réponse via ce senseur. En effet,

lors de l'infection de cellules A549 et HEK-293T par DENV, il a été mis en évidence que le stress cellulaire induit était la cause du relargage d'ADN mitochondrial dans le cytoplasme. Cet ADN peut alors être détecté par cGAS qui permet l'activation d'une voie de signalisation aboutissant à un état antiviral de la cellule (Sun et al., 2017 ; Aguirre et al., 2017). Pour le virus Zika, le relargage de l'ADN mitochondrial dans le cytoplasme n'a pas été mis en évidence. Néanmoins, dans des monocytes THP-1, pour lesquels l'expression de cGAS est éteinte, on observe une augmentation de la réplication virale ainsi qu'une diminution de la synthèse d'interféron bêta (IFN β), ce qui démontre clairement le rôle de cGAS dans la mise en place de la réponse immunitaire innée (Zheng et al., 2018). Par ailleurs, une étude a montré que ZIKV est capable de contrecarrer la réponse médiée par cGAS dans des fibroblastes humains mais pas dans des fibroblastes murins (Ding et al., 2018). Cette différence pourrait contribuer à la très faible infection de la souris par ce virus (Ding et al., 2018).

Famille de PRRs	Membres impliqués dans la reconnaissance des génomes viraux	Localisation	Structures reconnues	Pathogènes concernés
TLR	TLR3	Membrane endosomale	ARN db	HSV1, MCMV, <i>Flavivirus</i> , <i>Enterovirus</i>
	TLR7	Membrane endosomale	ARN sb	coxsackie virus, VV, MV, RSV, <i>Retrovirus</i>
	TLR9	Membrane endosomale	ADN sb	DENV, HBV, Herpesvirus
RLR	RIG-I	Cytosolique	5' ppp-ARN db, ARN db court	EBOV, MV, RSV, VSV, HCV, VV, HSV1, <i>Rotavirus</i> , <i>Flavivirus</i> , <i>Hantavirus</i> , <i>Adenovirus</i>
	MDA5		ARN db long	poliovirus, coxsackie virus, <i>Rotavirus</i> , <i>Flavivirus</i>
cGAS	cGAS	Cytosolique	ADN db	<i>Herpesvirus</i> , <i>Flavivirus</i> , <i>Retrovirus</i>
NLR	AIM2	Cytosolique	ADN db	MCMV, VV
	NOD2		ARN	RSV, IAV, HCMV

Tableau 3. PRRs dont l'activité antivirale est bien décrite. Les PRRs sont regroupés en quatre familles et sont tous situés sur la membrane de l'endosome ou au niveau cytosolique. Abréviations utilisées : HSV1, Herpès simplex virus 1 ; MCMV, cytomégalovirus murin ; VV, virus de la vaccine ; MV, (measles virus) virus de la rougeole ; RSV, virus respiratoire syncytial ; DENV, virus de la dengue ; HBV, virus de l'hépatite B ; EBOV, virus Ébola ; VSV, virus de la stomatite vésiculaire ; HCV, virus de l'hépatite C ; IAV, virus influenza A ; HCMV, cytomégalovirus humain. (Chen et al., 2017 ; Shahrakvayeh et al., 2014 ; Luecke and Paludan, 2015 ; Lai et al., 2018 ; Ma et al., 2015 ; Gao et al., 2013 ; Rathinam et al., 2010)

d. Contrôle de la détection des ARN viraux par ZIKV

Face aux mécanismes cellulaires mis en place lors de l'infection, les virus ont évolué vers des mécanismes moléculaires pour contrecarrer cette réponse. Tous les virus ont développé des stratégies plus ou moins efficaces pour contrôler la réponse immunitaire innée. Les *Flavivirus* ne font pas exception à la règle. Nous allons aborder ici les mécanismes mis en œuvre par ZIKV pour échapper à la reconnaissance des senseurs précédemment décrits.

Tout d'abord, comme décrit dans la partie I.2.b, la réplication du génome a lieu au niveau d'invagination du RE, et cette particularité est déjà, en soit, une protection contre la détection par les senseurs cytosoliques (Chatel-Chaix et al., 2016). Le fait de synthétiser une coiffe à l'extrémité 5' du génome est également un autre mécanisme protecteur. Le virus Zika a également mis en place des moyens d'action plus directs. La protéine NS3 interagit avec les protéines cellulaires 14-3-3 ϵ et 14-3-3 η , qui sont des protéines indispensables à la translocation de RIG-I et MDA5 du cytosol à la mitochondrie, dans des lignées astrocytaires (SVG-A) (Riedl et al., 2019). Cette étape de translocation des RLRs est nécessaire à la réponse antivirale (Riedl et al., 2019). D'autre part, la protéine NS4A va, par compétition de liaisons avec le domaine CARD de MAVS, réduire les interactions entre RIG-I ou MDA5 et MAVS dans des cellules HEK-293T, étape là aussi essentielle à la mise en place de la réponse (Ma et al., 2018). Des stratégies similaires sont retrouvées pour contourner la détection par cGAS avec, notamment, le clivage par NS2B/NS3 de STING dans des fibroblastes HEK-239T (Ding et al., 2018). Enfin, il a été montré que la protéine NS1 de ZIKV permet l'activation de l'inflammasome qui prévient alors la dégradation de la caspase 1 qui va pouvoir cliver cGAS (Zheng et al., 2018). Il y n'a pas encore de mécanisme d'échappement de la reconnaissance des TLRs décrit pour le virus Zika.

2. Voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire innée

Les différents PRRs évoqués vont, après détection de l'infection et donc activation, induire des cascades de signalisation aboutissant à la mise en place d'une réponse antivirale de la cellule infectée et des cellules environnantes (**Figure 10**). Leur activation va permettre la phosphorylation spécifique de différents facteurs de transcription que sont IRF3, IRF7 et NF κ B. La phosphorylation de ces protéines entraîne leur translocation nucléaire qui permettra l'activation transcriptomique de nombreux gènes permettant de réguler notamment l'apoptose, la croissance ou la différenciation cellulaire. Ce qui va nous intéresser particulièrement pour la mise en place de la réponse immunitaire innée est l'induction de gènes aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, dont les interférons de type I (IFN-I) et de types III (IFN-III).

a. Voie de signalisation TLR

Les TLRs sont présents à la surface cellulaire ou au niveau de l'endosome. Une fois les PAMPs détectés par leur domaine extra-cellulaire ou intra-endosomal, une voie de signalisation va être activée. Le domaine TIR, présent sur tous les TLRs va jouer un rôle important et permettre l'interaction avec différentes protéines adaptatrices contenant elles aussi un domaine TIR. Tous les TLRs, à l'exception du TLR3, vont interagir soit directement, soit indirectement avec MyD88, protéine adaptatrice indispensable à cette voie de signalisation. MyD88 va alors former un complexe avec des kinases de la famille IRAK qui vont induire une cascade de phosphorylation et activer la protéine TRAF6 (Lin et al., 2010). TRAF6, à son tour, va former un complexe avec des ubiquitines ligases, qui permettront l'activation d'un complexe comprenant TAK1. Enfin, TAK1 va permettre l'activation de la voie NFκB via la dégradation de l'inhibiteur IκB (Jiang et al., 2002 ; Kawasaki and Kawai, 2014) (**Figure 10**).

Pour le TLR3, l'activation de la voie de signalisation est légèrement différente. En effet, ce TLR va interagir avec la protéine TRIF et ne passera pas par l'activation de MyD88. TRIF va alors directement recruter TRAF6 ce qui mènera, finalement, à l'activation des mêmes voies de signalisation. Cependant, il est important de noter que via l'activation de TRAF3, l'activation du TLR3 va permettre la phosphorylation du facteur de transcription IRF3 et aboutir à la production d'IFN-I et IFN-III (Kawasaki and Kawai, 2014) (**Figure 10**).

b. Voie de signalisation RLR

Après détection du génome des *Flavivirus* par RIG-I et MDA5, une étape d'oligomérisation va être nécessaire. Celle-ci va avoir lieu grâce à l'ubiquitination des domaines CARD des extrémités N-terminales qui va permettre une tetramérisation du RLR activé (Jiang et al., 2012). La protéine MAVS, présente au niveau de la membrane de la mitochondrie, sera ainsi activée. Suite à cette activation, MAVS va recruter le complexe TBK1/IKKε par l'intermédiaire des protéines TRAFs (Fang et al., 2017). L'activation de ces kinases va permettre la phosphorylation du facteur IRF3 et IRF7 d'une part et l'activation de la voie NFκB, d'autre part. Cette cascade va alors aboutir à la production de cytokines pro-inflammatoires et particulièrement d'IFN-I et IFN-III (**Figure 10**).

c. Voie de signalisation cGAS

cGAS possède un domaine de liaison à l'ADN qui va lui permettre de détecter l'ADN cytosolique. Lors de son attachement à l'ADN, cGAS va subir un changement de conformation qui va lui permettre de former un homodimère, devenir active et induire la synthèse de cGAMP (Zhang et al., 2014). Ce

messager nouvellement synthétisé va interagir avec la protéine STING présente au niveau du réticulum endoplasmique (Wu et al., 2013 ; Zhang et al., 2013). La protéine STING ainsi activée transite du RE vers l'appareil de Golgi. Ce faisant, elle recrute et active la kinase TBK1 qui, comme pour la signalisation via les TLR, induira la phosphorylation du facteur de transcription IRF3. Là encore, il y aura production d'IFN-I et IFN-III (Tanaka and Chen, 2012 ; Sun et al., 2013 ; Dansako et al., 2018). Il a aussi été observé une activation de la voie NFκB par STING (Ishikawa and Barber, 2008) (**Figure 10**).

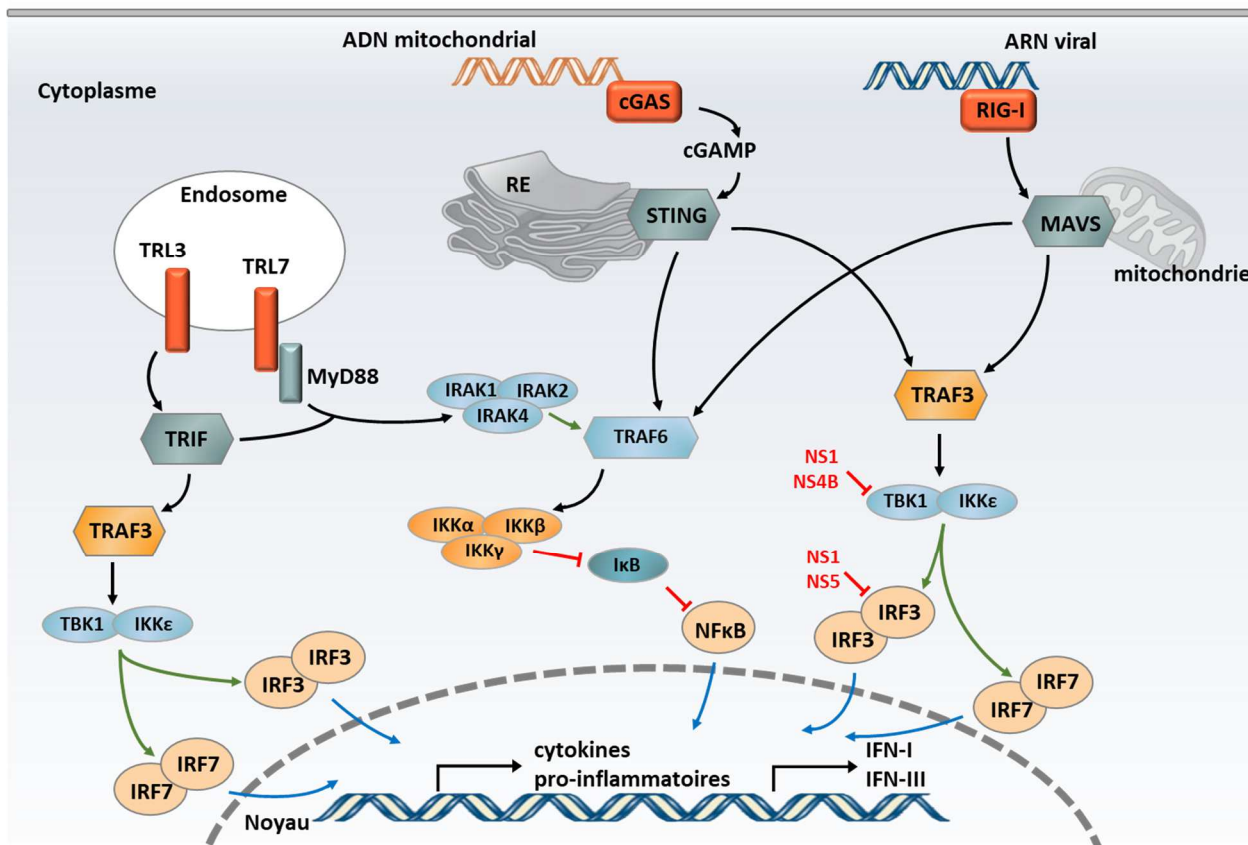


Figure 10. Détection de génomes viraux par les PRRs et contrôle par ZIKV. Le génome viral est détecté par différents PRRs, ce qui permettra la mise en place de cascades de signalisation. Ces cascades aboutiront d'une part, à la phosphorylation de l'inhibiteur du facteur NFκB permettant ainsi la translocation du facteur de transcription dans le noyau. D'autre part, l'activation de certaines kinases va mener à l'activation par phosphorylation des facteurs IRF3 et IRF9 qui permettra également leur translocation dans le noyau. Cette réponse induit ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires, dont les IFN-I et III. Les protéines de ZIKV vont interagir à différents niveaux pour contrecarrer cette réponse, elles sont indiquées en rouge sur la figure. Les flèches rouges représentent des interactions menant à la dégradation ou l'inhibition de phosphorylation de la protéine cible, les flèches vertes, des activations par phosphorylation. Les flèches bleues représentent les translocations dans le noyau des différents facteurs de transcription.

d. Contrôle des voies de signalisation par le virus Zika

Le virus Zika a évolué pour favoriser des mécanismes de contrôle des différentes cascades de signalisation antivirales. Les facteurs impliqués dans ces cascades sont très nombreux et sont autant de cibles potentielles que le virus peut contrôler (**Figure 10**). La protéine NS1 de ZIKV se lie à la protéine TBK1 et ainsi réduit son activité de kinase dans des cellules HEK-293T. Une mutation dans le domaine de NS1 nécessaire à cette interaction montre, dans le modèle murin A129, une augmentation de la production d'IFN β (Xia et al., 2018b). Cette interaction résulte d'une induction très altérée d'IFN β et donc d'une réplication virale amplifiée. Par ailleurs, une autre étude a montré que la surexpression des protéines NS1 et NS4B réduisait également la phosphorylation de TBK1 dans des cellules HEK-293T (Wu et al., 2017). La polymérase virale NS5 contrôle elle aussi les voies de signalisation menant à la production de cytokines pro-inflammatoires. En effet, une surexpression de cette protéine mène, là encore, à une diminution de la phosphorylation de IRF3 par TBK1 (Lin et al., 2019). De plus, NS5 peut se lier, via son domaine méthyl-transférase, directement au facteur de transcription IRF3 suggérant un rôle inhibiteur (Xia et al., 2018b). Ainsi, différentes protéines non structurales de ZIKV peuvent inhiber les différentes voies de signalisation induites par la détection de l'infection, en ciblant généralement les facteurs cellulaires communs à ces voies, comme IRF3.

3. Les cytokines, des facteurs antiviraux

Comme expliqué précédemment, l'activation des voies de signalisation après détection de l'infection, va aboutir à la production de cytokines pro-inflammatoires. Les cytokines sont des acteurs moléculaires de la réponse immunitaire innée et vont permettre notamment l'activation de cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules *natural killer*. Par ailleurs, ces cytokines vont jouer un rôle important pour la mise en place de la réponse immunitaire adaptative et la réponse humorale.

Plusieurs études cliniques, réalisées sur des patients symptomatiques, de Singapour, du Brésil ou ayant voyagés dans des régions épidémiques d'Asie du sud-est, montrent que lors de l'infection par ZIKV, le taux de certaines cytokines augmente drastiquement dans le sang. Ces études mettent en évidence l'importance, notamment des cytokines IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-17A et IL-9, pour la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace (Tappe et al., 2016 ; Lum et al., 2018). Par ailleurs, on peut aussi noter que les niveaux d'IL-8, IL-1ra et IP-10 sont élevés chez les patients atteints d'une infection aiguë par ZIKV. Ces cytokines sont nécessaires pour recruter des effecteurs de la réponse immunitaire au site d'infection (Khan et al., 2000). Cependant, une production trop importante de cytokines pro-

inflammatoires peut avoir un effet néfaste sur l'organisme. Le terme de tempête cytokinique fait référence à ce processus (Maucourant et al., 2019). Les cytokines peuvent être à l'origine de certains symptômes observés lors de l'infection par ZIKV. En effet, chez des patients symptomatiques brésiliens la forte production d'IP-10 et IL-5 serait associée à des exanthèmes et des maux de tête et IL-1ra à une plus forte arthralgie (Barros et al., 2018). La chemokine IP-10 serait également impliquée dans l'apoptose des neurones lors de l'infection du fœtus et de la mise en place du syndrome de Guillain Barré chez l'homme (Naveca et al., 2018). De plus, une autre étude montre qu'une importante quantité d'IP-10, IL-8 et IL-2 pourrait être à l'origine d'anomalies congénitales observées lors d'infection par ZIKV chez les femmes enceintes (Foo et al., 2018).

Toutefois, la cytokine faisant l'objet de notre étude est l'interféron qui peut être produite en même temps que les autres cytokines pro-inflammatoires mais aussi directement via l'activation de différents facteurs de transcription. Nous détaillerons donc plus particulièrement sa production et son rôle antiviral dans la prochaine partie.

III. Rôle de l'interféron et des gènes stimulés par l'interféron dans la réponse antivirale

1. Les interférons

L'interféron (IFN) est une cytokine pro-inflammatoire au cœur de la réponse immunitaire innée antivirale. Le terme d'interféron a été utilisé pour la première fois en 1957 pour décrire une molécule à l'origine d'une interférence virale. Chez le poulet, la membrane chorio-allantoïde ne pouvaient pas s'infecter avec le virus influenza A si elle avait subi une autre infection précédemment (Isaacs and Lindenmann, 1957). Depuis, trois grands types d'interférons ont été décrits et jouent un rôle dans la mise en place de la réponse immunitaire innée (**Tableau 4**).

Les interférons de type I (IFN-I), qui représentent la plus grande des classes d'interférons chez l'homme, est composée de l'IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ , IFN ω . Tous ces IFNs ont la particularité d'activer la même voie de signalisation passant par le même récepteur, un hétérodimère constitué des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 (**Figure 11**). Les interférons les plus étudiés sont cependant les IFN α et IFN β . Ils sont produits par la majorité des cellules, contrairement aux autres types d'IFN. Toutefois, lors d'une réponse antivirale la plus grande partie d'IFN α va être produite par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Siegal et al., 1999). L'IFN α peut être divisé en 13 sous-types. Il a été montré que les différents IFN-I pouvaient avoir des rôles légèrement différents dans la mise en place de la réponse immunitaire en fonction de la densité de récepteurs présents à la surface des cellules mais aussi de leur affinité de liaison avec celui-ci (Jaitin et al., 2006 ; Moraga et al., 2009).

Un seul interféron compose la classe des interférons de type II (IFN-II), l'IFN γ . Il possède un récepteur qui lui est propre : IFNGR. La production d'IFN γ est limitée aux cellules immunitaires. Cependant, le récepteur étant présent sur une majorité de types cellulaires, une très grande partie des cellules est capable de répondre à cet IFN (Valente et al., 1992). L'IFN-II est régulé différemment des deux autres types d'IFN et induira également une régulation génétique différente (Lee and Ashkar, 2018).

Les interférons de type III regroupent les quatre sous-types d'IFN λ 1-4. Les trois premiers sous-types sont aussi connus sous le nom d'IL-29, IL-28A et IL-28B. Ils ont été décrits au début des années 2000 et possèdent un récepteur spécifique, composé des sous unités suivantes : IFNLR1 et IL-10R2. (Kotenko et al., 2003 ; Sheppard et al., 2003 ; Prokunina-Olsson et al., 2013) (**Figure 11**). Ce récepteur va être majoritairement présent sur les cellules composant les muqueuses, les épithéliums et autres barrières de surface (Sommereyns et al., 2008 ; Wells and Coyne, 2018). L'activation de ce récepteur va induire

la même cascade de signalisation que celle observée pour l'IFN-I et va aboutir aux mêmes régulations transcriptomiques.

Nous nous intéresserons aux IFN de type I et III qui sont régulés directement par les détecteurs opérés via les PRRs et qui permettront l'induction d'un certain nombre de gènes, ayant notamment des capacités antivirales.

Type d'IFN	Membres de la classe	Récepteurs	Principales cellules productrices	Rôles principaux
Type I	IFN α (13 sous-types) IFN β IFN ϵ IFN κ IFN ω	IFNAR1 IFNAR2	Toutes les cellules nucléées	<ul style="list-style-type: none"> - Réponse antivirale et antibactérienne - Induction des gènes sous contrôle de l'élément de réponse ISRE - Fonction antiproliférative et apoptotique - Activation des cellules dendritiques - Fonctions immuno-modulatrices (prolifération, survie et différenciation des Lymphocytes T)
Type II	IFN γ	IFNGR1 IFNGR2	Lymphocytes T CD4+ Lymphocytes T CD8+ Cellules NK Cellules NKT	<ul style="list-style-type: none"> - Potentialise l'effet des IFN-I - Induction des gènes sous contrôle de l'élément de réponse GAS - Fonction antiproliférative - Régule positivement l'expression des CMH-I et II - Activation des macrophages - Contrôle de la différenciation des Lymphocytes T CD4 en effecteur Th1
Type III	IFN λ 1-4	IFNLR1 IL-10R2	Cellules épithéliales Cellules endothéliales Neutrophiles	<ul style="list-style-type: none"> - Réponse antivirale et antibactérienne - Induction des gènes sous contrôle de l'élément de réponse ISRE - Fonction antiproliférative et apoptotique - Contrôle indirect de la différenciation des Lymphocytes T CD4 en effecteur Th1

Tableau 4. Les interférons. Ce tableau regroupe les principales caractéristiques de trois types d'IFN. (Schoenborn and Wilson, 2007 ; Schneider et al., 2014 ; Lazear et al., 2019)

2. Voie de signalisation des IFN-I/III

a. Voie de signalisation et induction des gènes stimulés par l'interféron

Les IFN-I/III sont produits dans la cellule après activation de différents facteurs de transcription, dont les principaux sont IRF3, IRF7 et NFκB, comme décrit précédemment (**Figure 10**). Les facteurs IRF3 et IRF 7 vont être activés par phosphorylation, ce qui va permettre leur dimérisation et leur translocation dans le noyau. Pour NFκB, l'activation se fait par phosphorylation de l'inhibiteur IκB qui est ensuite dégradé permettant la translocation dans le noyau de NFκB. Ces facteurs, devenus nucléaires, vont se fixer sur des régions spécifiques des promoteurs des IFN-I et IFN-III (Wathelet et al., 1998 ; Sato et al., 2000 ; Thomson et al., 2009).

Une fois produits, les IFN-I/III vont être sécrétés par la cellule pour permettre une signalisation autocrine ou paracrine. Cette signalisation est très bien décrite à l'heure actuelle et la majorité des acteurs impliqués ont été identifiés (**Figure 11**). Les IFNs vont se fixer sur leurs récepteurs respectifs. Chacune des sous-unités de ces récepteurs, est associée à des « *Janus kinases* » (JAK) : IFNAR1 et IFNAR2 sont associés avec, respectivement TYK2 et JAK1, tandis qu'IFNLR1 et IL-10R2 interagissent avec JAK1 avec TYK2. En l'absence de stimulus, les domaines cytoplasmiques des récepteurs sont associés à un domaine de liaison aux kinases inactives. Lorsque le ligand interagit avec son récepteur, les sous-unités se rapprochent et subissent des changements structuraux qui permettent aux domaines catalytiques des deux kinases de se trans-phosphoryler et ainsi de s'activer (Platanias, 2005 ; Schneider et al., 2014). Une fois activées, les JAK vont phosphoryler les récepteurs. Cette dernière action induit la relocalisation des protéines STAT-1 et -2 par les interactions de leur domaine SH2 avec le récepteur. Les protéines STAT seront à leur tour phosphorylées et se décrocheront du récepteur pour permettre un changement de conformation et leur hétérodimérisation (Heim et al., 1995). Le changement de conformation permet l'exposition d'un signal de localisation nucléaire qui facilitera la translocation de ces protéines dans le noyau (Melén et al., 2001). Ce changement de conformation permet aussi l'interaction avec IRF9 formant ainsi le complexe ISGF3 (*Interferon stimulated genes factor 3*). Une fois dans le noyau, le complexe ISGF3 se lie à l'élément de réponse ISRE (*IFN-stimulated response element*) présent en amont des gènes stimulés par l'interféron (ou *IFN-stimulated genes*, ISG) (Levy et al., 1988). C'est STAT2 qui contient le domaine d'activation transcriptionnel et IRF9 qui va permettre au complexe d'interagir avec la séquence d'ADN spécifique (Fink and Grandvaux, 2013).

Les ISGs synthétisés suite à l'activation de cette cascade de signalisation jouent différents rôles dans la réponse antivirale. Certains seront des régulateurs positifs ou négatifs de la voie. D'autres seront directement impliqués dans l'inhibition de l'infection. Ces rôles seront décrits plus loin.

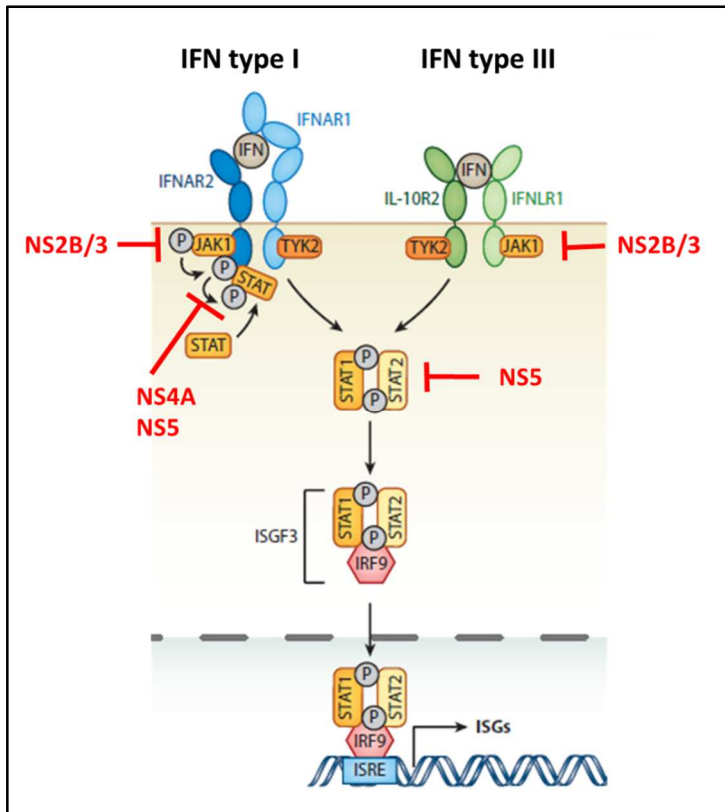


Figure 11. Voie de signalisation de l'IFN. Cascade de signalisation induite lors de la détection d'IFN-I ou IFN-III dans le milieu extra cellulaire via les récepteurs spécifiques. En rouge apparaissent les protéines de ZIKV au niveau des étapes contrôlées par le virus (Adapté de Scheinder et al. 2014).

b. Contrôle de l'induction d'IFN par ZIKV

Les virus ont également évolué pour contrecarrer la cascade de signalisation induite par l'IFN, et ZIKV ne fait pas exception à la règle (**Figure 11**). Tout d'abord, il a été montré que la surexpression de NS2B/3 induit la dégradation, via le protéasome, de la kinase JAK1, réduisant ainsi la transcription de certains ISGs dans les cellules A549 et HEK-293T (Wu et al., 2017). Par ailleurs, la protéine NS4A de TBEV contrôle la phosphorylation et de la dimérisation de STAT1 et STAT2 dans les fibroblastes HEK-293T (Yang et al., 2020). De plus, la surexpression de la protéine NS4A de ZIKV chez la drosophile induit la diminution d'un rapporteur de la voie JAK/STAT ainsi qu'une inhibition du développement de l'œil médié par l'inhibition de la voie JAK/STAT (Harsh et al., 2020).

Enfin, plusieurs études indépendantes ont montré que NS5 induit la dégradation, via le protéasome de STAT2 dans de nombreux types cellulaires (Grant et al., 2016 ; Kumar et al., 2016 ; Hertzog et al., 2018). Elle induit également une inhibition de la phosphorylation de STAT1 dans des cellules HEK-293T traitées à l'IFN β (Hertzog et al., 2018).

3. Les gènes stimulés par l'interféron

a. Étude des gènes stimulés par l'interféron

Le terme de gènes stimulés par l'interféron (ISG) regroupe tous les gènes qui seront positivement régulés par le facteur ISGF3 lors de la réponse à l'interféron. En amont de ces gènes, on retrouve l'élément de réponse stimulé par l'interféron (ISRE), sur lequel va se fixer le facteur ISGF3 pour permettre l'activation de la transcription. Les ISGs ont été décrits pour la première fois dans une étude de 1979. Dans cette étude, les auteurs ont traité des fibroblastes humains à l'interféron pendant 8 h et ont mis en évidence la présence de 4 protéines qui n'étaient pas synthétisées sans le traitement. Déjà, à cette époque, le rôle antiviral de ces protéines était suspecté. En effet, dans cette même étude le traitement inhibait l'infection de fibroblastes humains par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Knight and Korant, 1979).

Depuis une vingtaine d'année, la connaissance sur les ISGs a augmenté de façon exponentielle, majoritairement grâce à l'arrivée de la métaomique (regroupement des techniques permettant les analyses de données massives notamment la transcriptomique ou la protéomique). Une première étude a été réalisée en 1998 pour identifier des ISGs sur des fibroblastes humains traités ou non avec différents types d'IFN. Par transcriptomique, les auteurs ont identifié plus de 320 gènes stimulés par l'IFN β après un traitement de 6 h (Der et al., 1998). Depuis, de nombreuses équipes ont essayé d'identifier des ISGs en utilisant différentes méthodes et différents stimuli. Toutes ces études ont pour but d'identifier des acteurs antiviraux de la réponse immunitaire innée et de comprendre *in fine* les mécanismes sous-jacents contrôlant l'infection virale. Des banques d'ARN interférents (ARNi) ont été conçues suite à des analyses transcriptomiques de cellules cibles après traitement IFN. Lorsqu'un ISG, ciblé par un ARNi, joue un rôle important dans la réponse spécifique face à un virus, l'infection par ce virus est alors favorisée. Ce genre d'étude a notamment été menée sur le virus de l'hépatite C (HCV), sur un nombre cependant limité d'ISGs (Zhao et al., 2012 ; Metz et al., 2012). À l'inverse, des méthodes de surexpression ont également été utilisées. La surexpression d'ISG ayant un rôle antiviral induit alors une inhibition de l'infection par les différents virus testés. En 2011, cette méthode est la première à avoir été utilisées à grande échelle pour permettre le crible de plus de 380 ISGs dans des cellules humaines infectées par une dizaine de virus (Schoggins et al., 2011). Plus récemment, avec l'arrivée de la technologie CRISPR-Cas9, des cribles ciblant tout le génome ont été réalisés. Cette technique consiste à éteindre l'expression de chaque gène un à un et d'identifier lesquels sont impliqués dans la réponse antivirale. Cette stratégie a été appliquée dans le contexte de l'infection par le virus Zika et a ainsi permis d'identifier le rôle antiviral de l'ISG IFI6 (Richardson et al., 2018 ; Dukhovny et al., 2019).

Par ailleurs, l'effet combinatoire de certains ISGs a été observé. En effet, l'expression de deux ISGs dans une même cellule aboutit alors à une inhibition d'infection plus importante que chaque surexpression indépendante. Cela a été montré pour différents virus et dans différentes lignées cellulaires indiquant que ce mécanisme n'est pas propre à l'un d'eux. Par exemple, pour le virus de la fièvre jaune, les ISGs IFI6 et C6orf150 agissent de cette manière, impliquant donc deux mécanismes antiviraux indépendants (Schoggins et al., 2011). De plus, certains ISGs peuvent également agir en synergie avec d'autres protéines cellulaires pouvant ainsi être à l'origine d'une réponse antivirale plus forte. Cela a ainsi été montré pour la protéine ZAP (*zinc finger antiviral protein*) qui possède des effets synergiques avec 31 ISG, pour la mise en place d'une réponse antivirale face au virus Sindbis (un *Alphavirus*), dans des cellules rénales de hamster (BHK) et des hépatocytes humains (Huh7) (Karki et al., 2012).

À l'heure actuelle, le nombre exact d'ISGs n'est pas connu, on l'estime entre 300 et 2000 selon les études (Rusinova et al., 2013). Par ailleurs, il est important de noter que le nombre d'ISGs, mais également les gènes qu'on y associe, varie en fonction du type cellulaire observé. Ce nombre est également dépendant du type d'IFN utilisé pour traiter la cellule cible ainsi que la durée de ce traitement.

Beaucoup d'ISGs décrits sont antiviraux et vont favoriser le contrôle de l'infection ou l'élimination du pathogène. Toutefois, les virus ont su contourner cette réponse et tirer parti de certains de ces gènes préférentiellement exprimés lors d'une infection. Dans certains contextes infectieux, les ISGs peuvent donc exercer une fonction pro-virale. De nombreux ISGs ne jouent pas de rôle direct sur la réplication des virus mais sont importants pour la régulation de la réponse et exercent un rétrocontrôle, principalement positif, sur la voie interféron.

b. Le rétrocontrôle des ISGs

Le principal mécanisme de rétrocontrôle de la voie est un contrôle positif. En effet, un grand nombre des acteurs directs des voies de signalisation impliqués dans la détection de l'infection ou de la production de l'IFN, sont également des ISGs. Parmi les plus importants on retrouve les RLRs, STAT1 et STAT2 mais aussi les facteurs de transcription IRF1, 3, 7 et 9. Toutefois, ces différents éléments des voies de signalisation ont tout de même besoin d'être activés avant de pouvoir permettre l'amplification de la réponse. IRF1 fait exception car il semble permettre la production de certains ISGs même dans des cellules STAT1^{-/-} donc sans activation par la voie classique (Schoggins et al., 2011). De plus, on observe une amplification de la voie suite à la production de PAMPs supplémentaires par différents ISGs. Par exemple, l'oligoadenylate synthétase (OAS), qui est activée par l'ARN viral,

synthétise du 2'-5'-oligoadenylate, ce qui entraîne l'activation de l'endoribonucléase latente (RNaseL). Une fois activée, la RNaseL va cliver le génome viral et ainsi permettre une augmentation du nombre de PAMPs qui pourront alors être reconnus par RIG-I (Chakrabarti et al., 2010).

Pour favoriser un retour à l'homéostasie cellulaire, il existe des mécanismes de régulation négative. Certains sont indépendant des ISGs, par exemple, l'internalisation du récepteur IFNAR (Teijaro et al., 2016) ou la déphosphorylation des protéines JAK et STAT par la phosphatase CD45 (Irie-Sasaki et al., 2001).

Toutefois, plusieurs ISGs permettant la régulation négative de la voie JAK/STAT sont bien caractérisés à ce jour. Tout d'abord, USP18 se lie à IFNAR2 et inhibe par compétition son interaction avec JAK1 (Malakhova et al., 2006). De par sa liaison spécifique avec ce récepteur, USP18 permet la régulation spécifique de l'IFN-I. ISG15 a aussi été proposé comme régulateur négatif de la voie par sa conjugaison (liaison covalente) avec RIG-I. Ce processus est connu sous le nom d'ISGylation (Kim et al., 2008). Cependant, ce rôle a été remis en question par l'utilisation d'un modèle murin ne possédant pas une des enzymes nécessaires au processus d'ISGylation. Chez ces souris, on observait au contraire qu'elles étaient plus sensible à l'infection par le virus influenza B (Lai et al., 2009). De surcroît, l'ISGylation du facteur IRF3 semble permettre sa stabilisation (Shi et al., 2010). Pour finir, USP18 possède la capacité de cliver ISG15, ce qui dans ce contexte pourrait jouer un rôle dans la régulation négative de la voie IFN (Malakhov et al., 2002). D'autres études restent à mener pour élucider clairement le rôle d'ISG15 dans la régulation de la voie.

SOCS1 et SOCS3 sont des ISGs qui eux aussi permettent la régulation négative de la voie IFN. Il a été montré dans des cellules HeLa et MCF7 que la surexpression de SOCS1 induit une inhibition de la phosphorylation et donc de l'activation de STAT1 via son interaction avec la kinase TYK2 (Song and Shuai, 1998 ; Piganis et al., 2011).

c. Les ISGs antiviraux ciblant ZIKV

Le rôle antiviral de certains ISGs est bien décrit à l'heure actuelle. Toutefois, le mécanisme d'action d'une grande majorité de ces ISG reste inconnu. Les protéines issues de la transcription puis traduction des ISGs vont cibler pour beaucoup des étapes du cycle viral conservées entre différents virus, et ont ainsi une gamme de restriction plus large. Par exemple, l'intégrité des acides nucléiques va pouvoir être visée par l'action des ISG suivants : OAS/RNase, ADAR1 et APOBECs (Sheehy et al., 2002 ; Taylor et al., 2005). Les étapes d'entrée virale, de transcription, de traduction et de bourgeonnement du virion vont elles aussi être ciblées par différents ISGs (Schneider et al., 2014). Ci-dessous nous nous

intéressons aux ISGs ayant des fonctions antivirales connues face au virus Zika ainsi qu'aux mécanismes qu'ils font intervenir (**Figure 12**).

IFITM. La famille protéique des IFITM est composée de 4 membres (IFITM1, 2, 3 et 5). L'action antivirale des IFITM1, 2 et 3 a été observée pour différents types de virus, les *Filovirus*, les *Flavivirus*, le virus influenza A et le coronavirus SRAS (Brass et al., 2009 ; Huang et al., 2011). Les résultats obtenus sur ces virus suggèrent un impact sur une phase tardive de l'endocytose des virions et donc un effet sur toute une gamme de virus enveloppés. Pour ZIKV, une étude a été menée en 2016, mettant en évidence le rôle d'IFITM1 et IFITM3 dans le contrôle de l'infection par ZIKV par des expériences de gain et de perte de fonction menées sur des cellules HeLa et des fibroblastes embryonnaires de souris. Toutefois, IFITM3 semble avoir plus d'impact que les autres membres de la famille sur l'infection par le virus (Savidis et al., 2016a). Cette inhibition a lieu à une étape précoce du cycle viral et la localisation de IFITM3 dans les endosomes est nécessaire pour une restriction optimale. De plus, il a été montré qu'un motif constituant une hélice amphipathique de IFITM3 était nécessaire pour la restriction de la fusion du virus au niveau de l'endosome (Chesarino et al., 2017).

CH25H. La cholesterol-25-hydroxylase (CH25H) est un ISG qui catalyse la formation de 25-hydroxycholesterol (25-HC) à partir de cholestérol. Son rôle antiviral a été décrit pour plusieurs virus enveloppés. CH25H et 25-HC inhibent la fusion de ces virus à l'endosome indépendamment du type de glycoprotéines d'enveloppe présentes à la surface du virion (Liu et al., 2013). Cette restriction a lieu, comme pour IFITM3, à un stade précoce de l'infection. Une étude menée sur ZIKV a observé également cette restriction lors de l'infection, mais met aussi en évidence l'importance du produit de cette enzyme, le 25-HC (Li et al., 2017). Dans cette étude, un traitement au 25-HC des cellules Vero suffit pour bloquer l'internalisation des particules de ZIKV alors qu'il n'affecte en rien la réplication du virus. De plus, un traitement journalier au 25-HC d'une souris portant des embryons infectés par ZIKV a montré une propagation du virus altérée dans le cerveau des embryons. Les malformations pouvant entraîner des microcéphalies étaient également réduites avec le traitement (Li et al., 2017).

Vipérine. La vipérine, aussi appelée RSAD2, joue également un rôle sur une très large gamme de virus. Plusieurs études ont observées que la vipérine induisait une inhibition de l'infection par différents *Flavivirus* dans de nombreux types cellulaires (Szretter et al., 2011 ; Helbig et al., 2013 ; Upadhyay et al., 2014). Néanmoins, de manière surprenante, la vipérine utilise des mécanismes différents pour inhiber l'infection des différents virus qu'elle cible. En effet, pour HCV, c'est la protéine virale NS5A qui est ciblée ainsi qu'un facteur cellulaire pro-viral VAP-A pour inhiber la réplication (Helbig et al., 2011). Pour TBEV, comme pour le virus d'immunodéficience humaine (VIH), c'est le domaine SAM de la vipérine qui inhibe respectivement la réplication du génome et la libération de la particule virale

(Upadhyay et al., 2014 ; Nasr et al., 2012). Le bourgeonnement de certains virus peut aussi être impacté. C'est le cas du virus Influenza A, qui est inhibé par la vipérine via son action sur les radeaux lipidiques nécessaires au bourgeonnement des virions à la membrane plasmique (Wang et al., 2007). L'effet inhibiteur de la vipérine sur ZIKV est clairement établi (Van der Hoek et al., 2017), bien que le mécanisme impliqué reste à élucider. Il semblerait que l'extrémité C terminale de la protéine soit impliquée dans cette restriction, comme cela a pu être montré pour DENV (Vanwalscappel et al., 2019). Étant donné la similarité entre ZIKV et DENV il pourrait être supposé un rôle similaire, c'est-à-dire dans l'inhibition de la réplication du génome viral (Helbig et al., 2013). L'hypothèse de la dégradation de NS3 par la vipérine a aussi été avancée pour ZIKV (Panayiotou et al., 2018).

IFI6. IFI6 est un ISG dont le rôle antiviral a été démontré dans les infections par les virus ZIKV et HCV. Des études sur des protéines appartenant à la même famille, et également induites par l'IFN, ont été menées chez la souris, mettant en évidence, dans certains types cellulaires, le rôle de IFI27L2A dans l'inhibition de l'infection par WNV (Lucas et al., 2016). Toutefois, les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairs. Il est possible qu'ils soient liés aux fonctions de régulation de l'apoptose que possèdent ces protéines. Les résultats des différentes études menées sur IFI6 sont contradictoires dans un contexte d'infection par HCV. Une première étude a montré le rôle antiviral de IFI6 lors de l'infection via l'inhibition de l'EGFR induisant une inhibition de l'entrée du virus dans la lignée hépatocytaire Huh7.5 (Meyer et al., 2015). Toutefois, quelques mois plus tard une étude mettait en évidence que la surexpression de IFI6 lors de l'infection de Huh7.5 par HCV était pro-virale et permettait même d'abolir l'inhibition observée par un traitement à l'IFN α (Chen et al., 2016). L'implication d'IFI6 dans l'infection par le virus Zika a été mise en évidence plus récemment lors d'un crible à haut débit. IFI6 induit une diminution des invaginations présentes au RE et nécessaires à la réplication virale, ainsi, cette protéine ciblerait spécifiquement les virus se répliquant au RE. L'absence d'effet sur l'infection par HCV, observée dans cette étude, serait due à la structure des invaginations du RE qui serait différente entre les deux virus. De façon cohérente, l'effet antiviral est aussi observable pour d'autres *Flavivirus* (DENV, YFV ou WNV) dans des cellules Huh7.5 et des fibroblastes NHDF (Richardson et al., 2018 ; Dukhovny et al., 2019).

PARP-12. La protéine PARP-12 a un effet antiviral décrit uniquement pour ZIKV. Elle est capable d'induire la dégradation des protéines NS1 et NS3 par la voie du protéasome dans les cellules HEK-293T (Li et al., 2018).

C19orf66. Comme PARP-12, C19orf66 n'avait pas d'effet antiviral connu jusqu'à récemment. En 2020, elle a été identifiée comme un nouvel ISG capable lui aussi d'induire la dégradation de NS3 via la voie du protéasome dans des progéniteurs neuronaux (Wu et al., 2020).

d. Les ISGs ayant une activité favorisant la réplication de ZIKV

Les ISGs ayant un rôle pro-viral, sont des protéines ayant été détournées par le virus de leur fonction première. Peu de cas sont décrits. Peuvent être classés dans cette catégorie les régulateurs négatifs de la voie que nous avons évoqués plus haut. En effet, ces régulateurs sont induits par l'IFN et permettent une diminution de la production d'ISG donc une diminution de l'état antiviral de la cellule et finalement ont, indirectement, un effet favorisant la réplication de nombreux virus.

LY6E. LY6E est une protéine impliquée dans les processus cellulaires d'endocytose. Cette protéine est indispensable pour l'internalisation spécifique de cargos de grandes tailles et recouvert de transferines, dont les *Flavivirus*. Cet effet a été montré pour différents *Flavivirus*, ainsi par extinction de l'expression de LY6E, on induit, dans les cellules épithéliales U2OS, une baisse de l'infection de ZIKV ainsi que de DENV et WNV (Hackett and Cherry, 2018). Cet effet pro-viral a également été observé pour d'autres virus notamment VIH ou VSV (Yu et al., 2017 ; Mar et al., 2018).

MCOLN2. Le virus détourne cet ISG pour son étape d'entrée. MCOLN2 est un canal à cation qui est localisé sur la membrane endosomale. Cette protéine va favoriser la transition des endosomes précoces en endosomes tardifs, favorisant ainsi l'infection. Son rôle a été mis en évidence lors de l'infection par ZIKV mais également par YFV et le virus Influenza A dans des fibroblastes humains STAT-/- (Rinkenberger and Schoggins, 2018).

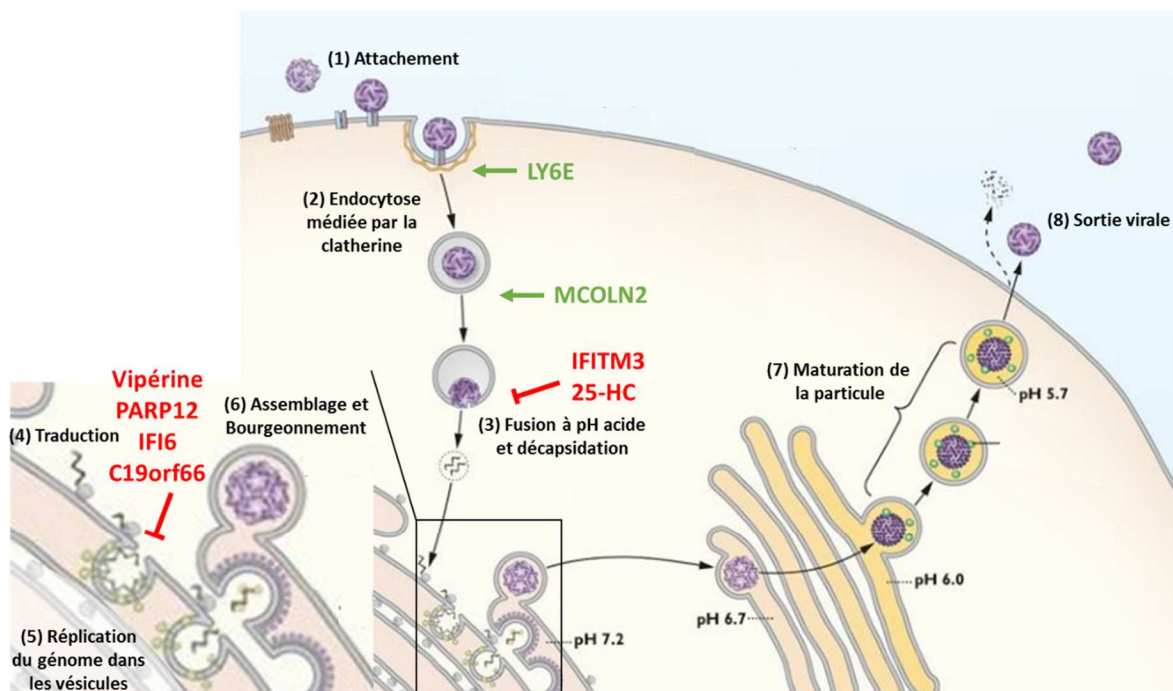


Figure 12. Impact des ISGs sur le cycle viral de ZIKV. En rouge, au niveau des étapes impactées, sont représentés les ISGs antiviraux. En vert, au niveau des étapes impactées, sont représentés les ISGs pro-viraux.

IV. Les Apolipoprotéines L

Chez l'homme, la famille des apolipoprotéines L (APOLs) est composée de 6 protéines: APOL1-6. Les gènes codants pour ces protéines sont regroupés en cluster sur le chromosome 22 et possède une partie C-terminale conservée (**Figure 13**) (Smith and Malik, 2009). Les APOLs contiennent toutes un domaine BH3 putatif qui est un domaine retrouvé chez les protéines pro-apoptotiques et qui pourrait jouer un rôle dans leur fonction (Vanhollebeke and Pays, 2006). L'implication de ce domaine d'APOL3 a été mis en évidence dans la mort cellulaire programmée des cellules dendritiques lorsque celles-ci étaient stimulées par du poly(I:C) (Uzureau et al., 2016). Le domaine BH3 semble également impliqué dans l'activation de l'autophagie (Wan et al., 2008). Toutefois, la fonction cellulaire de chacune de ces 6 protéines reste, à l'heure actuelle, peu décrite. Certains des gènes codant les APOLs, notamment le 1, 2, 3 et 6 sont inductibles par différentes cytokines pro-inflammatoires, y compris l'IFN- γ et le facteur de nécrose des tumeurs (TNF α) dans la lignée hépatocytaire Huh7 et les cellules endothéliales HUVEC (Monajemi et al., 2002 ; Hayashi et al., 2005 ; Schoggins et al., 2011). Ces résultats laissent penser que ces protéines jouent un rôle dans la réponse immunitaire. Elles sont exprimées dans tout l'organisme, même si cette expression reste faible dans beaucoup d'organes. Dans la suite de cette partie, nous détaillerons principalement les caractéristiques des membres APOL1 et APOL3 qui font l'objet de notre étude.

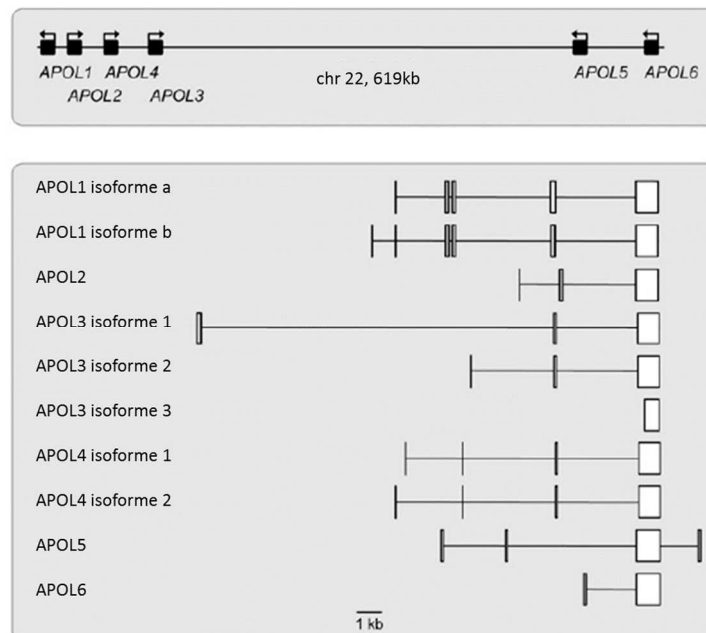


Figure 13. Organisation génomique de la famille de gènes APOL chez l'Homme. (A) Organisation génomique des 6 gènes APOL humains. (B) Structure de chaque gène et représentation des différents exons et isoformes. Adapté de *Smith and Malik, 2009*

1. APOL1

APOL1 est la protéine la plus étudiée de la famille des APOLs. La raison première est son implication dans le contrôle de l'infection par les parasites de l'espèce *Trypanosoma brucei* chez l'homme. Son expression chez les mammifères est très restreinte. En effet, elle n'est retrouvée que chez l'homme et le gorille. Le gène apparait chez d'autres primates mais sous forme tronquée ou sous forme de pseudo-gène (Smith and Malik, 2009). APOL1 est le seul membre de la famille à être secrété. Elle possède un peptide signal nécessaire à son adressage et est retrouvée dans la circulation sanguine (Figure 14).

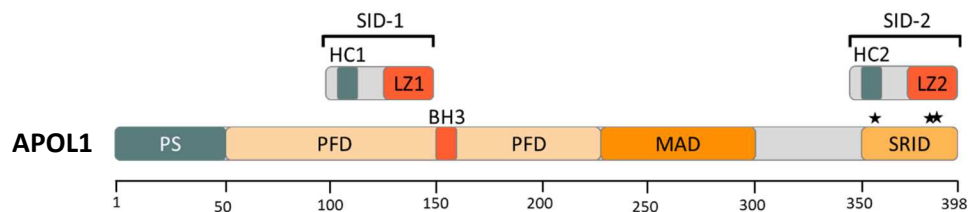


Figure 14. Organisation des domaines structuraux de la protéine APOL1. Abréviations utilisées : PS, péptide signal ; PFD, domaine de formation de pore ; BH3, domaine BH3 pro-apoptotique ; MAD, domaine d'adressage membranaire ; SRID, domaine d'interaction avec la protéine SRA ; SID-1/2, *smallest interacting domains* ; HC1/2, *cluster hydrophobique* 1 et 2 ; LZ1/2, *leucine zipper* 1 et 2. Les étoiles marquent la position des mutations retrouvées dans les génotypes G1 ou G2.

a. APOL1, un composant du facteur de lyse du trypanosome

APOL1 a été retrouvée comme étant un composant du facteur de lyse du trypanosome (Vanhamme et al., 2003). Les trypanosomes sont des parasites unicellulaires qui peuvent infecter différents hôtes vertébrés, notamment les humains et le bétail, et qui sont transmis majoritairement par des vecteurs hématophages. APOL1 est associée aux protéines HPR et ApoA1 au sein de particules lipoprotéiques de hautes densités pour former ce complexe. La protéine HPR va permettre au complexe, via une interaction avec son récepteur présent sur le parasite, d'être endocyté par celui-ci (Vanhollebeke et al., 2008). Plusieurs mécanismes de lyse ont été proposés, toutefois, APOL1 semble à chaque fois être la « toxine trypanolytique ». L'hypothèse qui semble la plus retenue est qu'APOL1 permettrait la perméabilisation de certaines membranes indispensables à l'intégrité du parasite. En effet, APOL1 possède des similarités structurales avec un domaine de formation de pore bactérien. Une des hypothèses proposées, serait qu'à pH acide, APOL1 subisse un changement de conformation qui permettra son insertion dans les membranes lipidiques des lysosomes du parasite. APOL1 pourrait ainsi jouer le rôle de canal à chlorure, permettant une entrée massive d'ions dans le lysosome et un gonflement dû au phénomène d'osmose menant finalement à la lyse du parasite (Pérez-Morga et al.,

2005). Certains auteurs ont toutefois émis l'hypothèse qu'APOL1 pouvait former un canal à cation non spécifique (del Pilar Molina-Portela et al., 2005). Une étude plus récente propose qu'un pH acide est nécessaire à l'enclassement d'APOL1 dans la membrane mais qu'une augmentation de pH serait nécessaire pour activer fortement son activité de canal à cations (Thomson and Finkelstein, 2015). Pour finir, il semblerait que APOL1 soit également à l'origine de la perméabilisation de la membrane mitochondriale et induise ainsi le relargage d'une endonucléase responsable de la fragmentation de l'ADN du parasite (Vanwalleghem et al., 2015). De plus, l'activité de lyse du trypanosome est retrouvée chez l'homme mais aussi chez le gorille. Cependant, elle n'est pas retrouvée chez le chimpanzé. Cela est cohérent avec l'absence de la protéine APOL1 chez le chimpanzé et est un élément de plus pour affirmer le rôle d'APOL1 comme facteur de lyse du trypanosome (Poelvoorde et al., 2004).

De façon intéressante, deux sous-espèces de *Trypanosoma brucei*, *T.b.rhodesiense* et *T.b.gambiense*, peuvent résister à la lyse par APOL1 et sont responsables chez l'homme de la maladie du sommeil. En effet, ces deux sous-espèces vont chacune coder pour un variant de glycoprotéine de surface appelé respectivement SRA (*serum resistance-associated*) et TgsGP (*T.b. gambiense-specific glycoprotein*). SRA est destinée au système endo-lysosomal où elle pourra se lier à APOL1 et ainsi probablement inhiber son insertion dans les membranes et induire sa dégradation par des protéases du parasite (Vanhamme et al., 2003 ; Oli et al., 2006 ; Stephens and Hajduk, 2011). Pour TgsGP, le mécanisme n'est pas tout à fait le même, il n'y a pas d'interaction direct avec APOL1. TgsGP est localisée au niveau du système endosomal du parasite et va permettre, via une interaction avec les lipides membranaires, une rigidification des membranes. Cette rigidification serait la cause d'une inhibition de l'insertion d'APOL1 dans les membranes résultant en une dégradation par les protéases du parasite (Uzureau et al., 2013).

b. Implication dans les pathologies rénales

Plusieurs variants génétiques d'APOL1 sont retrouvés dans la population mondiale. Le variant le plus répandu est APOL1 G0. Les deux autres variants, G1 et G2, sont rares et présents en plus grandes proportions chez les personnes d'origine africaine (Genovese et al., 2010). Ces deux génotypes consistent en des mutations ou délétion dans le dernier exon d'APOL1 et sont par conséquent à l'origine d'une altération de la séquence protéique. Genovese *et al* ont mis en évidence que ces variants, sous forme homozygotes, étaient associés à une incidence plus forte de maladies rénales chroniques comme la glomérulosclérose segmentaire et focale ou l'insuffisance rénale liées à l'hypertension (*hypertension-attributed end-stage kidney disease*, H-ESKD). Il apparait également que les néphropathies associées à l'infection par le virus d'immunodéficience humaine sont plus présentes chez les porteurs de ces génotypes. Avec un risque 29 fois supérieur pour le développement d'une

néphropathie lorsqu'un de ces génotypes est présent sous forme homozygote (Kopp et al., 2011). Toutefois, ces variants permettent de résister à l'infection par *T.b.rhodesiense*. En effet, les mutations ou délétions présentes sur les génotypes G1 et G2 sont présentes au niveau du domaine d'interaction avec SRA (**Figure 14**) (Genovese et al., 2010). Ces parasites étant présent en Afrique, cela a pu être déterminant quant à la sélection des génotypes G1 et G2 dans cette population.

c. APOL1 et virus

La majorité des études menées sur APOL1 se focalisent sur sa fonction anti-trypanolytique. Très peu d'auteurs se sont intéressés à un potentiel rôle antiviral ou pro-viral. Comme dit précédemment, APOL1 est une protéine induite par les IFN, notamment de type I, ce qui peut laisser supposer un rôle dans la réponse antivirale (Hayashi et al., 2005 ; Schoggins et al., 2011). Du fait de sa caractéristique d'ISG, cette protéine est retrouvée dans différents cribles cherchant à identifier des effecteurs de la réponse innée. Nous détaillerons ci-dessous les résultats obtenus pour APOL1 dans certaines de ces études.

Schoggins et ses collaborateurs ont réalisé un crible en sur-exprimant individuellement environ 380 ISGs dans différents types cellulaires infectés par les virus à ARN suivants: HCV, YFV, WNV, CHIKV, VIH ou VEEV (virus de l'encéphalite équine vénézuélienne)(Schoggins et al., 2011). APOL1, APOL2, APOL3 et APOL6 étaient inclus dans ce crible. Une valeur de z score a été attribuée à chaque candidat en fonction de son impact sur l'infection par le virus testé. Le seuil utilisé pour affirmer que la variation observée est significativement différente de celle observée pour la médiane a été fixé à 2, ce qui est pratique courante. Lors de l'infection de la lignée hépatocytaire Huh7 par YFV, le z score obtenu pour les cellules sur-exprimant APOL1 était de 3,17. A titre de comparaison, dans les mêmes conditions, le z score obtenu en présence de LY6E, qui est un ISG ayant une fonction pro-flavivirus, était de 2,95. De même, le z score d'USP18, régulateur négatif de la voie IFN, était de 2,51. Dans ces conditions, APOL1 apparait donc comme un ISG possédant un rôle pro-viral spécifique à YFV dans certaines conditions (Schoggins et al., 2011). Un second crible mené par la même équipe a été réalisé en 2014 sur un plus grand nombre de virus (virus sinbis AR86 et Girdwood, poliovirus, coxackie virus B, virus de la vaccine, virus de la rougeole, virus de la maladie de Newcastle, virus bunyamwera, virus respiratoire syncytial, virus parainfluenza de type 3, virus de l'artrite équine, virus influenza A, métapneumovirus humain, virus o'nyong-nyong). Aucun des ces virus n'a été identifié comme étant sensible à la surpexpression d'APOL1 (Schoggins et al., 2014), ce qui confirme sa spécificité pour YFV dans un contexte de sur-expression.

Une étude de 2019 montre qu'APOL1 est induite également via le facteur de transcription IRF1, qui permet de réguler l'expression de plusieurs ISGs dans les cellules Huh7.5 (Yamane et al., 2019). Dans cette étude l'impact sur différents virus d'une sélection d'ISGs induit par IRF1 a été analysé. Parmi ceux-ci, APOL1 semble avoir un effet antiviral sur HCV lors de l'infection des cellules Huh7.5. En effet, son extinction par ARN interférences (ARNi) induit une augmentation de l'infection par un facteur 3 et sa surexpression permet une inhibition de moitié de l'infection. L'impact sur la réplication de DENV et ZIKV a aussi été examiné mais la conclusion semble moins évidente. En effet, l'inhibition de l'expression d'APOL1 par ARNi, toujours dans des cellules Huh7.5, n'induit pas d'augmentation significative de l'infection par DENV, mais induit une augmentation de l'infection par ZIKV. Cependant, une surexpression d'APOL1 permet de doubler l'infection par DENV, ce qui laisserait supposer un rôle positif pour l'infection par ce virus. Toutefois cette hypothèse n'est pas discutée dans l'article (Yamane et al., 2019). D'autres études se penchant sur les rôles des ISGs dans l'infection virale via une approche « perte de fonction » incluent APOL1 dans leurs analyses (Zhao et al., 2012 ; Li et al., 2013). Toutefois, aucun effet significatif d'APOL1 sur l'infection de cellules Huh7.5 par HCV ou de cellules HeLa par WNV a été mis en évidence.

Le rôle d'APOL1 sur la réplication du VIH dans les cellules monocytaire U-937 a également été étudié. Il semblerait que dans ce contexte, APOL1 joue un rôle restrictif de l'infection. En effet, la surexpression de la protéine induit une diminution de l'infection. De plus, la surexpression d'APOL1 dans des HEK-293T conduit à la dégradation de Vif, protéine virale permettant de protéger le virus contre un autre ISG antiviral, APOBEC3G (Taylor et al., 2014).

Il semble donc qu'APOL1 puisse moduler la réplication de virus non apparentés, en jouant un rôle antiviral contre HCV ou VIH (Yamane et al., 2019 ; Taylor et al., 2014) et pro-viral pour YFV (Schoggins et al., 2011). Néanmoins les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus.

Par ailleurs, APOL1 est impliquée dans les mécanismes d'autophagie (Wan et al., 2008). Ce processus est également décrit comme essentiel pour la réplication des *Flavivirus*. Pour ZIKV, il a été montré que chez les souris n'exprimant pas le gène *Atg16l1*, gène essentiel à l'autophagie, les dommages causés au placenta et au fœtus étaient réduits (Cao et al., 2017). De plus, dans des cellules HeLa et des cellules souches fœtales neurales humaines, la surexpression des protéines NS4A et NS4B de ZIKV induit l'autophagie par inhibition de la voie Akt-mTOR (Liang et al., 2016). Il semble probable que ZIKV détourne ces mécanismes cellulaires pour favoriser sa réplication ou permettre les réarrangements membranaires nécessaires à celle-ci, comme cela a pu être décrit pour DENV ou HCV (Heaton and Randall, 2010 ; Sir et al., 2012). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'APOL1 pourrait avoir un rôle pro-viral lors de l'infection par ZIKV.

2. APOL3

APOL3 est une protéine peu étudiée et son rôle cellulaire reste donc mal défini. En 2010, un polymorphisme nucléotidique simple (SNP) sur le gène codant APOL3 a été mis en évidence et serait un indicateur de risque dans le développement du cancer héréditaire de la prostate (Johanneson et al., 2010). Le rôle d'APOL3 dans l'angiogenèse a aussi été évoqué. En effet, l'activation par phosphorylation des protéines ERK1/2 et FAK est inhibée dans des cellules endothéliales n'exprimant plus APOL3, ce qui suggère une dérégulation de certains gènes angiogéniques (Khalil et al., 2018). Un rôle d'APOL3 dans le métabolisme lipidique est également proposé. Puisqu'il existe des liens entre le métabolisme lipidique et les infections virales, cette fonction potentielle d'APOL3 est détaillée ci-dessous.

a. Rôle dans le métabolisme lipidique

Une étude très récente a montré que APOL3 contribuait à la production de phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P). Dans cette étude, un crible double-hybride chez la levure a permis de mettre en évidence une interaction entre APOL3 et le senseur de calcium neuronal 1 (NCS-1) (Uzureau et al., 2020). Cette interaction, qui n'a pas été observée pour APOL1, nécessite le domaine SID-2 d'APOL3, plus particulièrement le cluster hydrophobique (HC), et le peptide d'interaction présent sur NCS-1 (**Figure 15A**). Toutefois, elle semble nécessiter une forte concentration en calcium pour avoir lieu dans des podocytes (Uzureau et al., 2020). Il est également connu que NCS-1 peut interagir et activer la kinase PI4KB responsable de la production de PI(4)P (Zhao et al., 2001). APOL3 et APOL1 ont été localisées au niveau de l'appareil de Golgi, ou elles colocalisaient avec le PI(4)P (Uzureau et al., 2020). De plus, dans des podocytes n'exprimant pas APOL3, la quantité de PI(4)P est fortement réduite, ce qui n'est pas observé dans les podocytes n'exprimant pas APOL1. Au contraire, dans cette dernière condition il semblerait même que la quantité de PI(4)P soit plus élevée. Le modèle proposé dans cette étude est le suivant : APOL3 interagirait avec NCS-1 dans un environnement riche en calcium. Cette interaction induirait l'activation de PI4KB par NCS-1 et donc aboutirait à une production plus importante de PI(4)P (**Figure 15C**). Toutefois, il est également montré que l'extrémité C terminale de APOL1 peut prévenir l'interaction entre NCS-1 et APOL3 et ainsi inhiber la production de PI(4)P même en présence d'une forte concentration en calcium. Cette inhibition est médiée par l'interaction d'APOL1 avec APOL3 via leur domaine SID. Cette interaction entre en compétition avec l'interaction APOL3 / NCS-1, ce qui permet l'inhibition de la production de PI(4)P (**Figure 15B**). Il semblerait que l'interaction entre APOL1 et APOL3 ait lieu seulement lors que le génotype G1 ou G2 de APOL1 est présent (Uzureau et al., 2020).

Il est également connu que NCS-1 est capable d'interagir avec des canaux à cation (Guo et al., 2002 ; Schlecker et al., 2006). Il semblerait alors plausible qu'APOL3 possède cette fonction, ce qui a été vérifié par Uzureau *et al.* dans des podocytes et dans un environnement riche en calcium. Cependant, l'inhibition par APOL1 de l'interaction entre NCS-1 et APOL3 peut inhiber l'action de canal à cation du complexe.

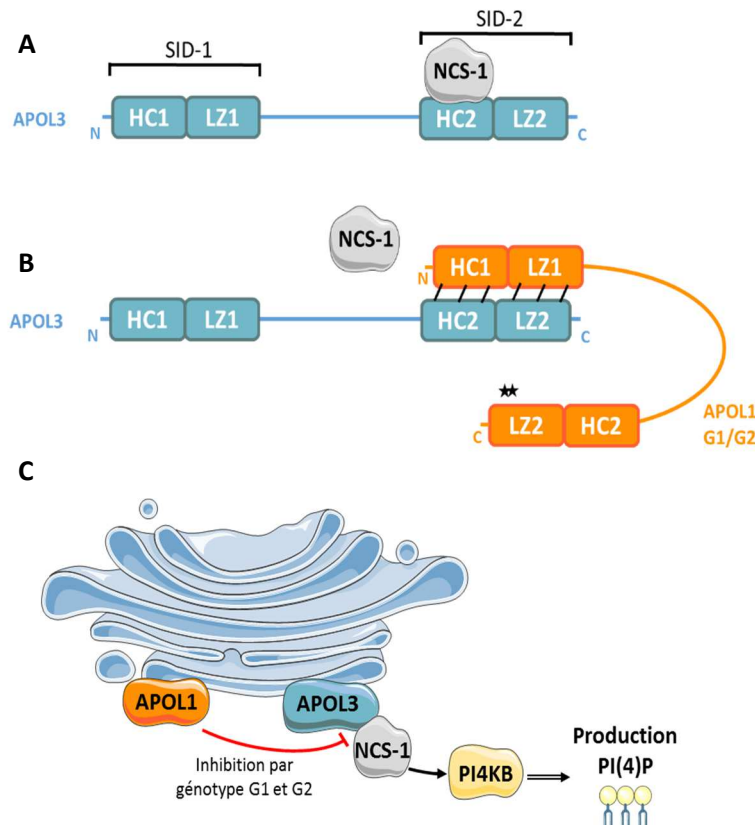


Figure 15. Implication d'APOL3 dans le métabolisme des lipides. (A) Interaction d'APOL3 et NCS-1. (B) Inhibition par APOL1 de l'interaction d'APOL3 et NCS-1. Abréviations utilisées : SID-1/2, *smallest interacting domains* ; HC1/2, *cluster hydrophobique 1 et 2* ; LZ1/2, *leucine zipper 1 et 2*. Les étoiles marquent la position des mutations retrouvées dans les génotypes G1 ou G2. (C) Rôle d'APOL3 dans la production de PI(4)P, la flèche rouge indique une inhibition d'interaction, la flèche noire une activation.

b. APOL3 et virus

Aucune étude à l'heure actuelle ne s'est penchée sur le rôle potentiellement antiviral ou pro-viral d'APOL3. Comme expliqué plus haut, APOL3 est également induit par différentes cytokines pro-inflammatoires (Monajemi et al., 2002 ; Khalil et al., 2018). Tout comme APOL1, on peut donc le retrouver dans certains cribles qui ont pu se concentrer sur le rôle des ISGs dans différents contextes d'infection. Cependant, aucune de ces études, menées sur diverses lignées cellulaires humaines, n'a révélé un impact significatif de la surexpression d'APOL3 sur les infections virales (Schoggins et al., 2011 ; Zhao et al., 2012 ; Schoggins et al., 2014).

Toutefois, dans une étude réalisée en 2019, la fonction d'APOL3 est analysée dans le contexte infectieux de la lignée Huh7.5 par ZIKV. Les cellules transfectées avec un ARNi ciblant APOL3 sont plus permissives au virus que les cellules contrôles, ce qui suggère un rôle antiviral pour APOL3. Cependant,

cette expérience est la seule de l'étude pouvant mener à cette conclusion et ce rôle n'est pas confirmé pour les autres virus testés, ni en condition de surexpression (Yamane et al., 2019).

Par ailleurs, le rôle récemment démontré d'APOL3 dans le métabolisme des lipides dans les podocytes pourrait impacter la réplication de différents virus. En effet, il est établi que le PI(4)P, et donc l'activité de la PI4KB, sont indispensables pour certaines étapes de la réplication de nombreux virus. Cela est notamment le cas des *Enterovirus*, comme le poliovirus ou les coxsackies virus, dans des cellules musculaires (lignée de rhabdomyosarcome humain, RD) et des cellules HeLa (Hsu et al., 2010 ; Arita et al., 2011). Le PI(4)P est aussi nécessaire à la formation des plateformes de réplication de HCV dans des hépatocytes humains (Berger et al., 2011). Il est possible qu'APOL3, de par sa fonction d'activateur de la PI4KB, joue un rôle pro-viral lors de l'infection par HCV et les entérovirus. Toutefois cela n'a jamais été démontré.

Pour certains *Flavivirus*, comme WNV et le virus Usutu, le rôle des PI(4)P ne semble pas important pour la réplication (Martín-Acebes et al., 2011). Pour ZIKV aucune étude n'a été menée sur le sujet et le rôle d'APOL3 dans l'infection reste donc à déterminer.

c. Autres APOLs et modulation de la réplication virale

Quelques études se sont également intéressées aux rôles des autres membres de la famille APOL lors des infections virales, nous allons donc les détailler ci-dessous.

APOL2. Une analyse protéomique mitochondriale a montré qu'APOL2 était surexprimée et re-localisée à la mitochondrie lors de l'infection de cellules A549 par le virus de la grippe porcine (*swine influenza virus*). Les auteurs n'ont pas révélé ici de rôle pro ou antiviral d'APOL2 (Wu et al., 2013b). Cependant, contrairement aux autres APOLs, une activité anti-apoptotique a été décrite pour APOL2 (Liao et al., 2011). D'après l'analyse des auteurs, la surexpression d'APOL2 lors de l'infection par le virus de la grippe porcine permettrait d'inhiber l'apoptose et ainsi d'avoir un effet pro-viral.

Par ailleurs, dans les études menées par Schoggins et ces collaborateurs en 2011 et 2014, APOL2 semble avoir un léger rôle antiviral contre l'infection par HCV mais pro-viral dans le contexte d'infection par le virus influenza A et le virus respiratoire syncytial (Schoggins et al., 2011 ; Schoggins et al., 2014).

APOL9. APOL9 n'est pas présent chez l'homme mais est exprimée chez la souris et le rat. Cette protéine est également inductible par l'interféron et lors de diverses infections virales *in vivo* (Kreit et al., 2015). Par ailleurs, son rôle a été analysé dans le contexte infectieux par le virus de l'encéphalite japonaise (JEV). En effet, lors de l'infection de lignée épithéliale murine B16F10 surexprimant APOL9, un relargage plus important de particules infectieuses est observé, en comparaison des cellules contrôles,

indiquant qu'une étape du cycle viral est favorisée par la surexpression de cette protéine (Arvind and Rangarajan, 2016). Dans cette même étude, les auteurs montrent qu'APOL9 se lie spécifiquement aux phosphatidylethanolamines. Or il a été mis en évidence que ces phospholipides étaient importants pour la réplication de certains virus possédant un génome ARN positif (Xu and Nagy, 2015). Il est donc possible que l'interaction avec ces phospholipides soit importante pour le rôle pro-viral observé pour APOL9. Il est également connu que APOL9 joue un rôle dans les mécanismes d'autophagie, de même, les phosphatidylethanolamines sont aussi impliqués dans ce processus (Thekkinghat et al., 2019 ; Wilson-Zbinden et al., 2015). Dans ce contexte, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'autophagie pourrait ainsi jouer un rôle dans les résultats observés pour l'infection par JEV. Le rôle clair d'APOL1 dans l'autophagie peut aussi nous laisser supposer que les observations faites pour APOL9 dans un contexte infectieux pourraient être transposables (Wan et al., 2008).

Par ailleurs, il a été montré qu'une surexpression d'APOL9 lors de l'infection des fibroblastes murins L929 par un Picornaviridae murin (Theiler's virus) est à l'origine d'une diminution de l'infection. Cependant, cette activité antivirale est restreinte car, dans le même contexte, elle ne permet pas la diminution d'infection par VSV ou l'*Herpesvirus* murin 4 (MuHV-4) (Kreit et al., 2015).

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Ce projet de recherche a pour objectif de mieux comprendre la réponse immunitaire innée qui est mise en place lors d'une infection virale. Nous avons cherché à identifier et caractériser des gènes régulés par différents stimuli, dont les IFN-I, qui seraient capables de moduler la réplication virale. Approfondir les connaissances sur les effecteurs de la réponse immunitaire innée est indispensable pour comprendre les interactions virus-cellules mais aussi les mécanismes développés par les virus pour échapper à cette réponse. Ces connaissances pourront aider à définir des cibles permettant le développement futur d'antiviraux.

Nous avons choisi ici de nous intéresser plus particulièrement à l'identification de ces effecteurs dans le contexte d'une infection par le virus Zika, en utilisant une souche isolée lors de l'épidémie de Polynésie Française en 2013 (PF13) et une lignée cellulaire microgliale (HMC3).

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier, parmi 386 gènes stimulés notamment par l'interféron et sélectionnés par nos collaborateurs suite à une étude de transcriptomique, lesquels pourraient moduler l'infection par le virus Zika. Pour ce faire, nous avons conçu et réalisé un crible à haut débit permettant de cibler individuellement ces 386 gènes puis nous avons déterminé leur impact sur l'infection par immunofluorescence. Nous avons validé les résultats du crible par différentes approches.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à un candidat issu du crible, APOL3. Nous avons élargi notre étude à une protéine de la même famille, APOL1, puisque celle-ci avait été préalablement identifiée comme un modulateur potentiel de la réplication du virus de la fièvre jaune. Nous montrons ici qu'APOL1 et APOL3 jouent un rôle pro-viral lors de l'infection par le virus Zika mais également lors de l'infection par d'autres virus (virus de la dengue, virus du Nil occidental et virus de la stomatite vésiculaire) dans deux types cellulaires différents.

Enfin, nous avons cherché à comprendre les mécanismes cellulaires responsables de la modulation de la réplication virale par ces 2 protéines.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

I. Matériels

1. Cellules

HMC3. La lignée cellulaire HMC3 a été obtenue auprès d'ATCC (CRL-3304). Ce sont des cellules microgliales générées à partir d'embryon humain et transformées par l'ajout du grand antigène T de SV40. Les HMC3 sont cultivées en étuve humide à 37°C, 5 % de CO₂, en milieu Eagle modifié par Dubelcco (Gibco DMEM, Life Technologies) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma), 100 µg/ml de streptomycine et 100 U/ml de pénicilline (Life Technologies), et 1 % d'acides aminés non essentiels (Gibco MEM NEAA 100X, Life Technologies).

Podocytes. Les lignées podocytaires nous ont été fournies par l'équipe d'E. Pays (Université libre de Bruxelles). La lignée sauvage a été obtenue à partir de cellules glomérulaires humaines et immortalisées par ajout de l'expression du grand antigène T de SV40 (Saleem et al., 2002). Cinq lignées ont été obtenues par CRISPR cas9 et sont utilisées en plus des cellules sauvages (WT): les cellules n'exprimant pas APOL1 (APOL1KO), celles n'exprimant pas APOL3 (APOL3KO), celles n'exprimant ni APOL1 ni APOL3 (dKO) et celles n'exprimant pas APOL2 (APOL2KO). Ces lignées ont été séquencées par nos collaborateurs et sont mutées sur les deux allèles des gènes ciblés (Uzureau et al., 2020). Ces cellules sont cultivées en étuve humide à 33°C, 5 % de CO₂, en milieu *Roswell Park Memorial Institute* (Gibco RPMI, Life Technologies) supplémenté avec 10 % de SVF, 100µg/ml de streptomycine et 100U/ml de pénicilline, et Insulin-Transferrin-Selenium (ITS 100X, Life Technologies). Les podocytes sont différenciés 5 à 7 jours à 37°C avant utilisation.

HEK-293T, Sting-37, Vero. La lignée cellulaire de fibroblaste HEK-293T, les cellules STING-37 (cellules HEK-293 exprimant de façon stable la luciférase sous le contrôle de l'élément de réponse stimulé par l'interféron (ISRE) (Khar et al., 2017), ainsi que les cellules de rein de singe (*Chlorocebus sabaeus*) Vero sont cultivées en étuve humide à 37°C, 5 % de CO₂, en milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF, 100 µg/ml de streptomycine et 100 U/ml de pénicilline.

C6/36. La lignée cellulaire de moustique C6/36 est utilisée pour produire le virus Zika. Elle est dérivée d'un broyat de larves de moustiques de l'espèce *Aedes albopictus*. Ces cellules sont cultivées en étuve humide à 28°C, 0 % de CO₂, en milieu Leibovitz (Gibco Leibovitz's L-15 Medium, Life Technologies),

supplémenté avec 10 % de SVF, 2 % de tampon tryptose phosphate (Gibco Tryptose Phosphate Broth 1X, Life Technologies), 1 % d'acides aminés non essentiels et 100 µg/ml de streptomycine et 100 U/ml de pénicilline.

2. Virus

Les virus utilisés lors de notre étude sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Nom du Virus	Souche utilisée	Origine
Virus Zika (ZIKV)	ZIKV PF13	Virus isolé chez un patient en 2013 lors de l'épidémie de Polynésie Française
Virus de la Dengue (DENV)	DENV-2 Malaysia SB8553	Virus isolé chez un patient en 2002 en Malaisie
Virus du Nil Occidental (WNV)	WNV IS-98	Virus isolé chez une cigogne en 1998 en Israël
Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)	VSV Indiana	Donné par l'équipe de Nicolas Escriou (Institut Pasteur, Paris)
Virus de la Rougeole (MV)	MV Schwarz-GFP	Virus issu de la souche vaccinale permettant l'expression de la GFP (Combredet et al., 2003)
Virus coxsackie B3 (CVB3)	CVB3-Nancy	Virus isolé chez un patient en 1949 aux États-Unis

Tableau 5. Virus utilisés au cours de l'étude.

3. Anticorps

Les anticorps utilisés lors de notre étude sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Cible	Référence	Espèce	Application et dilution
Enveloppe (pan Flavivirus)	Production à partir d'hybridomes	Souris	Cytométrie en flux (1/1000 ^{ème}) Immunofluorescence (1/500 ^{ème})
NS5 (ZIKV)	(Mutso et al., 2017)	Lapin	Western blot (1/1000 ^{ème})
G (VSV)	Kerafast, IE9F9	Souris	Cytométrie en flux (1/250 ^{ème})
VP1 (Enterovirus)	Agilent, M7064	Souris	Cytométrie en flux (1/100 ^{ème})
GM130	Cell Signaling, 12480	Souris	Immunofluorescence (1/3200 ^{ème})
PI4KB	Millipore, 06-578	Lapin	Immunofluorescence (1/100 ^{ème})
PI4P	Echelon, Z-P004	Souris	Immunofluorescence (1/200 ^{ème})
ISG56	Thermofisher Scientific	Lapin	Western blot (1/500 ^{ème})
RIG-I	Adipogen, AG-20B-0009	Souris	Western blot (1/1000 ^{ème})
IFITM3	Proteintech, 66081	Souris	Western blot (1/5000 ^{ème})
Actine	Sigma, A5316	Souris	Western blot (1/10 000 ^{ème})

Tableau 6. Anticorps utilisés au cours de l'étude.

Anticorps secondaires. Différents anticorps couplés à différents fluorochromes sont utilisés durant l'étude. Un anti-IgG souris couplé au fluorochrome Alexa 488 (Life Technologies, A11001) est utilisé pour la cytométrie et les expériences d'immunofluorescences à une dilution de 1/1000. Des anti-IgG souris et lapin couplés respectivement aux fluorochromes Alexa 680 (Life Technologies, A21058) et DyLight 800 (ThermScientific, SA5-35571) sont utilisés pour les western blot, à une dilution de 1/5000.

II. Méthodes

1. Biologie cellulaire

a. Virus Zika

Production virale. La production de ZIKV est faite sur les cellules C6/36. Les cellules sont ensemencées à 90 % de confluence dans des flasques de 150 cm² et lavées avec le milieu de culture L15 sans SVF. L'infection est ensuite réalisée dans 12 mL de milieu L15 2 % SVF à MOI 0,1 à 28°C. Après une incubation de 2 h, 18 mL de milieu L15 2 % SVF sont ajoutés. Le surnageant est récolté à 48h post-infection. Ce surnageant est clarifié par centrifugation à 1500 g pendant 15 min pour éliminer les potentiels débris cellulaires. Le stock est concentré par précipitation des particules au polyéthylène glycol (PEG 6000, Sigma, 81255), utilisé à une concentration finale de 7 % (p/v). Le mélange est laissé sous agitation 3h à 4°C, puis les virus sont récoltés par centrifugation (1h15, 1600 g). Les particules virales sont re-suspendues dans du TNE froid (20 mM TrisHCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA). Enfin, le stock viral est purifié par ultracentrifugation (4°C, 2h, 150000 g) sur gradient discontinu de TNE/sucrose (30 %, 60 %). Le stock viral est conservé à -80°C.

Titrage. Les titrations de stocks viraux ou de surnageants sont faites par la technique de plaque de lyse en milieu semi-liquide. Des cellules Vero sont ensemencées en plaque 24 puits à raison de 10⁵ cellules par puit. Le lendemain, les cellules lavées avec du DMEM sans SVF. Des dilutions en série au 1/10 du stock ou du surnageant à doser sont réalisées dans du DMEM 2 %. Le tapis de cellules Vero est ensuite infecté par 200 µL des différentes dilutions. 2 h post infection, le milieu est remplacé par 800 µL d'un mélange en proportion 3:1 de DMEM 2 % SVF et de carboxyméthylcellulose (CMC), contenant 1,6 % de CMC (m/v) (VWR, low viscosity 276494) et 4,25 mg/mL de NaCl. Après une incubation de 3 jours des cellules à 37°C, les plaques sont lavées 2 fois par du PBS puis 400 µL d'une solution cristal violet sont ajoutés pour une incubation d'une quinzaine de minutes. La solution de cristal violet est composée de 0,025 % (m/v) de cristal violet (Sigma), 4 % de formaldéhyde (Sigma) et de 150 mM de NaCl. Pour finir, les puits sont rincés à l'eau et séchés. Ainsi les plages de lyse peuvent être dénombrées et permettre la détermination du titre viral de l'échantillon en nombre d'unité formant des plages par millilitre de surnageant ou PFU/mL (*plaque forming unit*).

Infection. Les cellules sont ensemencées la veille des infections. Les infections sont faites en milieu classique (supplémenté par 10 % SVF) dans un volume réduit de moitié par rapport à la culture cellulaire pour favoriser l'attachement des virus aux cellules. Deux heures post inoculation, la suspension virale est retirée et remplacée par du milieu frais. Pour les cellules ayant préalablement

été transfectées avec différents ARNi ou différenciées pendant plusieurs jours, le nombre de cellules par puits est déterminé juste avant l'infection pour prendre en compte les disparités de croissance entre les conditions.

Test d'attachement et d'entrée. Les tests d'entrée et d'attachement ont été réalisés sur les podocytes. Ceux-ci sontensemencés à $5 \cdot 10^4$ cellules par puits d'une plaque 12 puits. Après différenciation, les cellules sont infectées avec ZIKV à MOI 1 ou 10. L'infection est réalisée sur glace et avec du milieu froid pour permettre l'attachement des virions tout en bloquant l'internalisation des particules virales. Après 1 h d'incubation avec le virus, les puits sont rincés 3 fois avec du PBS froid. Une moitié des échantillons est lysée pour analyse en qPCR pour le test d'attachement. L'autre moitié des échantillons est incubée 2 h à 37°C avec un milieu frais. Après l'incubation, les cellules sont rincées au PBS et traitées 30 min à la trypsine pour permettre l'élimination des particules virales adsorbées mais non internalisées dans les cellules. Enfin, les échantillons sont lysés à leur tour pour une analyse qPCR qui permettra la quantification de l'ARN viral présent dans les cellules.

Test de fusion. Ce test est réalisé grâce à la méthode BlaM-Vpr et du kit *beta-lactamase loading solution* (K1085, Life technologies). Pour ce test, des particules pseudo-virales non infectieuses ou *viral like-particles* (VLP) permettant l'expression de la protéine Vpr du VIH sont nécessaires. Ces VLP sont produites sur cellule HEK-293T et incorporent la protéine d'enveloppe de VSV (VSV-G). Le réactif de transfection TransIT 293T (Mirus) est utilisé pour transfecter les plasmides p.8.91 (codant pour les protéines Gag-Pol du VIH), VSV-G et BlaM-Vpr PMM310 dans les proportions 5/1/1,5. Deux jours post transfection, le surnageant contenant les VLP est récolté et filtré. Pour permettre une concentration des particules, le surnageant est ultra centrifugé 2 h à 24200 rpm à 4°C. Le culot est re-suspendu en PBS et stocké à -80°C.

Les différentes lignées de podocytes (WT, KO APOL3, KO APOL1) sont utilisées en suspension dans du milieu complet supplémenté avec 1 % de polybrène (Sigma, H9268) pour atteindre une concentration de 100000 cellules dans 50 µL. Différentes quantités de VLP sont ajoutées aux 50 µL de cellules. Pour favoriser l'infection et synchroniser la fusion, une étape d'inoculation par centrifugation est réalisée pendant 1 h 30 à 800 g. Les cellules sont incubées 3h en présence des VLP à 37°C et sont ensuite récoltées et rincées avec du milieu CO2 indépendant (Gibco, Life Technologies). 150 µl de solution contenant le réactif CCF2 sont incubés 2 h 30 sur les cellules. Enfin, les cellules sont fixées 20 min au paraformaldéhyde 4% (ChemCruz) et analysées par cytométrie en flux.

b. Transfection

Transfection des ARNi dans les cellules HMC3. Les cellules HMC3 sontensemencées à raison de $3,2 \cdot 10^4$ cellules dans des plaques 24 puits la veille de la transfection. Le réactif de transfection utilisé pour les ARNi est l'Interferin (Polyplus Transfection). Par puit, 1,5 μ L d'Interferin dilué dans 100 μ L d'optiMEM (Life Technologies) permet la transfection de 6 pmol d'ARNi pour une concentration finale d'ARNi de 10 μ M. Pour l'ARNi ciblant APOL1, une concentration finale de 20 μ M est utilisée pour un meilleur résultat d'extinction d'expression. Le mélange ARNi, Interferin, optiMEM est vortexé puis incubé 15 min à température ambiante avant inoculation sur les cellules. Le milieu est changé 24 h post-transfection, lors de l'infection des cellules ou d'un éventuel traitement à l'IFN.

Transfection des ARNi dans les podocytes. Les lignées de podocytes sontensemencées à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules par puit dans des plaques de 12 puits la veille de la transfection. Le réactif de transfection utilisé est la Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies). Par puit, 4 μ L de lipofectamine dilué dans 75 μ L d'optiMEM (Life Technologies) permettent la transfection de 11,5 pmol d'ARNi préalablement dilué dans 75 μ L d'optiMEM, pour une concentration finale d'ARNi égale à 10 nM. Le mélange Lipofectamine, optiMEM et ARNi est vortexé puis incubé 10 min à température ambiante avant inoculation sur les cellules. Le milieu est changé 24 h post-transfection, lors de l'infection des cellules ou d'un éventuel traitement à l'IFN.

Transfection du plasmide ISRE-Luc. Les cellules 293T sontensemencées à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puit dans des plaques 24 puits la veille de la transfection. Le réactif utilisé pour la transfection du plasmide est le Trans-IT 293T (Mirus). Par puit sont ajoutés : 2 μ L de Trans IT, 50 μ L d'optiMEM, 100 ng du plasmide ISRE-Luc, 40 ng du plasmide GFP (qui sert de contrôle de transfection) ainsi que 5 à 15 ng du plasmide permettant l'expression de APOL3. La solution est homogénéisée par pipetages répétés puis incubée 15-20 min à température ambiante avant inoculation sur les cellules. Le milieu est changé 24 h post transfection, lors du traitement des cellules avec 500 U/ml d'IFN. Les cellules sont ensuite lysées et analysées comme détaillé plus bas.

c. Analyses de biologie cellulaire

Cytométrie en flux. Pour l'analyse des échantillons en cytométrie en flux, les cellules sont dissociées par traitement à la trypsine puis lavées au PBS et enfin fixées et perméabilisées à l'aide du kit BD Cytotfix/cytoperm (BD Bioscience, #554714). Les cellules infectées par ZIKV, DENV ou WNV sont marquées par l'anticorps primaire anti-enveloppe (pan-*Flavivirus*) 4G2. L'infection par VSV est détectée par l'anticorps anti-enveloppe VSV-G. L'anticorps secondaire utilisé est l'anti-IgG souris

couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488. Les marquages sont réalisés par incubation de 45 min à 4°C et à l'obscurité. Après la fixation trois lavages sont fait à l'aide du tampon de lavage du kit et deux lavages sont réalisés après chaque marquage (centrifugation 5 min, 300 g pour les cellules vivantes, 400 g pour les cellules fixées). Les cellules positives sont comptabilisées avec le cytomètre Attune NxT (Life Technologies).

Immunofluorescence. Pour chaque analyse en immunofluorescence, les cellules étudiées sont préalablement ensemencées sur lamelle de verre. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4 % pendant 15 à 20 minutes. Puis les cellules sont lavées au PBS puis perméabilisées à l'aide d'une solution de PBS 0.5 % Triton X-100 pendant 15 min à température ambiante. Après lavage au PBS, la saturation des sites de liaisons aspécifiques est réalisée 30min à température ambiante avec une solution de PBS, 0.05 % tween (Sigma), 5% BSA (Sigma). Les anticorps utilisés pour les immunomarquages sont dilués dans cette même solution, et incubés sur les cellules 1 h à température ambiante. Après trois lavages avec la solution de saturation, l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome et ciblant l'anticorps primaire est incubé sur les cellules de la même façon. Le marquage nucléaire à lieu dans un second temps par incubation des cellules avec une solution de PBS/NucBlue (Life Technologies, R37606). Pour finir, les lamelles sont lavées au PBS et montées sur lame avec le milieu de montage Prolong Gold (Life Technologies, P36930). Les acquisitions d'images sont effectuées avec le microscope LSM 700 (Zeiss).

Test luciférase. Le test luciférase est utilisé pour analyser l'impact d'APOL3 sur la régulation transcriptomique médié par ISRE (Interferon stimulated response element). Ce test est réalisé sur les lysats des cellules 293T ayant été préalablement transfectées avec différents plasmides (cf Transfection plasmide ISRE-Luc). La lyse des cellules est réalisée sur glace par ajout de 100 µl de tampon de lyse passive de Proméga (E194A) et incubation de 20 min sous agitation. 10 µl de lysat sont incubés 10 min avec 50 µl du réactif Firefly puis la luminescence est mesurée pour quantification avec un lecteur de plaque Varioscan Lux (Thermo Fisher Scientific).

2. Biologie moléculaire

a. Analyse de l'expression des gènes et de la réplication virale

Extraction des ARN cellulaires et viraux. L'extraction des ARN est réalisée à l'aide du kit d'extraction NucleoSpin RNA (Machery-Nagel, #740955). Les cellules sont lavées au PBS puis lysées à l'aide du tampon RA1 supplémenté avec 1% de β-mercaptoéthanol (Sigma). L'élution est faite à l'eau sans RNase dans un volume de 40 µL. Les ARN sont conservés à -80°C.

Transcription inverse. Les ARN vont ensuite servir de matrice pour la synthèse des ADN complémentaire (ADNc). Pour cette étape, le kit RevertAid H Minus First strand cDNA Synthesis (ThermFischer scientific) est utilisé avec des amorces hexamériques randomisées. Une quantité minimale de 250 ng d'ARN et un maximum de 1 µg est utilisée pour cette réaction. Les ADNc sont conservés à -20°C. Pour certains échantillons (notamment la quantification de l'induction des ISGs), la transcription inverse a été réalisée à l'aide du kit SuperScript IV VILO (ThermFischer scientific). Ce kit permet une quantification plus fine des ARN présents dans les échantillons.

Analyse par PCR quantitative (qPCR). Pour les analyses de qPCR, nous avons utilisé le kit FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) et la machine QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems). La qPCR est réalisée sur 5 µL d'ADNc et en triplicat technique selon le cycle suivant : 1 cycle de 2 min à 50°C, 10 min à 95°C puis 40 cycles de 15 s à 95°C, 1 min à 60°C. Une courbe de dissociation est également réalisée avec 1 cycle de 15 s à 95°C, 1 min à 60°C suivis d'une augmentation de la température jusqu'à 95°C selon un gradient de 0,05°C/s. La liste des amorces utilisées est présente en annexe dans le **tableau 10**. Pour le calcul de l'expression différentielle des gènes nous utilisons la méthode de calcul du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et le gène cellulaire codant la D-glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est utilisé comme gène de ménage. Pour la quantification de copie des génomes viraux nous utilisons, pour chaque expérience, une dilution en série du plasmide pcDNA6.2 ZIKV (contenant le génome complet de la souche MR766 de ZIKV) (Schwarz et al., 2016). Les résultats de l'analyse de la répllication virale sont exprimés en génome équivalent par µg d'ARN total.

b. Analyse de l'expression protéique

Les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (Sigma, #R0278), complémenté avec un inhibiteur de protéase (Roche), pendant 20 min à 4°C. Une centrifugation à 20000 g est réalisée pour enlever tous débris cellulaires et le surnageant est conservé. Les échantillons sont dénaturés pendant 10 min à 70°C avec un tampon decharge (Thermo Fisher Scientific, Pierce, LDS sample loading buffer 4X), avec ou sans agent réducteur (Thermo Fisher Scientific, sample reducing agent 10X). L'électrophorèse est réalisée avec le système NuPAGE (Life Technologies) sur un gel à gradient 4-12 % de polyacrylamide. Le transfert sur membrane de nitrocellulose est réalisé grâce au système Trans-Blot Turbo (BIO-RAD). Les sites aspécifiques sont saturés 1 h à température ambiante, dans une solution de PBS contenant 5 % (m/v) de lait écrémé (Régilait). Les anticorps utilisés pour les marquages sont dilués dans une solution de PBS contenant 0.1 % de Tween 20 et 5 % de lait écrémé (Régilait). Le marquage avec l'anticorps primaire est réalisé sur une nuit à 4°C. Le marquage avec l'anticorps secondaire est réalisé pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Trois lavages de 10 min dans une solution de PBS contenant 0.1 % de Tween sont effectués après chaque marquage. La révélation des

membranes est faite avec le système Odyssey CLx (LI-COR). L'expression relative des protéines est quantifiée avec le logiciel Image Studio Lite v5.2.

3. Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism. En fonction des données analysées, différentes transformations mathématiques ont été appliquées pour permettre aux données de suivre une distribution Normale. Pour les données de cytométrie la transformation suivante a été effectuée : $\log(x / (1-x))$ (x étant la proportion de cellule positive, compris entre 0 et 1). Pour les données de RT-qPCR, nous avons effectué l'opération suivante : $\log(1+\text{expression en qPCR})$. Pour les autres expériences, les analyses statistiques ont été réalisées sur les données brutes. En fonction du contexte, les données transformées ont été soumises aux tests suivants : t-test multiples appariés, test de Dunnett et test de Sidak. Des valeurs de probabilité p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives.

III. Crible à haut débit

1. Construction de la banque d'ARN interférents

L'objectif de cette banque est de regrouper des ARNi ciblant différents gènes jouant un rôle dans la mise en place de l'état antiviral d'une cellule. Cette banque a été conçue dans l'équipe de Nicolas Manel (Institut Curie, Paris) pour permettre l'identification de potentiels facteurs de restriction présents dans des lymphocytes T CD4+ (LT CD4+) dans le contexte d'une infection par le VIH-1. Des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC) purifiées à partir du sang de huit donneurs différents ont été stimulées avec 7 stimuli : IFN α , VIH-1, VIH-2, MVA (Modified Vaccina Ankara), poly(I:C), poly(dG:dC), R848 (un agoniste de TLR7 et TLR8). Ces cellules ont ensuite été co-cultivées avec des LT CD4+ durant 8 jours. Il a été montré que la co-culture avec des MDDC stimulées avec l'IFN α , VIH-2, le MVA, le poly(I :C) et le poly(dG :dC) permettait d'inhiber l'infection subséquente des LT CD4+ par le VIH-1. Ces résultats suggèrent une induction de facteurs de restriction au niveau des LT CD4+. Afin d'identifier ces gènes, une étude Affimetrix sur les LT CD4+ a été réalisée pour identifier, dans ces différentes conditions de stimulation, quels gènes possédaient un profil d'expression comparable à MX1. MX1 a été choisi comme gène de référence car c'est un facteur de restriction bien décrit pour le VIH-1 et qui est induit, notamment, par l'IFN-I. Ainsi, 386 gènes ont été identifiés (**Annexes, Tableau 9**).

2. Approche utilisée

Ensemencement des cellules HCM3. L'ensemencement est réalisé au matin du jour 0. Les cellules sont réparties dans quatre plaques de 384 puits à raison de 500 cellules par puits dans 40 μ l de milieu. L'ensemencement est robotisé par l'utilisation d'un *MultiDrop combi liquid dispenser* (Thermo Fisher Scientific). Le comptage des cellules se fait à l'aide d'un compteur de cellule automatique (*T4 Cellmeter cell counter*, Nexcelom).

Transfection de la banque. La transfection de la banque d'ARNi est réalisée 4 h (+/-1h) post ensemencement. Un total de 1158 ARNi (*silencer select*, Ambion) permet de cibler les 386 gènes de la banque (3 ARNi individuels par gène). Une concentration finale de 10 nM d'ARNi par condition a été choisie et la transfection est faite par ajout de 0,05 μ l du réactif de transfection 'Interferin' (Polyplus Transfection) par puit. Cette étape est également robotisée via l'utilisation d'un Evo 150, MCA384 (Tecan). Les ARNi contrôles, NT (*non-targeting*) et KIF11, sont répartis sur les colonnes 1, 2, 23 et 24 des différentes plaques. L'ARNi KIF11 permet l'inhibition d'une kinase cellulaire indispensable à la division cellulaire. Si la transfection est efficace, un fort pourcentage de mort cellulaire sera observé.

Traitement IFN. 24 h post-transfection, les cellules sont traitées avec de l'IFN α 2a, à une concentration finale de 1000 U/mL (Sigma-Aldrich, SRE0013). L'IFN α est dilué dans du milieu de culture et 10 μ L sont ajoutés à chaque puit.

Infection par ZIKV. 24 h post traitement IFN α 2a, le surnageant de chaque puit est remplacé par 40 μ L de milieu contenant 7500 particules infectieuses de ZIKV (PF13). Le stock utilisé avait un titre de $6,5 \times 10^8$ pfu/mL, mesuré par plage de lyse sur cellules Vero. En prenant en compte la croissance des cellules entre l'ensemencement et l'infection, une MOI d'environ 3,5 a été utilisée. Les cellules sont incubées 24 h en présence du virus et avant fixation.

Immunofluorescence et acquisition d'image. Les cellules sont fixées au formaldéhyde 4 % (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes. Les plaques sont ensuite rincées au PBS et traitées 10 minutes au chlorure d'ammonium (NH₄Cl, 50 mM) pour permettre un blocage des aldéhydes libres et une diminution du bruit de fond lors de l'acquisition des images. Le blocage des sites non spécifiques d'adsorption des anticorps est fait par incubation pendant 15 min des cellules avec une solution de PBS, BSA 1 % et saponine 0,02 %. Par la suite, les cellules sont perméabilisées avec une solution de Triton X-100 0,5 % pendant 5 min. L'anticorps 4G2 est utilisé comme anticorps primaire dilué au 1/500 dans une solution de PBS, BSA 1 %, saponine 0,02 % et ajouté sur les cellules avec une incubation de 1 h à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées deux fois au PBS et incubée dans les mêmes conditions avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 (ThermoFischer Scientific). Un marqueur nucléaire, Hoechst (Sigma), est ajouté à l'anticorps secondaire à une concentration finale de 0,2 μ g/mL. Pour finir les cellules sont rincées une fois au PBS et les images sont acquises à l'aide d'un INCell2200 (GE Healthcare). L'acquisition est faite par un objectif Nikon 10X/0,45, Plan Apo, CFI/60. Trois images par puit sont réalisées.

3. Analyses des résultats du crible

Deux analyses indépendantes ont été réalisées pour étudier les résultats du crible pour permettre l'identification d'un maximum de candidats.

a. Analyse 1 : segmentation des cellules et quantification du marquage d'enveloppe

Cette première analyse consiste en la segmentation de chaque cellule présente sur chaque image acquise. La segmentation est réalisée à partir du logiciel *IN Cell Analyzer 3.7 Workstation (GE Healthcare)* et va permettre d'obtenir le contour de chaque cellule et de les individualiser. Une fois cette étape opérée, l'intensité du marquage fluorescent de la protéine d'enveloppe de ZIKV est

quantifiée par cellule. Ainsi, pour une condition donnée, un pourcentage de cellules infectées est obtenu. Ce pourcentage est moyenné pour les trois images obtenues pour une même condition. Cette méthode de quantification de l'intensité du marquage de l'enveloppe virale nous permet également d'identifier des conditions pour lesquelles le pourcentage d'infection est similaire à celui du contrôle mais où l'intensité du signal (et donc la production de protéines virales) de chaque cellule est plus développé ou plus intense que dans les conditions contrôles, nous apportant ainsi une information complémentaire.

Cette analyse prend en compte l'emplacement de chaque condition dans la plaque de culture. En effet, lors d'un crible, il est possible d'observer un effet local en fonction des positions des puits dans les plaques de culture. Pour s'affranchir de cet effet, une opération est réalisée consistant en la soustraction à chaque condition de la médiane de la ligne de puit, de celle de la colonne et de la médiane de cette position dans chaque plaque de culture d'un même réplicat. Cette opération est répétée et après dix itérations, une valeur est obtenue permettant la quantification de l'effet de position (Malo et al., 2006).

Enfin, pour déterminer si la variation d'infection observée pour une condition donnée est significativement différente de la variation observée pour l'ensemble des conditions, le Z-Score robuste (rZ-Score) est calculé. Ce calcul est basé sur l'hypothèse que la majorité des conditions n'aura pas d'effet sur l'infection virale et ainsi chaque condition est considérée dans la population de références. De cette population de référence sont cependant exclus les contrôles phénotypiques que sont les conditions ayant reçu les ARNi ciblant IFNAR1 et IFNAR2, car nous savons que ces conditions ont un impact important sur le taux d'infection. Le rZ-Score est calculé de la manière suivante :

$$rZ\text{-Score} = \frac{x - med(pop\ réf)}{1.4826 \times med(|pop\ réf - med(pop\ réf)|)}$$

Avec - x , pourcentage d'infection dans la condition
 - med , la médian
 - $pop\ réf$, la population de référence, ici, pourcentage d'infection de toutes conditions excepté les contrôles

b. Analyse 2 : dénombrement des noyaux et des foyers d'infection

La seconde analyse a été réalisée à l'aide du logiciel CellProfiler. Cette analyse est basée sur le dénombrement des noyaux présent sur chaque image, ce qui permet de déduire le nombre de cellules. Dans un second temps, les sites intracellulaires de réplication sont également dénombrés, ainsi, nous pouvons obtenir un pourcentage d'infection, regroupant la moyenne des trois images, pour une

condition donnée. Cette stratégie permet de déterminer si une cellule est infectée ou non mais ne donne pas d'information concernant la taille ou l'intensité du marquage du site de réplication. De la même manière que précédemment, le rZ-Score est déterminé.

Cette analyse n'apporte pas d'informations supplémentaires en comparaison à l'analyse précédente. Cependant, elle permet une approche légèrement différente quant à la quantification des cellules infectées. Cela permet la validation de certains autres candidats et l'élimination de faux négatifs dans la première analyse.

c. Sélection des candidats

La sélection des candidats est basée sur les deux analyses indépendantes. Sont choisis comme candidats les gènes pour lesquels 2 ARNi sur 3 dans l'une des 2 analyses permettent l'obtention d'un rZScore inférieur ou égale à -2 ou supérieur ou égale à 2.

Comme expliqué précédemment, l'analyse 1 nous apporte une information concernant l'intensité du marquage de l'enveloppe virale. Ainsi pour cette analyse sont pris en compte également les candidats permettant l'obtention de marquages plus ou moins intenses par rapport à la médiane globale (toujours avec pour valeur seuil du rZScore -2 et 2).

Pour la seconde analyse, beaucoup de candidats possédaient un rZScore inférieur ou égale à -2. Pour diminuer la présence de faux positifs sur cette analyse nous avons choisi d'ajouter une condition pour la sélection. Les candidats possédant un rZScore inférieur ou égale à -2 doivent également avoir un pourcentage d'infection diminué d'au moins 50 % comparé à la médiane.

Résultats

Partie I

Résultats - Partie I :

Un crible à haut débit identifie des gènes de la réponse innée capable de moduler l'infection par le virus Zika

L'objectif de ce travail était de développer une stratégie pour identifier des gènes cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire et étant capables de moduler la réplication du virus Zika.

Différentes approches basées sur la perte de fonction ou la surexpression ont permis de découvrir des ISGs impliqués dans le contrôle de l'infection par ZIKV comme IFI6, IFITM3 ou la Vipérine (Richardson et al., 2018 ; Savidis et al., 2016a ; Van der Hoek et al., 2017). Des ISGs favorisant l'infection comme LY6E et MCOLN2 ont également été mis en évidence (Hackett and Cherry, 2018 ; Rinkenberger and Schoggins, 2018). Afin d'identifier de nouveaux gènes de la réponse immunitaire qui jouent un rôle lors de l'infection par ZIKV, nous avons conçu et réalisé un crible à haut débit basé sur une approche de 'perte de fonction'.

I. Outils pour la mise en place du crible à haut débit

La banque. La banque d'ARN interférents (ARNi) a été conçue pour un autre projet mis en place dans l'équipe de Nicolas Manel, à l'institut Curie. Sa conception est détaillée dans la partie Matériel et Méthode. Le projet initial avait pour objectif d'identifier des gènes responsables de la résistance de lymphocytes T CD4+ à l'infection par le VIH-1. Dans ce contexte, des cellules dendritiques dérivées de monocytes (MDDC) ont été stimulées avec 7 stimuli différents (IFN α , VIH-1, VIH-2, MVA, poly(I:C), poly(dG:dC), R848). Les MDDC ainsi activées vont permettre la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires (notamment IP-10, TNF α , IFN-I). Ces MDDC ont ensuite été co-cultivées avec des lymphocytes T CD4+ sur lesquels une analyse transcriptomique a permis d'identifier les gènes possédant le même profil d'expression que le gène MX1, un ISG bien caractérisé, lors des différentes co-cultures (**Figure 18**) (Manel et collaborateurs, en préparation). 386 gènes ont été ainsi identifiés et la banque utilisée regroupe des ARNi ciblant ces gènes (**Annexes, Tableau 9**). Chaque gène est ciblé par trois ARNi indépendants afin d'écartier des résultats aberrants qui pourraient être observés si un ARNi venait à inhiber l'expression d'un autre gène que le gène ciblé (effets *off target*). La stratégie utilisée pour la construction de cette banque a permis de mettre en évidence des gènes régulés par différentes cytokines pro-inflammatoires et d'élargir les listes des précédentes études comprenant

uniquement des ISGs. Ainsi, dans cette banque, 47 % des candidats n'apparaissent pas dans la liste utilisée par Schoggins et ses collaborateurs pour son étude de 2011 (Schoggins et al., 2011).

Différents ARNi contrôles sont présents dans cette banque. Le contrôle technique permet de s'assurer que la transfection des ARNi a été effectuée avec succès. Nous utilisons pour cela un ARNi ciblant une protéine cellulaire indispensable à la division cellulaire, KIF11. Dans cette condition, répétée et répartie sur les différentes plaques du crible, nous pouvons voir que la transfection a bien eu lieu lors du comptage du nombre de cellules présentes dans chaque puit. Si la transfection est efficace, la mort cellulaire sera très élevée dans les puits recevant l'ARNi ciblant KIF11.

Plusieurs contrôles biologiques sont également présents pour nous permettre d'analyser les résultats obtenus. Tout d'abord, nous utilisons des ARNi dirigés contre IFNAR1 et IFNAR2 comme contrôles positifs. En effet, inhiber l'expression des sous-unités du récepteur à l'IFN-I va permettre de bloquer la cascade de signalisation menant à la production des ISGs. Ainsi, tous les effets des ISGs dûs au traitement IFN seront abolis et l'infection par ZIKV sera rétablie. Des ARNi permettant une augmentation de l'infection comparable à celle des contrôles positifs pourra nous permettre d'affirmer le rôle antiviral du gène cible. Comme contrôle négatif, nous utilisons un ARNi ne ciblant aucun gène (ARNi NT). Cette transfection n'aura pas d'impact sur l'infection et nous pourrons comparer toutes nos conditions à cette condition contrôle.

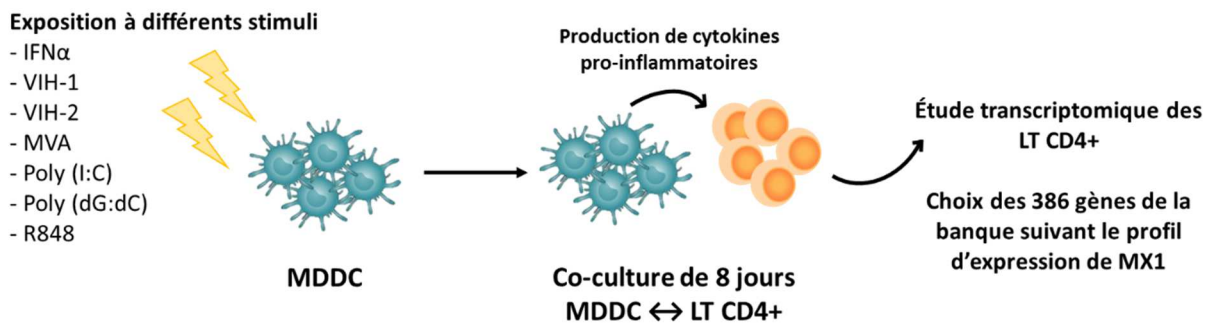


Figure 16. Conception de la banque. Des cellules dendritiques dérivées de macrophages (MDDC) précédemment activées par différents stimuli, sont co-cultivées 8 jours avec des lymphocytes T CD4+ (LT CD4+). Une étude transcriptomique a ensuite été menée pour identifier les gènes dont l'expression variait de façon similaire à MX1. 386 gènes ont été identifiés et 3 ARNi par gènes composent la banque.

Choix des cellules. Pour réaliser notre crible à haut débit, nous avons choisi de travailler sur une lignée cellulaire microgliale, les HMC3. Ce modèle nous a paru pertinent dans le contexte d'une infection par ZIKV. En effet, le neurotropisme de ZIKV n'est plus discuté et l'infection des cellules microgliales primaires humaines par ZIKV est bien décrite (Lum et al., 2017). Cette infection des cellules microgliales

induit la forte production de cytokines pro-inflammatoires qui est responsable d'un phénomène de neuro-inflammation (Lum et al., 2017). Par ailleurs, l'infection de la microglie par ZIKV induit des changements de morphologie de celle-ci mais également une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux et de la neurogenèse (Noronha et al., 2016 ; Wang et al., 2018). Dans ce contexte, l'infection de la microglie semble une des causes à l'origine d'apparition de microcéphalie ou de syndrome de Guillain Barré suite à une infection par ZIKV.

II. Stratégie et optimisation des conditions du crible

Stratégie du crible. Le crible a été réalisé sur 4 jours (**Figure 17**). Le format utilisé est la plaque 384 puits. Au jour 0, l'ensemencement des cellules HMC3 est réalisé à raison de 500 cellules par puits, suivi de la transfection des cellules par les ARNi. Chaque gène de la banque est ciblé par trois ARNi uniques. Au jour 1 est effectué le traitement à l'IFN α qui permet l'induction d'un état antiviral de la cellule. Le jour 2 consiste en l'infection des cellules par 7500 particules virales infectieuses par condition. Pour finir, 24h post-infection, nous avons quantifié le nombre de cellules infectées par immunofluorescence à l'aide d'un marquage de la protéine d'enveloppe. Ci-dessous nous détaillons les raisons qui nous ont menées aux choix des conditions utilisées.

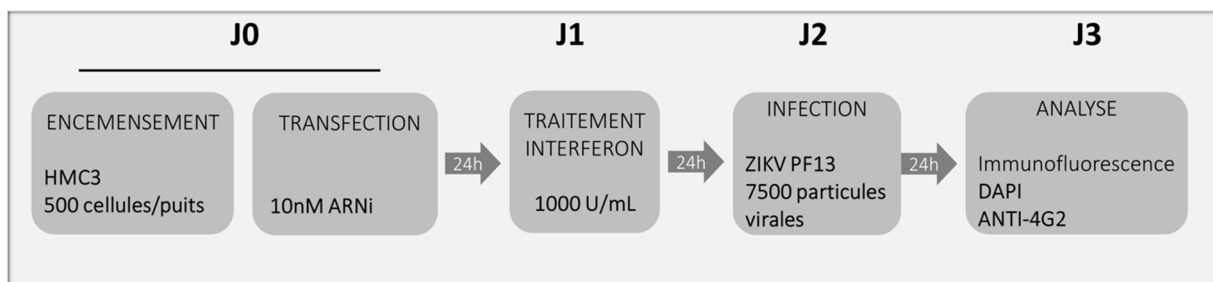


Figure 17. Déroulement du crible.

Optimisation du traitement IFN α et des conditions d'infection. Nous avons choisi de réaliser le crible dans un environnement antiviral. Ce traitement à l'IFN α instaure un état antiviral en induisant l'expression des ISGs. Cet état nous permettra d'observer une amplitude plus importante de l'expression des gènes lors de la transfection des ARNi les ciblant. Autrement dit, l'inhibition d'un gène dont l'expression a été précédemment amplifiée sera plus facilement détectable. Cependant, la dose choisie a dû être mise au point pour permettre une induction suffisante des ISGs et une inhibition de l'infection par ZIKV, tout en étant assez faible pour permettre le rétablissement de l'infection lorsqu'un gène antiviral était ciblé par l'ARNi (**Figure18**).

Le taux d'infection a dû être optimisé de façon concomitante au traitement IFN. En effet, ce dernier impacte très fortement l'infection des cellules HMC3 par ZIKV. Ces mises au point ont été réalisées avec un ARNi NT (*non targeting*, ne ciblant aucun gène) comme contrôle négatif et un ARNi ciblant IFNAR comme contrôle positif. Nous avons également choisi d'ajouter à cette étude préliminaire un ARNi ciblant IFITM3, un ISG connu pour bloquer la réplication du virus (Savidis et al., 2016a). Le **figure 18** représente le pourcentage d'infection des HMC3 dans les différentes conditions testées. On peut voir que le traitement IFN α à 1000 U/ml permet une meilleure inhibition de l'infection par ZIKV que le traitement à 500 U/ml. Cette inhibition est levée entièrement lorsque les cellules sont

transfectées avec un ARNi ciblant IFNAR1 ou partiellement lors de la transfection par un ARNi ciblant IFITM3. Par ailleurs la condition d'infection à 7500 particules par puit n'est pas saturante contrairement à l'infection par 12500 particules, la première à donc été choisie pour la réalisation du crible. Nous souhaitons avoir un taux d'infection intermédiaire nous permettant de mettre en évidence l'impact activateur des ARNi ciblant les gènes avec une fonction antivirale mais également l'effet inhibiteur que peuvent avoir les ARNi ciblant des gènes avec une fonction pro-virale. Ainsi nous avons choisi un pourcentage d'infection d'environ 25 % pour les cellules ayant été transfectées avec les ARNi NT.

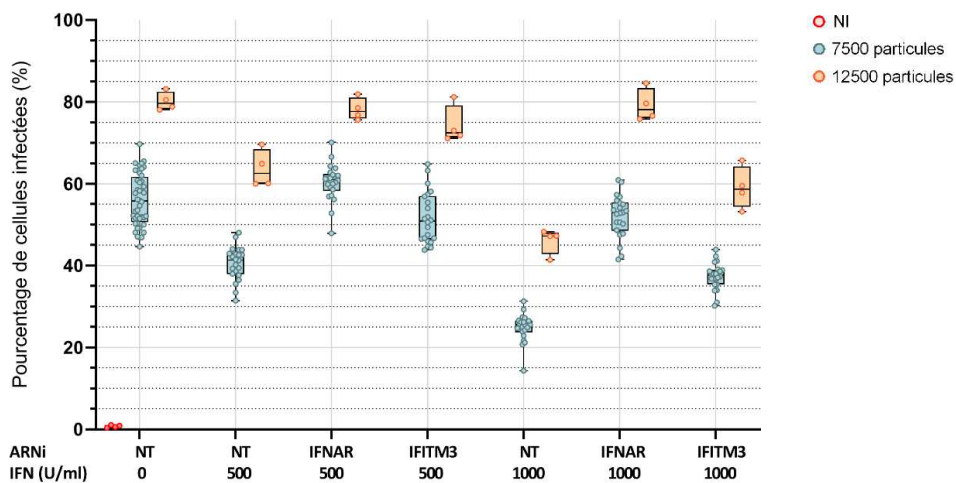


Figure 18. Optimisation du traitement IFN et des conditions d'infection. Les HMC3 sont transfectées avec des ARNi contrôle (NT) ou ciblant IFNAR1 ou IFITM3. Les cellules sont ensuite traitées avec différentes doses d'IFN α . 24h après le traitement, les cellules sont infectées par ZIKV avec 7500 ou 12500 particules infectieuses. Le pourcentage d'infection des cellules est déterminé par immunofluorescence par le marquage de la protéine d'enveloppe de ZIKV. Le contrôle non infecté (NI) est représenté en rouge.

Quantification par immunofluorescence. Nous avons utilisé un anticorps reconnaissant la protéine d'enveloppe de ZIKV pour détecter les cellules infectées. Cette stratégie de détection nous permet ainsi de mettre en évidence l'impact des différents ARNi sur de nombreuses étapes du cycle viral, de l'entrée jusqu'à la production des protéines virales. L'immunofluorescence nous permet de quantifier précisément le pourcentage de cellules infectées mais également d'observer la viabilité cellulaire en comptabilisant le nombre de noyaux. Pour chaque condition, trois images ont été réalisées permettant de couvrir la quasi-totalité de la surface de chaque puit.

III. Le crible à haut débit

1. Contrôle qualité du crible

Avant l'analyse complète du crible, différents contrôles qualité ont été réalisés pour s'assurer, d'une part, de la reproductibilité des différents réplicats et, d'autre part, de la qualité de la transfection, qui est une étape délicate.

Reproductibilité du criblage. Le crible a été réalisé en triplicat. Cependant, un problème technique inexplicable survenu lors de la troisième expérience a rendu celle-ci inexploitable. Nous avons alors analysé la reproductibilité des 2 réplicats. Celle-ci étant satisfaisante, l'expérience n'a pas été répétée. Pour analyser la qualité des réplicats, nous avons choisi deux représentations. La première consiste à représenter le nombre de cellules dénombrées dans chaque condition pour chaque réplicat et à comparer la variation des résultats obtenus. Nous pouvons voir sur la **figure 19A** que le nombre de cellules pour chaque condition est légèrement plus important pour le premier réplicat. Toutefois, le coefficient de détermination (R^2) de la droite de régression linéaire est proche de 0,7, ce qui signifie que la reproductibilité de l'expérience est correcte. Par ailleurs, nous observons également une distribution attendue du nombre de cellules par puit avec une médiane proche de 1000 cellules par puit pour les deux réplicats. De plus, de manière attendue, pour les conditions avec le contrôle KIF11, le nombre de cellules est nettement plus faible lors des deux répétitions (**Figure 19B**).

Pour compléter ce contrôle qualité nous avons également comparé le pourcentage d'infection dans chaque condition de chaque réplicat (**Figure 19C**). La reproductibilité des conditions d'infection est satisfaisante avec un R^2 à plus de 0,8 et une distribution attendue du pourcentage d'infection dans les différentes conditions. Comme attendu, les contrôles IFNAR1 et IFNAR2 permettent une nette augmentation de l'infection par ZIKV dans les deux réplicats (**Figure 19D**). Ces différentes analyses nous permettent d'affirmer que les deux réplicats sont cohérents l'un avec l'autre.

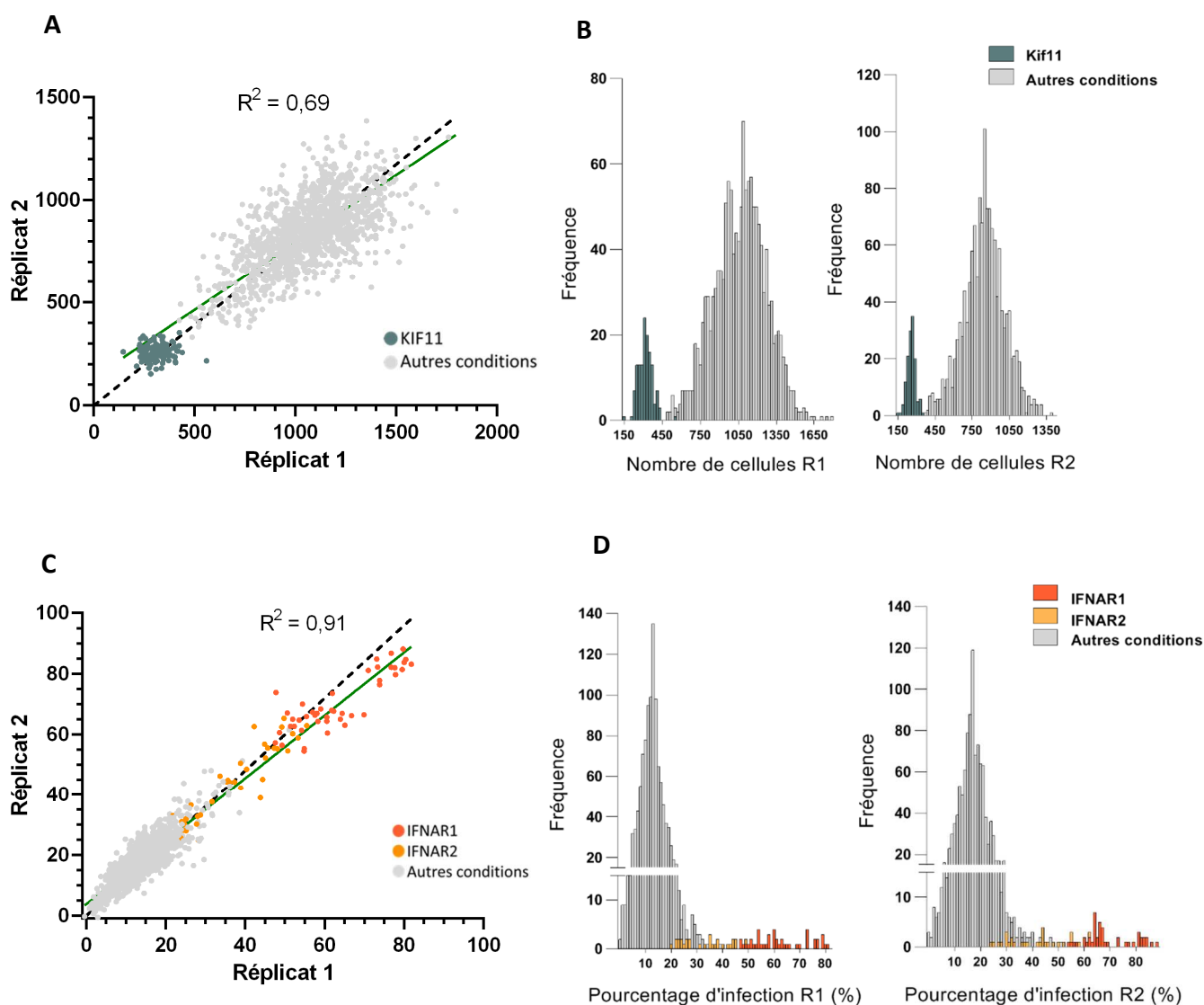


Figure 19. Contrôle qualité des répliquats du crible de la banque. (A) Représentation du nombre de cellules dans chaque condition du répliquat 1 en fonction du répliquat. La droite verte représente la régression linéaire. (B) Distribution du paramètre « nombre de cellules » pour chaque répliquat. En bleu foncé apparaissent les valeurs de la condition contrôle (KIF11). (C) Représentation du pourcentage de cellules infectées dans chaque condition du répliquat 1 en fonction du répliquat 2. En orange apparaissent les contrôles positifs IFNAR1 et 2. La droite verte représente la régression linéaire. (D) Distribution du paramètre « pourcentage d'infection » pour chaque répliquat. En rouge et orange apparaissent les valeurs des conditions contrôles (IFNAR1 et IFNAR2).

Efficacité de la transfection. L'efficacité de la transfection est analysée pour chaque plaque de culture du crible. Chaque plaque 384 puits en contient 34 qui reçoivent l'ARNi ciblant KIF11. Cette condition nous sert de contrôle positif de transfection. En effet, s'il n'y a pas de problème technique lors de la transfection, le nombre de cellules dans ces conditions sera extrêmement réduit. Ce contrôle positif est comparé au contrôle négatif (ARNi NT). L'efficacité de transfection est donnée par le facteur β . Ce

facteur permet de calculer la valeur absolue de la différence du nombre de cellules moyen pour le contrôle négatif et pour le contrôle positif, divisée par la somme de la variance entre les deux groupes.

$$\text{Ainsi, facteur } \beta = \frac{|\bar{m}(neg) - \bar{m}(pos)|}{\sqrt{\frac{n(neg)-1}{n(neg)}\sigma^2(neg) + \frac{n(pos)-1}{n(pos)}\sigma^2(pos)}}$$

Avec - \bar{m} la moyenne du nombre de cellules dans la condition donnée
 - n le nombre de répétitions
 - σ l'écart type

Pour déterminer si l'efficacité de transfection est suffisante, la plateforme où nous avons réalisé le crible fixe le seuil du facteur β à 3,0. Un facteur inférieur à cette valeur signifierait que la transfection est insuffisante. Le **tableau 7** représente les valeurs de facteur β pour chaque plaque des deux réplicats. Ainsi nous pouvons voir que l'efficacité de transfection est satisfaisante dans toutes les plaques.

	Plaque 1	Plaque 2	Plaque 3	Plaque 4
Réplicat 1	4,83	3,91	4,03	4,69
Réplicat 2	5,61	4,88	5,43	5,13

Tableau 7. Contrôle qualité de la transfection. Ce tableau regroupe les résultats de facteur β obtenus pour chaque plaque de culture de chaque réplicat du crible. La transfection est considérée comme un succès lorsque facteur $\beta \geq 3,00$.

2. Analyses du crible et résultats

Deux analyses indépendantes ont été réalisées sur les images d'immunofluorescence pour permettre d'identifier un maximum de candidats et pour éviter les faux-positifs et faux-négatifs. Toutefois, ces deux analyses sont basées sur la même méthode. Le calcul du Z-score robuste (rZ-Score) permet d'estimer pour chaque condition si la variation observée est significative par rapport à la variation de l'ensemble des conditions. Ainsi, on suppose que la majorité des ARNi n'a aucun effet sur l'infection et cette absence de variation sert de référence (**Figure 20**). Cependant, quelques paramètres varient d'une analyse à l'autre. Dans les paragraphes ci-dessous sont représentés les détails de chacune des analyses ainsi que les résultats propres à celles-ci.

Analyses d'image

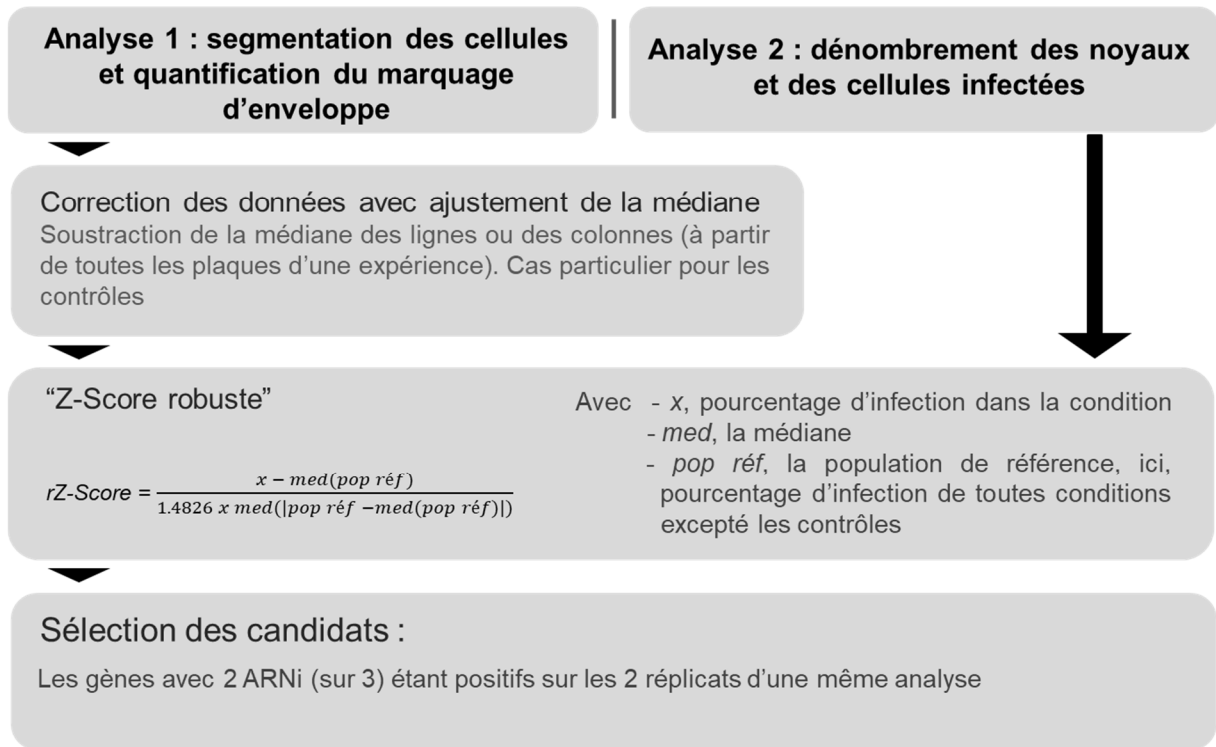


Figure 20. Stratégies d'analyse du crible.

a. Analyse 1 : segmentation des cellules et quantification du marquage d'enveloppe

La première analyse a été réalisée à l'aide du logiciel *IN Cell Analyzer 3.7 Workstation* (GE Healthcare). Cette analyse a permis d'individualiser chaque cellule et donc de comptabiliser leur nombre pour chaque condition. De plus, l'intensité de l'immuno-marquage de la protéine d'enveloppe de ZIKV est quantifié. Ainsi à l'issue de cette analyse, un pourcentage d'infection pour chaque condition a été obtenu. Par ailleurs, pour s'affranchir de tous biais venant de la position de la condition dans la plaque de culture, un lissage a été opéré sur les valeurs. Cette opération permet la soustraction itérative des médianes de la ligne ou de la colonne, calculées à partir de toutes les plaques d'un réplicat (Malo et al., 2006). Il est important de noter que c'est cette analyse qui a nous a permis de réaliser les différents contrôles qualité décrits plus haut. Pour finir, le rZ-Score a été calculé de la manière suivante :

$$rZ-Score = \frac{x - med(pop\ réf)}{1.4826 \times med(|pop\ réf - med(pop\ réf)|)}$$

Avec - x , pourcentage d'infection dans la condition
- med , la médian
- $pop\ réf$, la population de référence, ici, pourcentage d'infection de toutes conditions excepté les contrôles

La **figure 21** représente le rZ-Score obtenu pour toutes les conditions et pour chaque réplicat du crible suite à cette analyse.

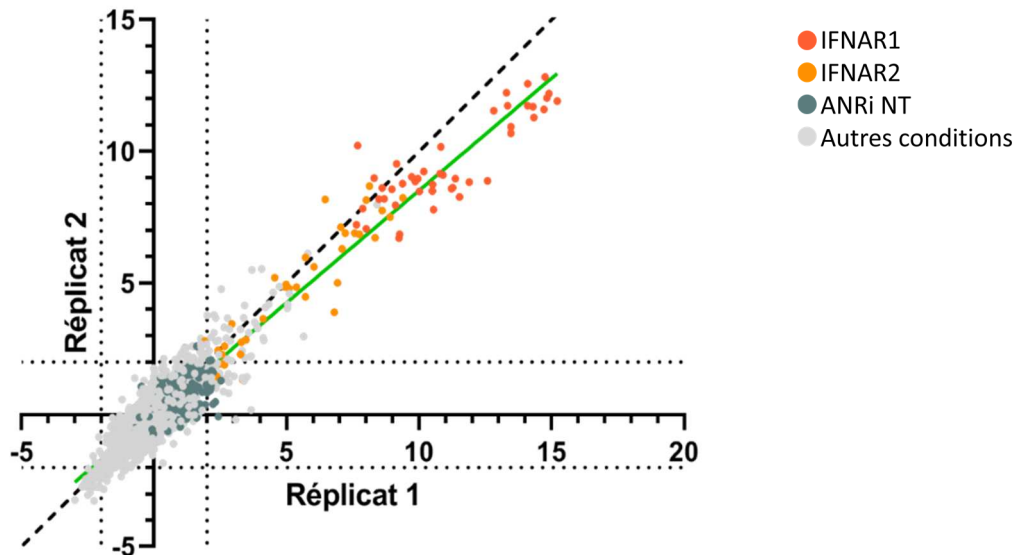


Figure 21. Résultats du crible suite à l'analyse 1. Cette figure représente les rZ-Score obtenus suite à l'analyse 1, pour toutes les conditions du réplicat 2 en fonction des résultats du réplicat 1. En orange apparaissent les conditions contrôles où les cellules ont reçu un ARNi ciblant IFNAR1 ou IFNAR2. En gris foncé apparaissent les conditions contrôles où les cellules ont reçu un ARNi NT. La droite verte représente la régression linéaire.

b. Analyse 2 : dénombrement des noyaux et des foyers d'infection

La seconde analyse a été réalisée à l'aide du logiciel CellProfiler. Cela a permis d'identifier le nombre de cellules sur chaque image grâce à l'isolation des noyaux. De la même façon que lors de la première analyse, le nombre de cellules infectées a été dénombré. Suite à cette analyse nous avons donc établi un pourcentage d'infection pour chaque condition. Là encore, le rZ-Score a été déterminé comme précédemment expliqué. La **figure 22** représente le rZ-Score obtenu pour toutes les conditions et pour chaque réplicat du crible suite à cette analyse.

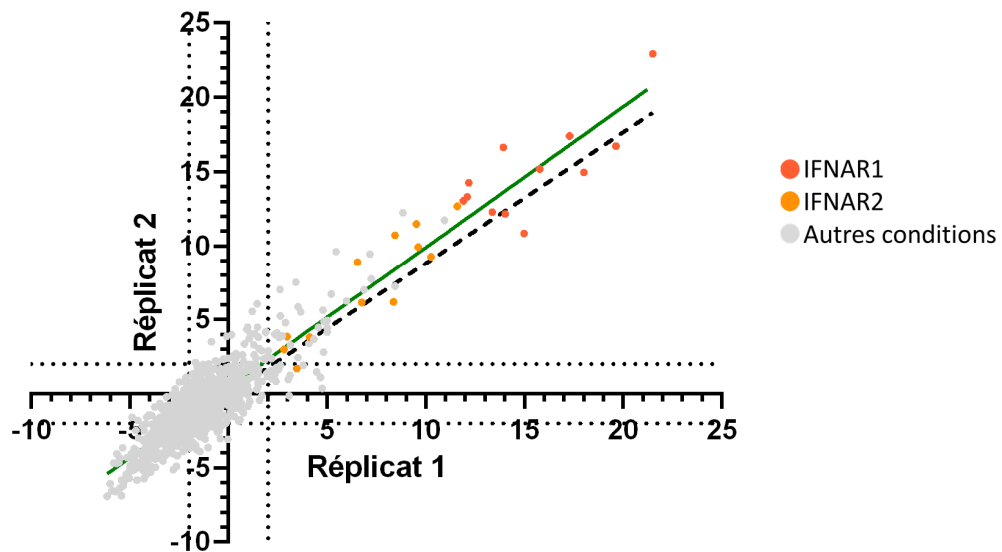


Figure 22. Résultats du crible suite à l'analyse 2. Cette figure représente les rZ-Score obtenus suite à l'analyse 2, pour toutes les conditions du réplicat 2 en fonction des résultats du réplicat 1. En orange apparaissent les conditions contrôles où les cellules ont reçu un ARNi ciblant IFNAR1 ou IFNAR2. La droite verte représente la régression linéaire.

c. Liste de candidats retenus

Pour sélectionner les candidats ayant un impact significatif sur l'infection par ZIKV nous nous sommes basé sur les deux analyses décrites ci-dessus. En effet, nous avons commencé par comparer les résultats obtenus suite aux deux analyses pour nous assurer qu'ils n'étaient pas en désaccord. Nous pouvons voir sur la **figure 23** que les analyses sont cohérentes l'une avec l'autre.

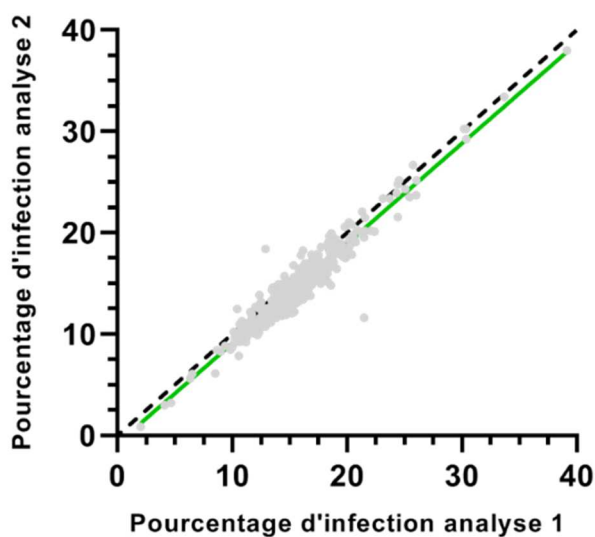


Figure 23. Comparaison des analyses 1 et 2 du crible. Cette figure représente les taux d'infection moyens de chaque condition du crible obtenus à la suite de l'analyse 2 en fonction de ceux obtenus suite à l'analyse 1. La droite verte représente la régression linéaire.

Le seuil de rZ-Score communément utilisé dans ce genre d'étude à haut débit est de 2. Ainsi, pour une condition donnée, si le rZ-Score obtenu est supérieur ou égal à 2 ou inférieur ou égal à -2, la condition est décrite comme variant significativement par rapport à la médiane des autres conditions de l'expérience et est considérée comme positive. Nous avons choisi pour ce crible de garder cette valeur de seuil. Par ailleurs, nous rappelons que chaque gène est ciblé par trois ARNi individuels dans chacun des deux réplicats. Ainsi nous avons choisi de définir comme candidats positifs à l'issue du crible les gènes modulant l'infection et répondant au critère suivant : au moins 2 ARNi sur 3 positifs dans les deux réplicats d'une des analyses (cf. Matériel et Méthodes). Le **tableau 8** présente la liste des différents candidats regroupés par effet pro-viral ou antiviral. Nous pouvons voir que dans cette liste de candidats apparaissent des gènes déjà décrits pour leurs fonctions modulatrices de l'infection par le virus Zika. En effet, IRF9 est un facteur de transcription directement impliqué dans l'induction des ISGs, il est normal de le retrouver parmi les candidats antiviraux (Fink and Grandvaux, 2013). IFITM3 est lui aussi connu comme modulant l'infection de plusieurs virus et notamment ZIKV (Savidis et al., 2016a). Du côté des candidats pro-viraux, on retrouve LY6E qui permet de faciliter l'entrée de ZIKV dans les cellules infectées (Hackett and Cherry, 2018) et USP18 qui, lui, est un régulateur négatif de la voie JAK-STAT (Malakhova et al., 2006). L'identification de ces gènes à la suite du crible nous a conforté dans le choix des différentes conditions et des analyses réalisées.

Effet antiviral	MTA2	IRF9	IFITM3	GPD2	C1R	PXK	XCL1	IFI16	NMI			
Effet pro-viral	NAPA	APOL3	CCND3	GBP3	IRF2	ISG20	NADK	RUBCN	LY6E	ISG15	USP18	C22orf39

Tableau 8. Candidats retenus. Les candidats sont regroupés par effet antiviral ou pro-viral supposé du gène.

IV. Validation des candidats

Une fois les 21 candidats sélectionnés, nous avons validé leur effet sur la réplication de ZIKV afin d'éliminer d'éventuels faux positifs. Cela pourrait être le cas si les ARNi avaient d'autres cibles que celles pour lesquelles ils ont été conçus (effets *off target*).

Pour ces validations, nous avons utilisé des ARNi différents de ceux du crible et cette fois, chaque candidat était ciblé par un mélange de 3 à 4 ARNi permettant de diminuer les effets *off target*. L'efficacité de l'extinction de chaque candidat a été vérifiée par RT-qPCR. La validation est faite dans les mêmes conditions que le crible, soit après la transfection des ARNi, le traitement à l'IFN α de 24 h et l'infection par ZIKV. Cependant, pour certains candidats (C1R, XCL1, GBP3, NZDK, C22orf39 et RUBCN), le niveau d'expression, très faible dans les cellules HMC3, même traitées aux IFN α , ne nous permet pas d'affirmer la bonne extinction de leur expression (**Figure 24**). Pour les candidats dont le niveau d'expression est élevé, les extinctions sont efficaces.

De plus, pour ces validations, le nombre de cellules infectées a été quantifié par cytométrie en flux et non plus par immunofluorescence, comme dans le crible de la banque (**Figure 25A-B**). Nous avons également estimé la quantité d'ARN viral produite dans les cellules par RT-qPCR (**Figure 25C-D**). Pour les candidats non décrits dans la littérature et ayant un impact important sur l'infection par ZIKV, le relargage de particules infectieuses a été mesuré par titrage des surnageants de culture (**Figure 25E-F**).

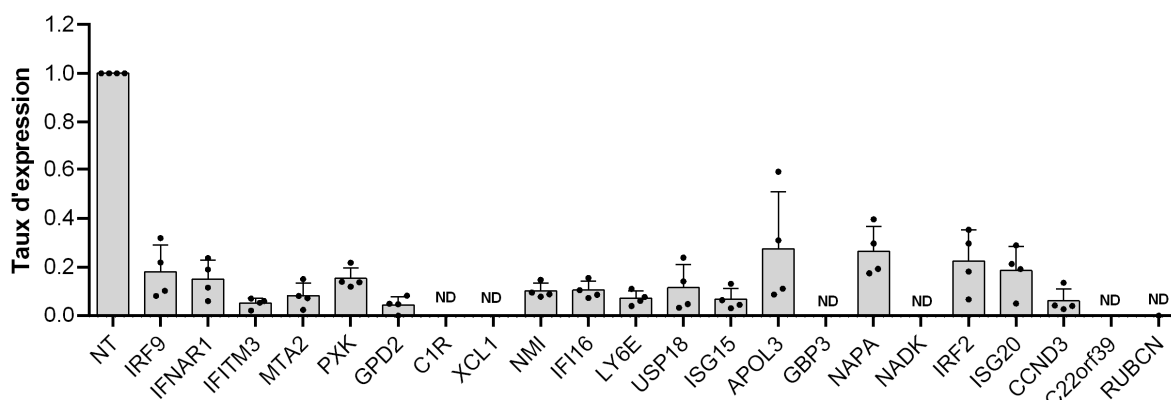


Figure 24. Efficacité des ARNi. L'efficacité des ARNi utilisés pour la validation des candidats est vérifiée par qPCR. L'expression des ARNm de chaque cible est exprimée en comparaison à l'expression de celui-ci dans la condition contrôle NT. Pour certains candidats, l'expression est trop faible dans les HMC3 et ne peut pas être quantifiée même dans la condition NT, l'expression de ces candidats est non déterminée ND.

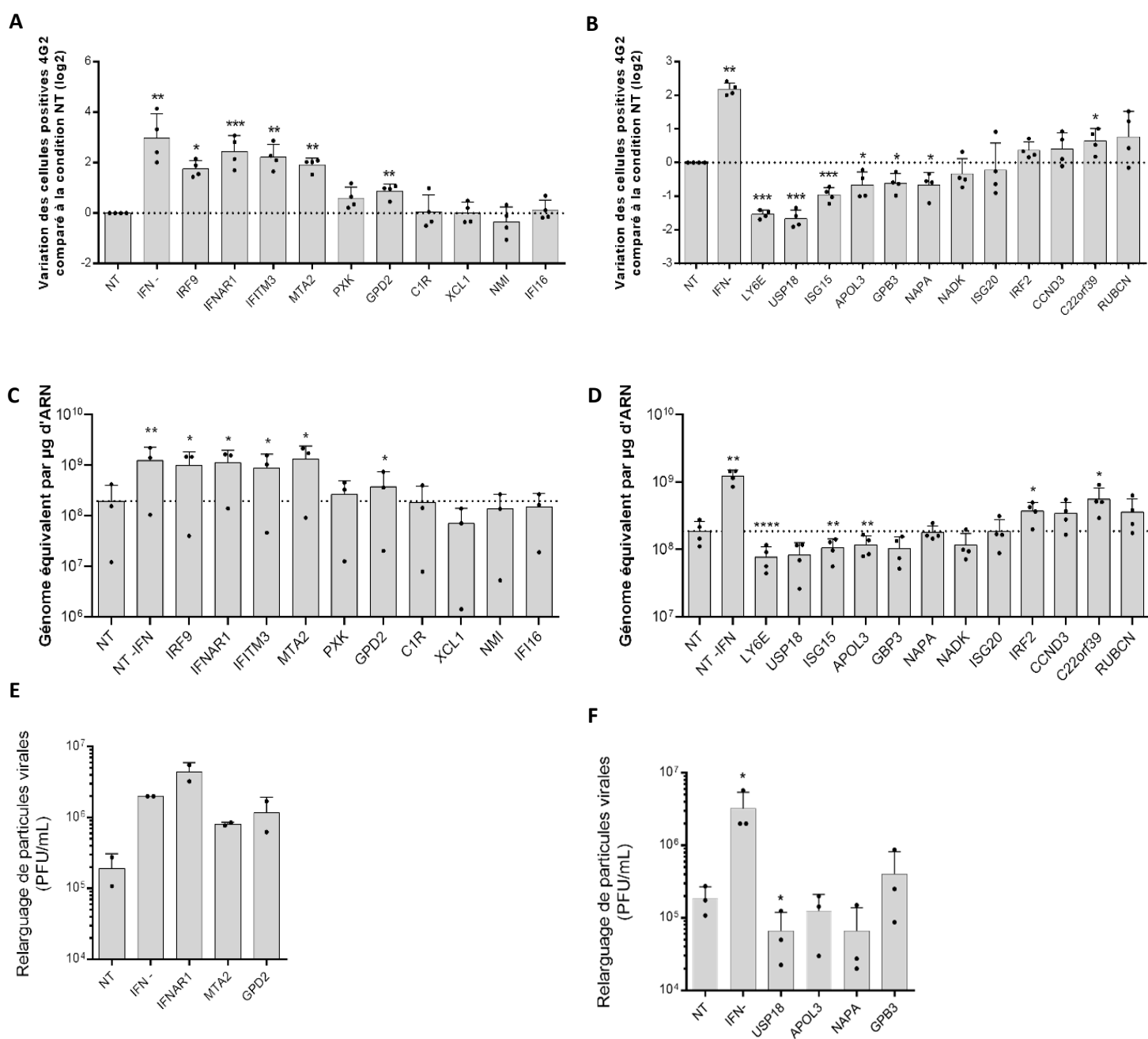


Figure 25. Validation des candidats. (A-B) Les HMC3 sont transfectées par différents ARNi, traitées à l'IFN α (24 h, 200 U/ml) et enfin infectées à MOI 5 par ZIKV. Le pourcentage de cellules infectées est déterminé 24 h post-infection par cytométrie en flux. Est représenté, pour les candidats antiviraux et pro-viraux, le ratio de cellules infectées par rapport à la condition siNT. (C-D) Pour chaque condition, la réplication virale est mesurée par qPCR et exprimée en génome équivalent par µg d'ARN total (E-F) Pour les principaux candidats de chaque catégorie (anti et pro-viral) le relargage de particules virales est déterminé par titrage par plaque de lyse. Les analyses statistiques ont été effectuées par des t-test appariés multiples (* p<0,05 ; ** p<0,001 ; *** p<0,0001 ; **** p<0,00001).

Nous pouvons voir qu'IFNAR1, IFITM3 et IRF9 ont, comme attendu, un rôle antiviral très prononcé. Par cytométrie en flux, nous détectons plus de 4 fois plus de cellules infectées comparé à la condition contrôle (**Figure 25A**). Nous observons également une augmentation d'environ 4 fois la quantité de génome équivalent dans ces conditions, en comparaison de la condition contrôle ARNi NT (**Figure 25C**). En ce qui concerne les autres candidats antiviraux révélés par notre crible, comme MTA2 et GPD2, ils ont un impact significatif sur le pourcentage de cellules infectées. Lorsque les cellules sont transfectées avec un ARNi ciblant MTA2 nous pouvons observer environ 4 fois plus de cellules infectées, ce qui est comparable à ce qui est obtenu avec l'ARNi ciblant IFNAR1 (**Figure 25A**). L'ARNi ciblant MTA2 possède un impact significatif sur la réplication virale avec une augmentation de celle-ci de près de 10 fois (**Figure 25C**). L'ARNi ciblant GPD2 induit également une augmentation significative en RT-qPCR, cependant légèrement moins importante que pour MTA2 (**Figure 25C**). De façon surprenant, aucune de ces conditions, même les ARNi ciblant IFNAR1, ne semble augmenter de manière significative le relargage de particules virales infectieuses mesuré par titrage par plaque de lyse (**Figure 25E**). Cela peut être dû au manque de sensibilité de cette approche.

En ce qui concerne les candidats ayant un rôle pro-viral déjà décrit, comme les protéines LY6E et USP18, nous validons leur effet significatif sur la réplication de ZIKV. La présence d'ARNi ciblant ces protéines permettent de diminuer de plus de 3 fois le nombre de cellules infectées (**Figure 25B**). Ces conditions permettent également une diminution par deux de la production d'ARN viral (**Figure 25D**). Pour les candidats non caractérisés pour leur propriétés pro-virales, les ARNi ciblant les protéines APOL3, GBP3 et NAPA permettent, eux aussi, une diminution significative du pourcentage de cellules infectées (**Figure 25B**). Parmi ces candidats, seul APOL3 possède un rôle pro-viral mesurable par qPCR, avec 2 fois moins d'équivalent génome détectable comparé à la condition contrôle (**Figure 25D**). Là encore, ces effets ne sont pas observables à travers la mesure du relargage des particules infectieuses à l'acceptation de l'ARNi ciblant USP18 pour lequel une diminution significative du relargage est observée (**Figure 25F**).

Cependant, il est important de noter qu'avec ces approches, nous n'avons pas validé l'effet de certains des candidats sélectionnés suite au criblage de la banque sur la réplication de ZIKV dans les cellules HMC3. Ces candidats sont pour la plupart des protéines qui ne sont apparues positives que dans une seule des deux analyses. Ainsi le rôle des protéines PXX, C1R, XCL1, NMI, IFI16, ISG20, IRF2, CCND3, c22orf39 et RUBCN dans l'infection par ZIKV n'est pas clair. Pour XCL1, c22orf39 et RUBCN, cela n'est pas très étonnant car leur expression est très faible dans les HCM3 (**Figure 24**).

Pour conclure sur cette première partie de l'étude, nous avons pu mettre en évidence différents candidats pouvant impacter l'infection des cellules HMC3 par ZIKV. Parmi ceux-ci, MTA2 a un rôle

antiviral indéniable. À l'heure actuelle, cette protéine n'est pas décrite comme possédant une telle fonction. Il serait intéressant d'approfondir son rôle lors de l'infection par ZIKV et de déterminer si elle agit contre un large spectre de virus. La fonction antivirale de MTA2 est actuellement étudiée par un autre membre de l'équipe (cf. Discussion).

La protéine APOL3 possède quant à elle un rôle pro-viral significatif validé par cryométrie en flux ainsi que par qPCR. APOL3 ne possède pas de rôle pro-viral décrit à l'heure actuelle, et c'est pour cette raison que nous avons choisi de nous intéresser aux mécanismes moléculaires liés à sa fonction pro-virale.

Résultats

Partie II

Résultats - Partie II :

Rôle des protéines APOL1 et APOL3 lors de l'infection par le virus Zika

L'objectif de cette seconde partie était d'approfondir le rôle que joue APOL3 lors de l'infection par ZIKV. Nous avons également choisi d'intégrer à notre étude la protéine APOL1 qui appartient à la même famille qu'APOL3 et qui est largement plus étudiée de par son implication dans le contrôle de l'infection par les parasites de l'espèce *Trypanosoma brucei*. De plus, la surexpression d'APOL1 dans les cellules Huh7 favorise la réplication de YFV. Il apparaît donc qu'APOL1 pourrait également posséder un rôle pro-viral (Schoggins et al., 2011).

Notre objectif était de valider le rôle de ces 2 protéines sur la réplication de ZIKV dans différents modèles cellulaires. Nous avons également déterminé si ces 2 protéines impactaient l'infection par différents virus. Enfin, nous avons cherché à caractériser le mécanisme d'action d'APOL1 et APOL3, en explorant plusieurs hypothèses, telles que les liens potentiels entre la fonction provirale de ces protéines et, d'une part, le métabolisme lipidique, et, d'autre part, la voie IFN.

I. Validation de l'effet pro-viral des protéines APOL1 et APOL3

1. Validation dans différents modèles cellulaires

Afin de confirmer les résultats obtenus dans la première partie de l'étude concernant le rôle d'APOL3 sur la réplication de ZIKV dans les cellules HMC3 (**Figure 25**) et ceux obtenus lors de la surexpression d'APOL1 sur la réplication de YFV dans les cellules Huh7 (Schoggins et al., 2011), nous avons choisi de travailler sur différents modèles cellulaires : les cellules microgliales HMC3, que nous avons utilisées dans le criblage de la banque et une lignée cellulaire de podocyte. Il a été préalablement établi que la microglie pouvait être naturellement infectée chez l'homme (Lum et al., 2017). Il a également été montré que les podocytes étaient susceptibles à l'infection par ZIKV *in cellulo* (Alcendor, 2017). Ces 2 modèles cellulaires nous ont donc semblé pertinents.

Dans un premier temps, nous avons déterminé le niveau d'expression des protéines APOL1 et APOL3 dans les deux modèles cellulaires utilisés, en présence ou non d'un traitement IFN α . La **figure 26** représente l'expression des deux protéines mesurées par RT-qPCR. Il est intéressant de remarquer que les niveaux d'expression d'APOL1 et APOL3 sont très faibles dans les cellules HMC3 et environ 10 fois plus important dans les podocytes à l'état basal. Un traitement avec différentes doses d'IFN α permet une augmentation significative de l'expression d'APOL3 dans les HMC3 (à partir de 100 U/ml) et dans les podocytes (à partir de 500 U/ml). Le traitement IFN α induit légèrement l'expression d'APOL1 dans les 2 types cellulaires mais trop faiblement pour être significatif. Ces 2 protéines semblent bien être des ISG dans nos 2 modèles cellulaires.

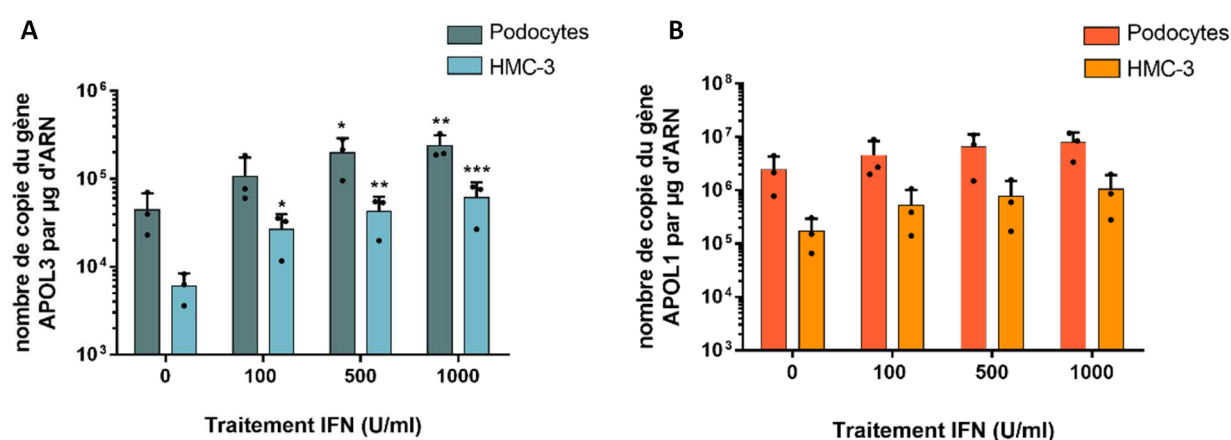


Figure 26. Différence d'expression des protéines APOL1 et APOL3 dans les HMC3 et podocytes. Le niveau d'expression des protéines APOL3 (A) et APOL1 (B) est mesuré par RT-qPCR suite à un traitement à l'IFN α . Chaque point de ces figures représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett (* p<0,05 ; ** p<0,001 ; *** p<0,0001).

Pour valider le rôle d'APOL3 et déterminer celui d'APOL1 sur la réplication de ZIKV, nous avons utilisé la technique d'ARNi. Pour chaque APOL, un mélange de 4 ARNi est transfecté dans les deux modèles cellulaires. Après 24 h de transfection, les cellules sont traitées ou non avec 200 U/ml d'IFN α . Enfin, les cellules sont infectées par ZIKV à une MOI de 2. L'extinction de l'expression des protéines APOLs a été vérifiée dans chaque lignée par RT-qPCR (**Figure 27A, 27B**). Nous pouvons voir une extinction satisfaisante d'environ 80 % de l'expression des protéines ciblées. Nous avons également inclus dans expériences des ARNi ciblant USP18. USP18 étant un régulateur négatif de la voie JAK-STAT, il possède un rôle pro-viral large et bien décrit dans la littérature (Malakhova et al. 2006). USP18 est également un candidat ayant été identifié lors de notre crible (**Tableau 8**). Nous avons validé sa fonction pro-ZIKV dans notre modèle cellulaire (**Figure 25**). Il sert donc ici de contrôle positif. Son expression est également significativement réduite par la transfection des siRNA correspondants (**Figure 27B**)

Dans les HMC3, des analyses de cytométrie montrent que l'extinction d'APOL1 et APOL3 entraîne une diminution significative, d'environ 50 %, du nombre de cellules infectées par ZIKV (**Figure 27C**). Il est important de noter que cette baisse d'infection est détectable uniquement dans les cellules préalablement traitées à l'IFN α . Sans traitement IFN α , l'ARNi ciblant APOL3 n'a aucun effet sur le nombre de cellules infectées. Celui ciblant APOL1 semble avoir un léger impact sur l'infection (**Figure 27C**).

Dans les podocytes, nous observons la même conséquence de la transfection des ARNi ciblant les APOLs sur la réplication de ZIKV. Aucune diminution du nombre de cellules infectées n'est notée si les cellules ne sont pas préalablement traitées à l'interféron. Toutefois, avec un traitement en amont, on dénombre environ 50 % de cellules infectées en moins lorsque que l'expression d'APOL1 ou d'APOL3 est diminuée (**Figure 27D**). Dans les podocytes, la diminution d'infection due aux ARNi est comparable à celle observée avec des ARNi ciblant USP18.

Ces résultats nous permettent de valider le rôle pro-viral d'APOL3 qui a pu être observé lors du crible à haut débit. Par ailleurs, nous pouvons affirmer qu'APOL1 possède également un rôle pro-viral lors de l'infection par ZIKV. Ceci est consistant avec les résultats publiés en 2011 dans le cadre d'une infection par YFV (Schoggins et al., 2011).

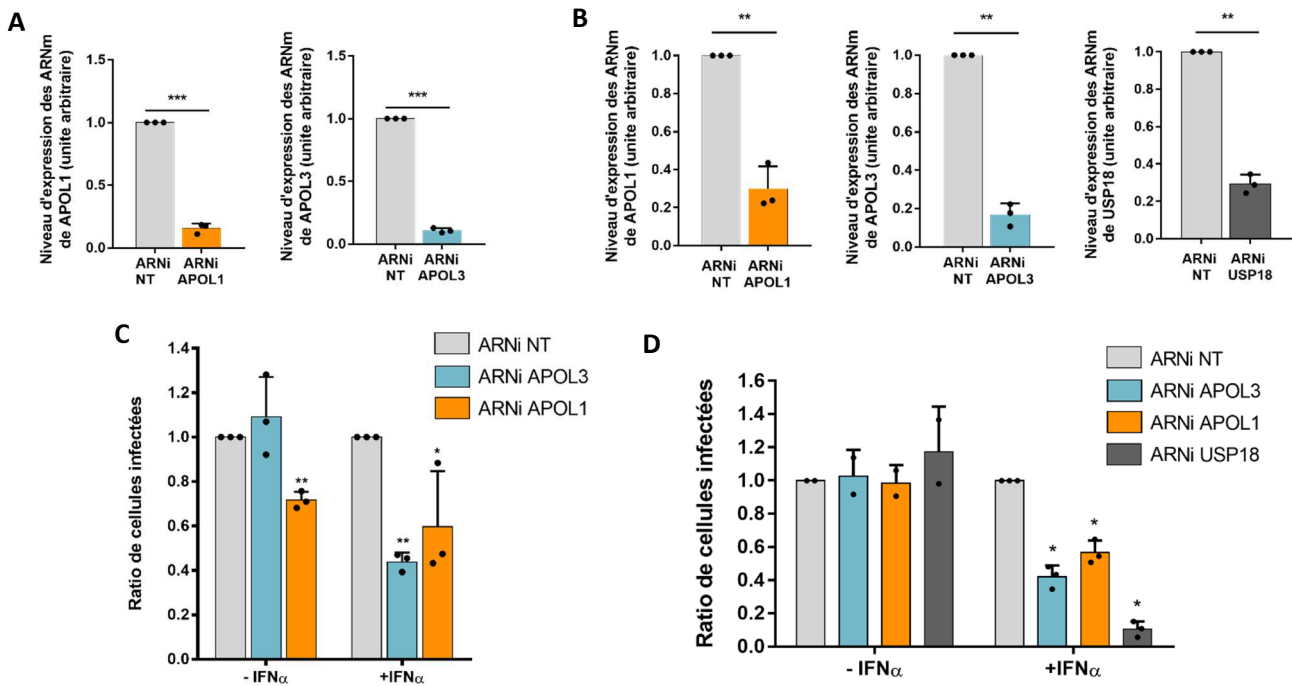


Figure 27. Validation du rôle d'APOL3 et APOL1 par ARN interférence. (A) Efficacité de l'extinction d'expression d'APOL3 et APOL1 dans les HMC3 déterminé par RT-qPCR. (B) Efficacité de l'extinction d'expression d'APOL3, APOL1 et USP18 dans les podocytes déterminé par RT-qPCR. (C) Les HMC3 sont transfectées avec différents ARNi puis traitées ou non à l'IFN α (200 U/ml, 24 h) et enfin infectées avec ZIKV à moi 2. Le pourcentage de cellules infectées est déterminé 24 h post-infection par cytométrie en flux. (D) Les podocytes sont transfectés avec différents ARNi puis traités ou non à l'IFN α (200 U/ml, 24 h) et enfin infectés avec ZIKV à moi 1. Le pourcentage de cellules infectées est déterminé 24 h post-infection par cytométrie en flux. Chaque point de ces figures représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par t-test appariés pour les analyses RT-qPCR et par test de Dunnett pour les analyses de cytométrie en flux (* p<0,05 ; ** p<0,001 ; *** p<0,0001).

Une fois l'impact d'APOL1 et d'APOL3 validé dans deux lignées cellulaires par la technique des ARNi, nous avons souhaité utiliser une seconde méthode d'extinction de gène. Via la technique d'édition de génome CRISPR Cas9, nos collaborateurs ont généré des lignées podocytes n'exprimant plus APOL3 (KO APOL3), APOL1 (KO APOL1) ou les deux protéines (KO APOL1/APOL3) (Uzureau et al., 2020).

Pour nous assurer de la bonne extinction de l'expression de ces protéines, nous avons quantifié l'abondance de leur mRNAs par RT-qPCR. Nous pouvons voir que l'expression d'APOL1 dans la lignée KO en comparaison à la lignée WT est extrêmement faible, ce qui confirme bien l'extinction de l'expression de cette protéine (**Figure 28A**). En ce qui concerne APOL3, l'extinction n'est pas détectable par RT-qPCR (**Figure 28B**). Cela s'explique par la nature de la mutation introduite par la réparation de l'ADN suite à la cassure de la Cas9 dans le gène *APOL3*. En effet, pour la lignée KO APOL3, la mutation introduite ne semble pas aboutir à la production d'un ARNm tronqué ou instable. Ainsi, l'ARNm

quantifié par RT-qPCR est toujours présent même si celui-ci ne pourra pas permettre la production d'une protéine fonctionnelle.

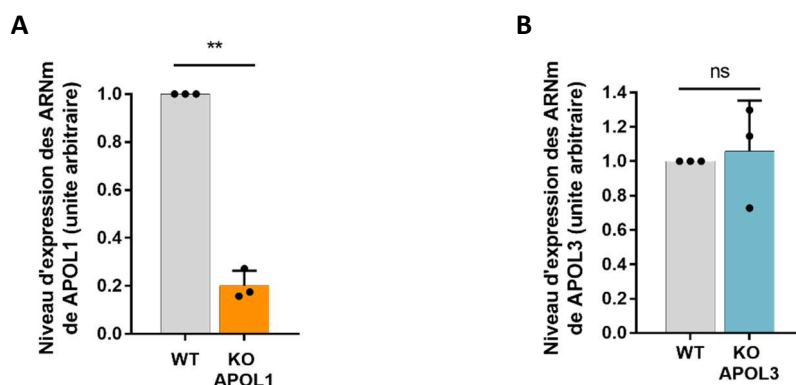


Figure 28. Validation des lignées podocytes KO. L'expression des APOL1 (A) et APOL3 (B) sont mesurées par qPCR, chaque point de cette figure représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par t-test appariés (* p<0,05 ; ** p<0,001).

Il est important de noter que même si nous n'avons pu valider le KO d'APOL3 par RT-qPCR, les lignées KO générées ont été séquencées par nos collaborateurs pour vérifier que l'expression des protéines ciblées (APOL1 ou APOL3) n'était plus possible (**Annexes, Tableau 11**) (Uzureau et.al, 2020).

Pour vérifier l'effet proviral d'APOL1 et APOL3 sur la réplication de ZIKV, les lignées KO APOL3 et KO APOL1, ainsi que la lignée parentale (WT), ont été infectées par ZIKV à différentes MOI. Les analyses de cytométrie en flux effectuées mettent en évidence une diminution drastique du pourcentage du nombre de cellules infectées dans les lignées KO comparé à la lignée WT. Ce phénotype est observé à différentes MOI, et à 24 h ou 48 h post-infection (**Figure 29A-B**).

De plus, une analyse par western blot des différentes lignées de podocytes infectées montre que, dans les lignées KO, l'abondance de la protéine virale NS5 ainsi que celle de la protéine d'enveloppe est bien moindre en comparaison à la quantité présente dans la lignée WT (**Figure 29C**). Par ailleurs, nous avons également cherché à quantifier l'expression des APOLs par western blot dans les différentes lignées. Nous n'avons trouvé aucun anticorps efficace dirigé contre APOL3. Nous n'avons donc pas pu détecter cette protéine par western blot. À l'inverse, des anticorps spécifiques d'APOL1 ont permis de visualiser l'extinction de son expression dans la lignée KO APOL1 (**Figure 29C**). Toutefois, aucun témoin de charge n'a été inclus dans cette expérience préliminaire. Bien que les concentrations protéiques totales aient été déterminées avant dépôt des échantillons pour analyse et qu'une quantité équivalente de protéine ait été déposée sur gel, il serait nécessaire répéter l'expérience en révélant une protéine pouvant servir de témoin de charge telle que l'actine, la GAPDH ou la tubuline.

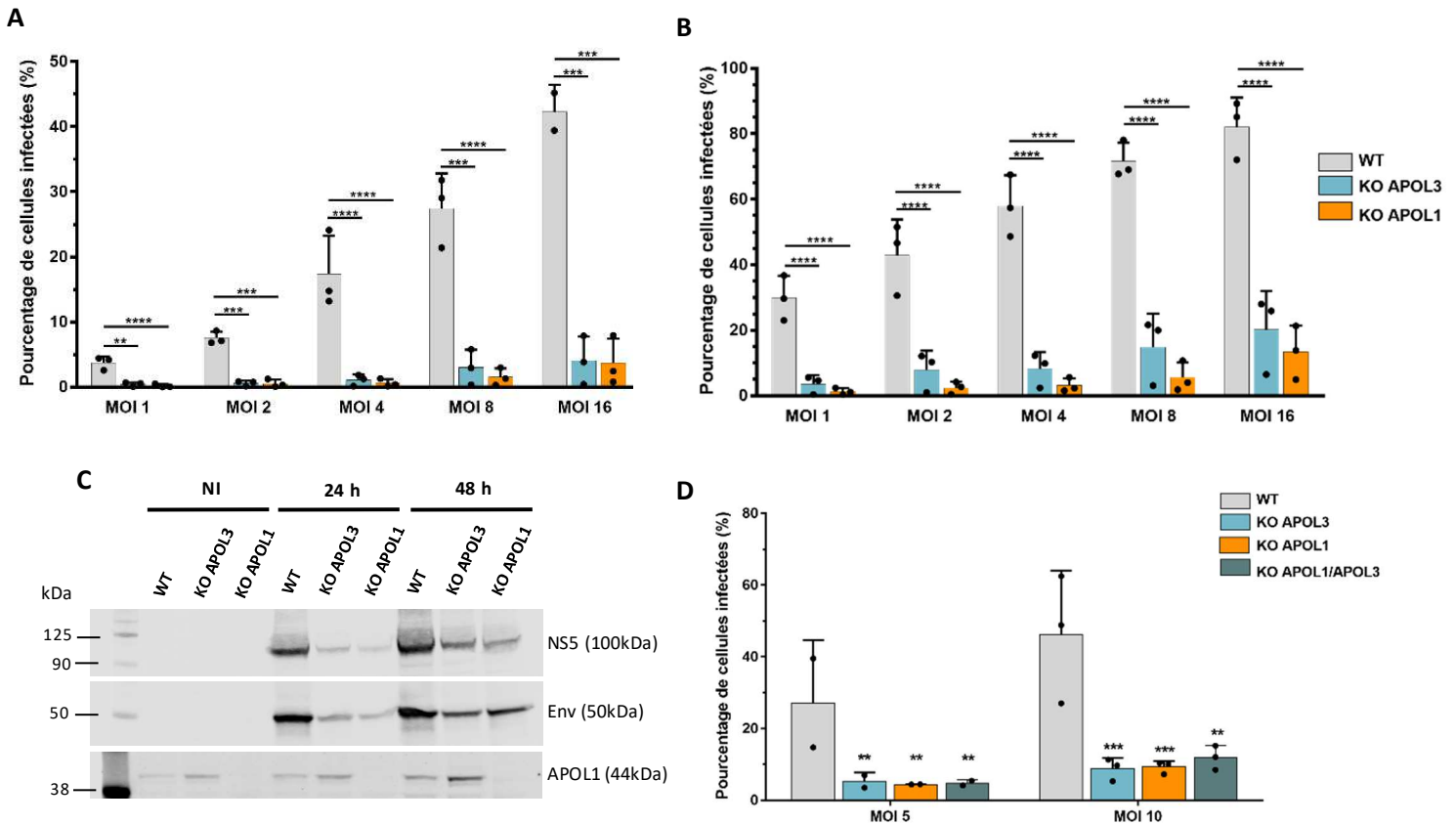


Figure 29. Validation du rôle d'APOL3 et APOL1 dans les lignées KO APOL3 et APOL1. Les différentes lignées de podocytes sont infectées à différentes MOI pendant 24 h (A, D) ou 48 h (B). Le pourcentage de cellules infectées est ensuite déterminé par cytométrie en flux. Chaque point de ces figures représente une expérience indépendante. (C) Les différentes lignées de podocytes sont infectées à MOI 10 par ZIKV et les cellules sont récoltées pour analyse en western blot 24 ou 48 h post-infection. Les anticorps dirigés contre APOL1, NS5 et l'enveloppe (Env) du virus sont utilisés. Le marqueur de taille de protéine est indiqué en kDa. Les tailles attendues des protéines sont indiquées entre parenthèse. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$).

De façon intéressante, l'infection des podocytes double KO par ZIKV montre une diminution de l'infection similaire à celle obtenues dans les lignées 'simple KO' (**Figure 29D**). Cette observation pourrait laisser penser à un mécanisme pro-viral similaire pour les deux protéines. En effet, si APOL3 et APOL1 possédaient un rôle pro-viral agissant par deux voies complètement distinctes, nous nous serions attendus à avoir un effet cumulatif pour le double KO.

Nous nous sommes également procuré une lignée de podocyte n'exprimant pas APOL2 (KO APOL2). APOL2 est une protéine de la même famille qu'APOL1 et APOL3. Des ARNi ciblant cette protéine était également présents dans le crible à haut débit, cependant, l'inhibition de l'expression de cette protéine n'a eu aucun impact significatif sur l'infection par ZIKV. Des analyses de cytométrie valident les résultats du crible (**figure 30**) puisque le nombre de cellules infectées dans la lignée KO APOL2 est comparable et même légèrement supérieure à celle de la lignée WT. Cela nous conforte dans l'hypothèse d'un rôle proviral propre à APOL3 et APOL1, et non commun à tous les APOLs.

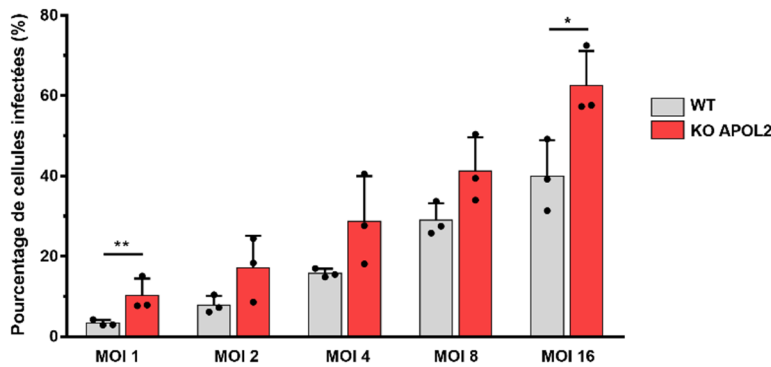


Figure 30. Impact d'APOL2 sur l'infection par ZIKV. Les lignées WT et KO APOL2 sont infectées à différentes MOI pendant 24 h. Le pourcentage de cellules infectées est ensuite déterminé par cytométrie en flux. Chaque point de cette figure représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Sidak (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

2. Etape du cycle viral potentiellement ciblé par APOL1 et APOL3

Nous avons cherché à déterminer quelle étape du cycle viral pourrait être la cible des APOLs dans les podocytes. Nous avons quantifié par RT-qPCR la quantité de génome de ZIKV dans les lignées podocytes parentales et KO à différents temps post-infection. Nous pouvons voir sur la **figure 31** que la diminution de la quantité de génome viral dans les lignées KO comparativement aux cellules WT commence à être significative entre 6 et 8 h post-infection. Cependant nous pouvons observer que le nombre de copie de génomes augmente dans les lignées KO entre 10 et 24 h post-infection. Cela signifie qu'une partie des virus vont pouvoir se répliquer même s'il y a un délai dans cette étape. Les APOLs semblent donc important pour promouvoir les premières étapes du cycle viral.

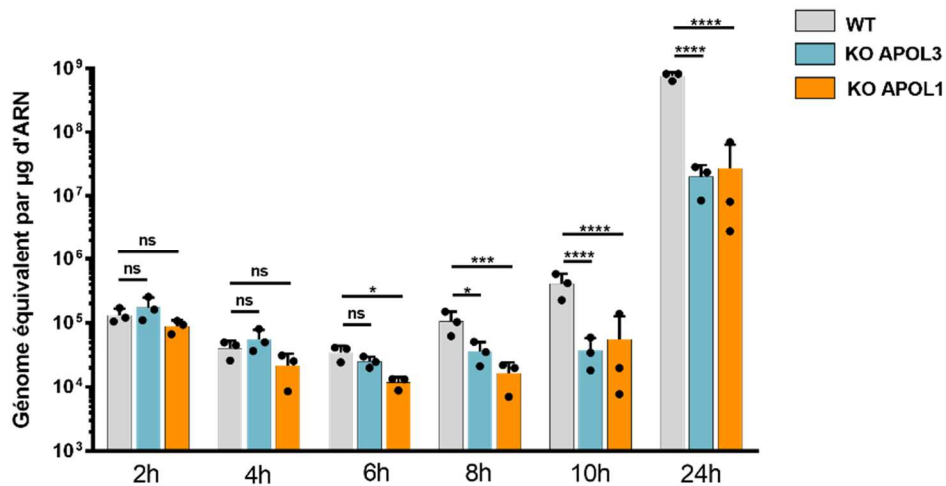


Figure 31. Cinétique d'infection des lignées podocytes KO et WT. Les différentes lignées de podocytes sont infectées à MOI 10. Les cellules sont récoltées à différents temps post-infection pour analyse qPCR et quantification du nombre d'équivalent génome. Chaque point de cette figure représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$).

Puisque les APOLs semblent important pour promouvoir les premières étapes du cycle viral (**Figure 31**), nous nous sommes intéressés à l'attachement et à l'internalisation des particules virales dans notre modèle cellulaire. Le test d'attachement et d'entrée consiste en l'infection des différentes lignées KO et WT à 4°C pour permettre l'attachement des virions tout en inhibant leur internalisation dans la cellule. Après 1 h d'incubation les échantillons du test d'attachement sont récoltés pour une analyse de la quantité d'ARN viral par RT-qPCR. Les échantillons du test d'entrée sont quant à eux, après infection à froid, incubés à 37°C pendant 2 h pour permettre l'entrée des particules. Ces derniers sont ensuite traités à la trypsine pour enlever toutes particules présentes en surface de la cellule mais non internalisées. Enfin, ils sont récoltés pour une analyse par RT-qPCR. Les résultats de ces expériences sont présentés **figure 32A-B**. Nous pouvons très distinctement voir qu'il n'y a pas de différence ni d'attachement ni d'entrée des particules virales entre la lignée WT et les lignées KO. Cela signifie qu'APOL1 comme APOL3 ne promeuvent aucune de ces étapes.

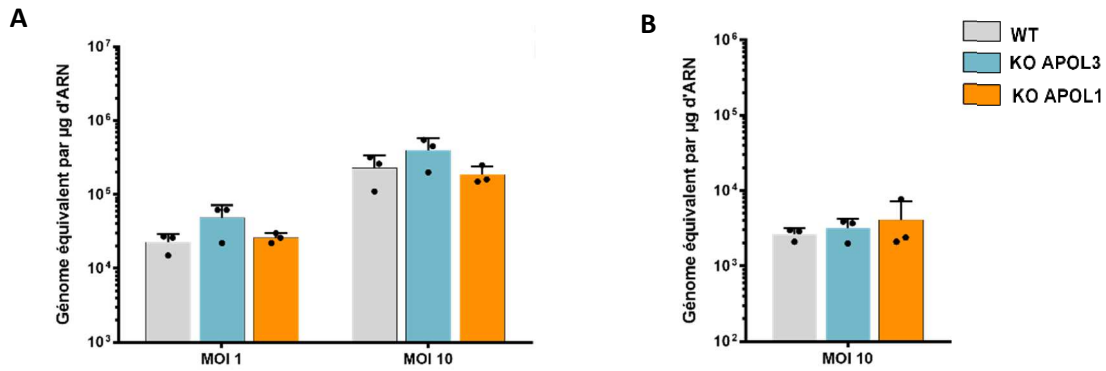


Figure 32. Test d'attachement et d'entrée des virions de ZIKV dans les lignées podocytes KO et WT. Test d'attachement (A) et d'entrée (B) sur les différentes lignées de podocytes infectées à MOI 1 et/ou 10. Les cellules sont récoltées pour analyse qPCR. Chaque point de cette figure représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett (les résultats sont non significatifs).

Nous avons ensuite cherché à quantifier les événements de fusion dans les lignées KO en comparaison à la lignée WT. L'hypothèse étant qu'APOL1 et/ou APOL3 pourrait favoriser de façon non spécifique la fusion des membranes des virus avec celles des endosomes et ainsi promouvoir l'infection par ZIKV et par d'autre virus qui pénètrent dans les cellules par endocytose. Il n'existe pas de technique pour mesurer la fusion des enveloppes des flavivirus avec les membranes endosomales. Nous avons donc exploité le fait que la réplication de VSV soit dépendante de l'expression d'APOL1 et APOL3 (résultats présentés plus tard dans la **Figure 34**) et eu recours à la technique BlaMVPR. Cette stratégie consiste en la transduction des cellules par un lentivirus HIV-1 pseudo-typé avec la protéine d'enveloppe de VSV (VSVg) et permettant l'expression de la protéine chimérique β -lactamase-Vpr. La fusion de la pseudoparticule virale après endocytose permet le relargage de la β -lactamase dans le cytoplasme. Un substrat fluorescent de la β -lactamase (CCF2-AM) est ajouté dans les cellules et si celle-ci est délivrée dans le cytoplasme, le réactif sera clivé et l'émission de la fluorescence passera de 520 nm à 447 nm. Ainsi, pour quantifier la fusion de VSVg avec les membranes endosomales, il suffit de quantifier la fluorescence à 447 nm dans chaque condition. La **figure 33** représente les résultats obtenus pour ce test. Nous pouvons voir que, pour la plus forte dose de pseudovirus, un effet significatif du KO APOL1 sur la fusion des pseudoparticules est observé. En effet, comparativement à la lignée WT, la lignée KO APOL1 induit une plus grande proportion de CCF2-AM clivée. Cependant cet impact sur la fusion des pseudoparticules VSVg n'est pas détectable dans les cellules KO APOL3. Cela signifie qu'APOL1 pourrait promouvoir l'infection de différents virus par favorisation de la fusion au niveau de la membrane de l'endosome. APOL3, quant à lui, agirait par un autre mécanisme.

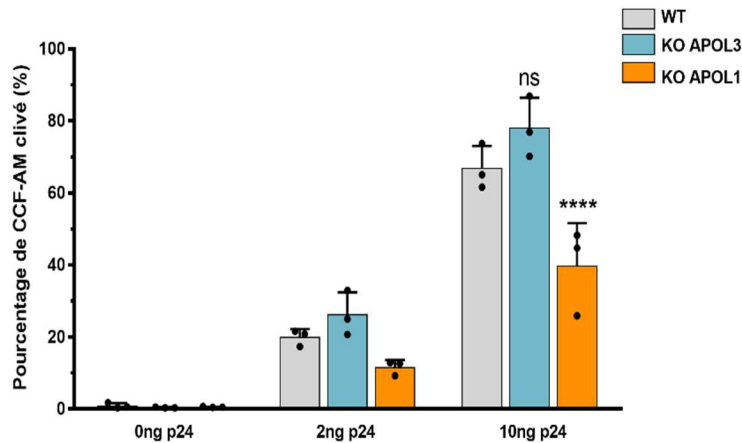


Figure 33. Test de fusion BlaM-Vpr dans les lignées podocytes KO et WT. Les différentes lignées de podocytes sont infectées avec différentes doses de lentivirus pseudo-typé VSV (exprimées en ng de p24) et permettant l'expression de la β -lactamase-Vpr. Le pourcentage de clivage du réactif CCF2-AM est mesuré par cytométrie en flux à 447 nM. Chaque point de cette figure représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$).

3. Rôle d'APOL1 et APOL3 lors de l'infection par différents virus à ARN

Afin de déterminer si le rôle d'APOL1 et APOL3 est spécifique au virus Zika, nous avons étudié l'effet de l'inhibition d'expression de nos candidats lors de l'infection par différents virus à ARN. Nous avons inclus dans cette analyse deux autres *Flavivirus* qui sont le virus de la dengue (DENV) et le virus du Nil occidental (WNV). Nous avons également choisi d'étudier l'infection par des virus non-apparentés à ZIKV, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et le virus de la rougeole (*measles virus*, MeV). Ces virus appartiennent respectivement à la famille des *Rabdoviridae* et *Paramyxoviridae* et possèdent un génome ARN simple brin de polarité négative. Nous avons réalisé l'expérience sur nos deux modèles cellulaires avec les deux méthodes d'extinction de gène différentes.

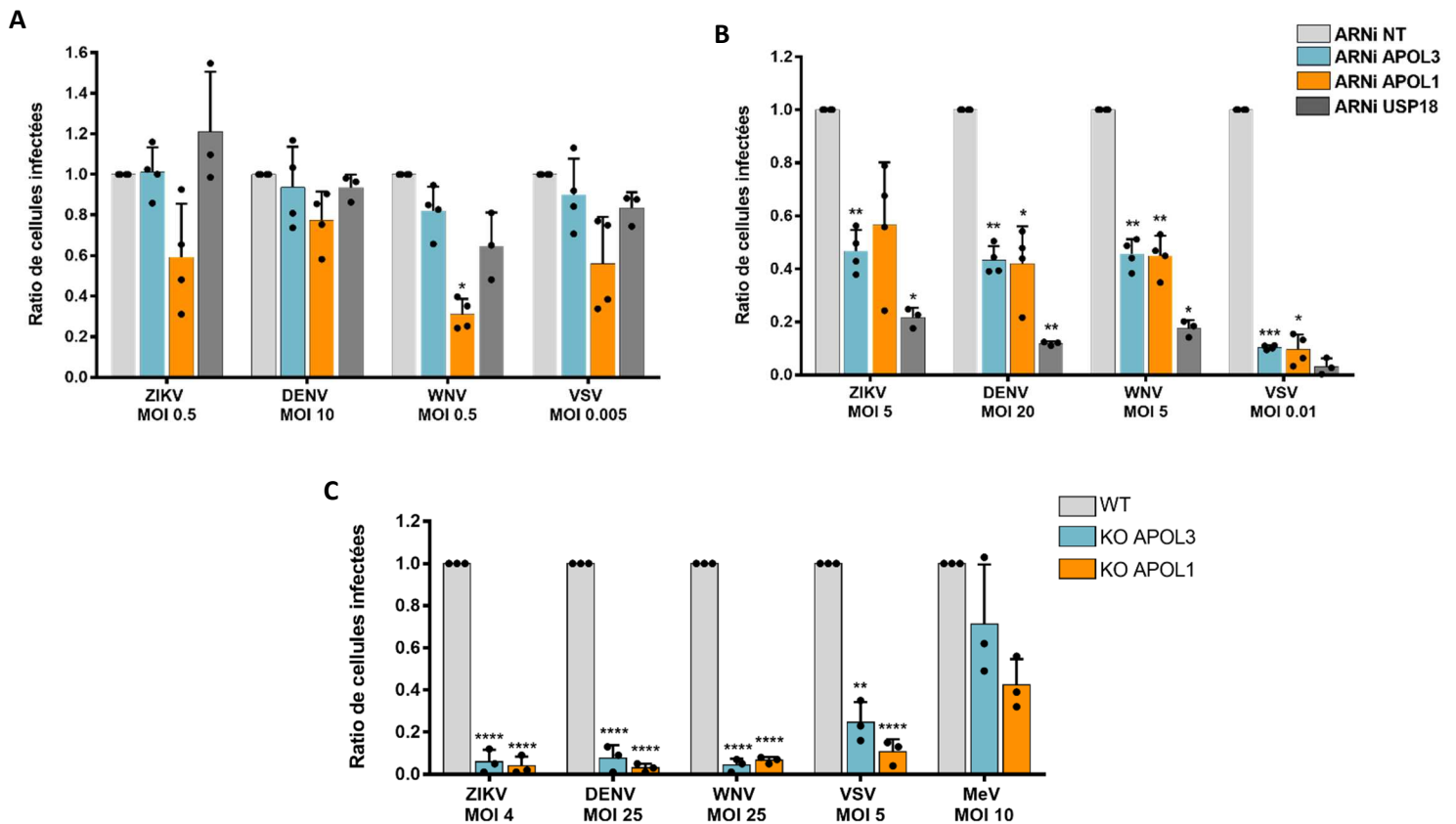


Figure 34. Rôle d'APOL3 et APOL1 lors de l'infection par différents virus dans les HMC3 et podocytes. Les HMC3 ont été transfectées avec différents ARNi, puis traitées à l'IFNα (200 U/ml) (B) ou non traitées (A) et enfin infectées par différents virus. Le pourcentage de cellules infectées est déterminé 24 h post-infection par cytométrie en flux. (C) Les différentes lignées de podocytes sont infectées par différents virus. Le pourcentage de cellules infectées est déterminé 24 h post-infection par cytométrie en flux. Chaque point de ces figures représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$).

Les HMC3, après transfection des ARNi, ont reçues ou non un traitement à l'IFNα pendant 24 h puis ont été infectées avec les différents virus (Figure 34A -B). Comme décrit précédemment dans le modèle HMC3, les analyses de cytométrie montrent que, sans traitement préalable à l'IFNα, l'effet d'APOL1 et APOL3 est quasiment inexistant. En effet, l'ARNi ciblant APOL1 semble avoir un léger effet mais non significatif sur la réplication de VSV et ZIKV (Figure 34A). Il a cependant un effet un significatif sur le nombre de cellules infectées par WNV. Nous avons ajouté à cette expérience des ARNi contrôles ciblant USP18. Nous pouvons voir sur la figure 34A, que ce contrôle n'a pas non plus d'effet sur les différentes infections virales si les cellules ne sont pas traitées préalablement à l'IFNα. Cela semble logique puisqu'USP18 sert de rétrocontrôle négatif à la voie IFNα. Si celle-ci n'est pas stimulée

l'inhibition de ce contrôle ne sera donc pas détectable. Les infections virales permettent l'induction d'IFN-I mais nous pouvons émettre l'hypothèse que 24 h d'infection ne sont pas suffisantes pour induire l'IFN-I et visualiser le rétrocontrôle négatif lié à USP18.

Cependant, si les cellules sont traitées à l'IFN α avant l'infection, les ARNi ciblant APOL1 et APOL3 permettent une inhibition d'au moins 50 % du nombre des cellules infectées par tous les virus testés. L'extinction de leur expression inhibe drastiquement la réplication de VSV. L'inhibition de la réplication des virus sélectionnés est très forte lorsque la cible des ARNi est USP18 (**Figure 34B**). En effet, le traitement préalable à l'IFN α permet la mise en place du rétrocontrôle négatif dirigé par USP18, l'inhibition de ce rétrocontrôle par l'ARNi USP18 est alors détectable.

Dans les podocytes, les analyses de cytométrie mettent également en évidence que l'infection par les différents *Flavivirus* et VSV sont très fortement impactée dans les lignées KO. Cette inhibition est moindre pour MeV même si une diminution de l'infection a bien été observée (**Figure 34C**).

Ces expériences montrent que le rôle proviral des APOLs n'est pas spécifique à ZIKV. En effet, la réplication de deux autres *Flavivirus*, et d'au moins un virus non-apparenté comme VSV, semble être dépendante de l'expression d'APOL1 et APOL3 dans deux modèles cellulaires. Il est aussi important de noter que l'action pro-virale d'APOL3 n'est détectable qu'après un traitement à l'IFN α dans les HMC3, tout comme celle d'USP18. Pour APOL1, le traitement IFN α ne semble pas nécessaire lors de l'infection par certains virus.

II. Lien entre métabolisme lipidique, APOLs et ZIKV

Nous avons discuté dans l'introduction du rôle des APOL1 et 3 dans le métabolisme lipidique et notamment dans la régulation de la production du phospholipide PI(4)P. Cette régulation passe par l'interaction indirecte des APOLs avec la kinase PI4KB (Uzureau et al., 2020). Nous avons donc cherché à déterminer si l'impact des APOLs lors de l'infection, notamment par ZIKV, pouvait être lié à ce rôle physiologique. En effet, il a été montré que, pour certains virus, le PI(4)P est indispensable à la mise en place d'une réplication efficace via la formation de membranes qui servent de plateformes à la production d'ARN (Hsu et al., 2010 ; Arita et al., 2011 ; Berger et al., 2011).

1. Localisation cellulaire des APOLs

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer où sont localisés les APOLs pour vérifier si une interaction, même indirecte, avec la PI4KB était possible. Pour se faire, en l'absence d'anticorps spécifique des APOLs validés pour les expériences d'immunofluorescence, nous avons généré des plasmides permettant l'expression d'APOL3 ou APOL1 fusionnée avec la GFP. Cette technique nous permet de localiser facilement ces protéines par fluorescence. Nous avons donc transfecté les cellules HMC3 avec les différentes constructions et visualisé différents compartiments cellulaires par immunofluorescence, en utilisant des marqueurs appropriés. Ainsi, la localisation des APOL-GFP a été étudiée dans des cellules dont le noyau, les endosomes précoces ou tardifs et l'appareil de Golgi ont été marqués. APOL1-GFP et APOL3-GFP semble localisées dans l'appareil de Golgi mais pas dans les endosomes (**Annexes, Figure 44**). En effet, nous observons une co-localisation du marquage GFP avec la protéine GM130 connue pour résider dans le Cis-Golgi (**Figure 35A**). Ces analyses par immunofluorescence nous permettent donc d'affirmer qu'APOL1 comme APOL3 se trouvent à l'appareil de Golgi. Il a été montré que la kinase PI4KB se trouvait également au niveau de l'appareil de Golgi (Daboussi et al., 2017). Dans un second temps nous avons donc comparé la localisation des APOL-GFP avec celle de la kinase par immunofluorescence. Nous pouvons voir sur la **figure 35B** que le marquage GFP semble là encore co-localiser avec le marquage de la kinase. L'hypothèse que les APOLs interagissent avec la PI4KB pour réguler la production de PI(4)P et ainsi influencer la réplication de certains virus semble donc plausible. Il est à noter que cette expérience a été réalisée dans des conditions de surexpression de version taggées des APOLs. Il est donc possible que la localisation ne soit pas représentative d'une situation plus physiologique. De plus, lors de la surexpression d'APOL1-GFP, nous pouvons observer la formation de structures en forme de vésicules que nous n'avons pu identifier (**Figure 35A**, flèches blanches).

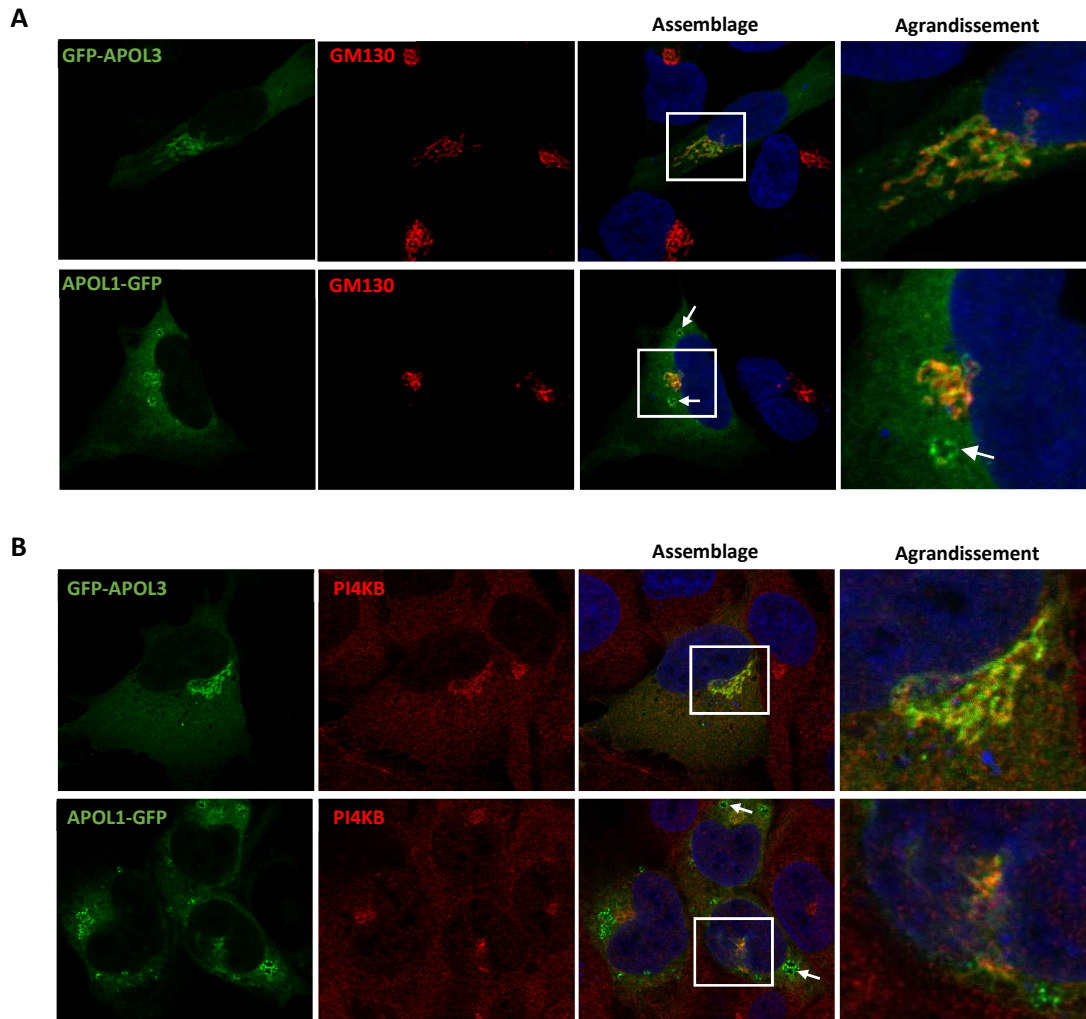


Figure 35. Localisation cellulaire des APOLs. Les HMC-3 sont transfectées avec des constructions GFP-APOL3 et APOL1-GFP. Vingt heures post-transfection, les cellules sont fixées et marquées par des anticorps dirigés, soit contre GM130 (A) soit la PI4KB (B). Le carré blanc correspond à la zone d’agrandissement représentée sur la droite de la figure. Les flèches blanches indiquent des structures en forme de tores formées lors de la surexpression d’APOL1.

2. Rôle des phospholipides PI(4)P lors de l’infection par ZIKV

Pour valider ou non le rôle de la PI4KB et du PI(4)P lors de l’infection par ZIKV, nous avons réalisé l’infection des HMC3 en présence ou non d’un inhibiteur bien caractérisé de la kinase (Rutaganira et al., 2016). Cette molécule permet l’inhibition de l’activité de la PI4KB et ainsi induit une diminution de l’expression du PI(4)P.

Pour nous assurer de l’efficacité de cet inhibiteur nous avons traité avec différentes concentrations les cellules pendant 24 h puis nous les avons fixées et analysées par immunofluorescence pour la détection de PI(4)P. Ainsi nous pouvons voir qu’un traitement à 10 nM permet une diminution de la

présence de PI(4)P. Cette diminution est dose dépendante avec une très forte baisse du marquage PI(4)P lorsque l'inhibiteur est utilisé à 160 nM (**Figure 36A**). Par ailleurs, nous n'avons observé aucune mort cellulaire après le traitement.

Une fois l'inhibiteur validé, nous avons infecté les HMC3 avec ZIKV. Puis, juste après infection, nous les avons traitées pendant 36 h avec différentes doses d'inhibiteur. Le pourcentage de cellules infectées a, par la suite, été déterminé par cytométrie en flux (**Figure 36B**). Pour cette expérience nous avons également infecté les cellules avec le virus coxackie B3 (CVB3). En effet, il a été montré que ce virus utilise les lipides PI(4)P pour sa réplication et qu'un inhibiteur ciblant PI4KB pouvait induire une forte diminution de l'infection (Hsu et al., 2010). Cette condition nous sert donc ici de contrôle positif. Nous avons également infecté les cellules avec WNV. Une étude montre que ce flavivirus n'est pas sensible à un traitement par un inhibiteur de la PI4KB, nous nous en sommes donc servi comme d'un contrôle négatif (Martin-Acebes et al., 2011). Nous pouvons voir sur la **figure 36B** que l'inhibiteur inhibe comme attendu l'infection des HMC3 par CVB3. De plus, cette inhibition est dépendante de la dose d'inhibiteur utilisée. Pour WNV, aucune diminution d'infection n'est visible. De même, l'infection par ZIKV n'est pas impactée par le traitement.

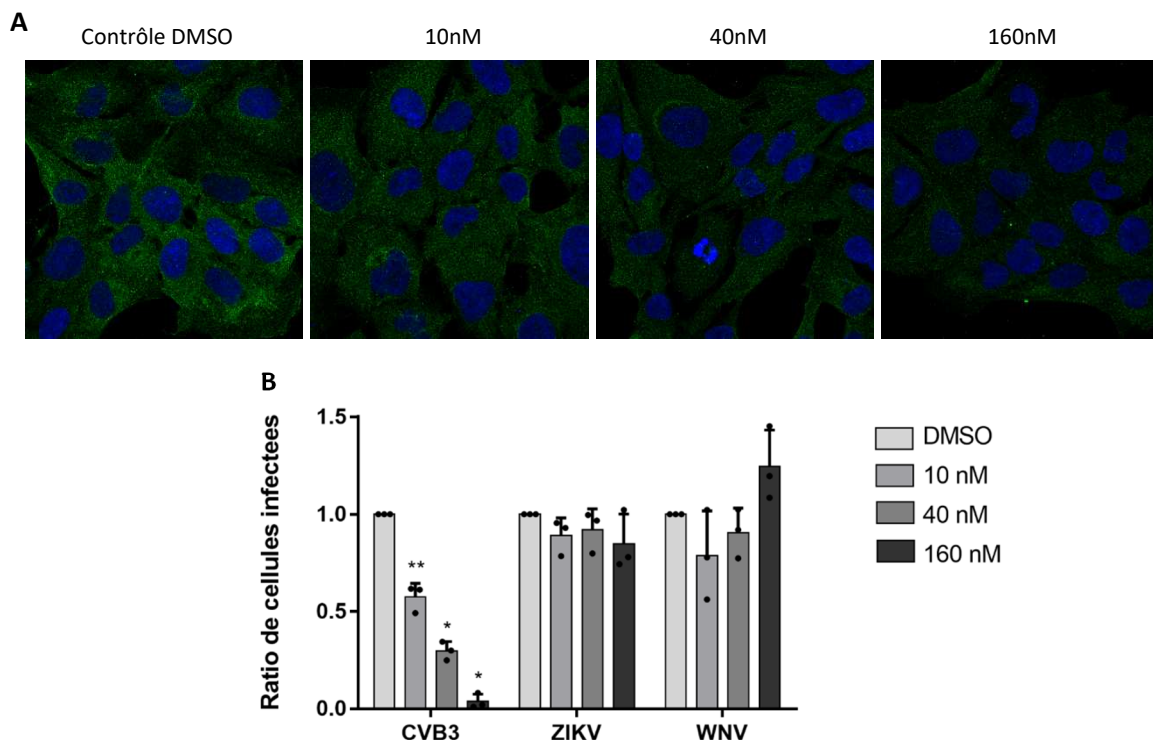


Figure 36. Rôle des PI4P dans l'infection par ZIKV. (A) Les HMC-3 sont traitées avec différentes concentrations d'inhibiteur de PI4KB. Un contrôle avec traitement DMSO est réalisé. Les cellules sont fixées et analysées par immunofluorescence après marquage du PI(4)P (vert). (B) Les HMC-3 sont infectées par CVB3 (MOI 50), ZIKV (MOI 0,05) ou WNV (MOI 0,02). L'inoculum est retiré et remplacé par l'inhibiteur de la PI4KB à différentes concentrations. Le pourcentage de cellules infectées est déterminé 38 h post-infection par cytométrie en flux. Chaque point de cette figure représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Les résultats obtenus ici ne sont pas surprenant. Effectivement, il avait été mis en évidence que les PI(4)P ne sont pas important pour la réplication de WNV ou celle du virus Usutu (Marin-Acebes et al. 2011). Ces virus appartenant au genre *Flavivirus*, il était très probable que cette observation soit également vraie pour ZIKV. Cependant aucune étude ne l'avait encore démontré.

Ces expériences suggèrent que le rôle pro-viral des APOL1 et 3 n'est pas lié à leur interaction avec la PI4KB ni le PI(4)P dans les cellules microgliales. Nous avons donc exploré d'autres pistes afin de comprendre comment les APOLs modulaient la réplication de plusieurs virus à ARN.

III. Effet des protéines APOL1 et APOL3 sur la voie IFN

En raison de l'impact positif d'APOL1 et APOL3 sur la réplication d'un large spectre de virus, nous avons émis l'hypothèse que ces 2 protéines étaient des régulateurs des voies de signalisation IFN. Il se pourrait en effet que les APOLs fonctionnent de la même manière qu'USP18 ou ISG15, qui sont des protéines pro-virales ayant également été retrouvées dans notre crible. USP18 et ISG15, comme détaillé dans l'introduction, sont des protéines permettant la régulation négative de la voie interféron. Leur effet pro-viral est donc observable chez tous les virus sensibles à l'IFN. Pour étudier si un tel mécanisme pourrait être à l'origine du rôle pro-viral des APOLs, nous avons tout d'abord cherché à quantifier l'expression des ISGs dans nos différents modèles cellulaires, en présence ou absence d'APOL1 et APOL3. Nous avons également quantifié la sécrétion d'IFN et l'impact de la surexpression d'APOL3 sur l'élément de réponse stimulé à l'interféron (ISRE).

1. Régulation potentielle des voies IFN dans les lignées podocytes KO par APOL1 et APOL3

a. Modulation de l'expression des ISGs par APOL1 et APOL3

Dans un premier temps, nous avons quantifié par RT-qPCR l'induction de l'expression d'une sélection d'ISGs dans les lignées de podocytes KO et WT. Cette quantification est réalisée à l'état basal, sans traitement ni infection. Nous avons choisi 4 ISGs : RIG-I, qui est un des senseurs de ZIKV, IFI6 et IFITM3 qui sont 2 ISGs décrits comme jouant un rôle important dans le contrôle de l'infection par ZIKV ([Savidis et al., 2016a](#) ; [Richardson et al., 2018](#)), et ISG56 dont l'expression varie de façon importante lors de l'infection virale ou du traitement à l'IFN-I. Nous pouvons observer que, dans les lignées KO APOL1, tous ces ISGs sont faiblement mais significativement induits, de 2 à 6 fois, par rapport aux niveaux détectés dans les cellules WT (**Figure 37A**). Pour la lignée KO APOL3, une induction significative est visible pour IFI6 et IFITM3 et une tendance à l'augmentation est observable pour les 2 autres ISGs. Ces inductions sont comparables à celles obtenues sur la lignée WT après traitement de celle-ci avec une faible dose d'IFN α (50 U/ml) (**Figure 37A**).

Dans un second temps, ces inductions d'ISG en absence d'APOL1 et APOL3 ont été validées au niveau protéique par western blot (**Figure 37B-C**). Nous pouvons quantifier une augmentation de l'expression de RIG-I, ISG56 et IFITM3 dépendante de la concentration du traitement IFN α reçu dans la lignée WT (de 2 à 4 fois). De façon cohérente avec les résultats obtenus en RT-qPCR, nous observons une quantité d'ISG dans les lignées KO comparable à celle dans les lignées WT avec traitement IFN α à 50 U/ml.

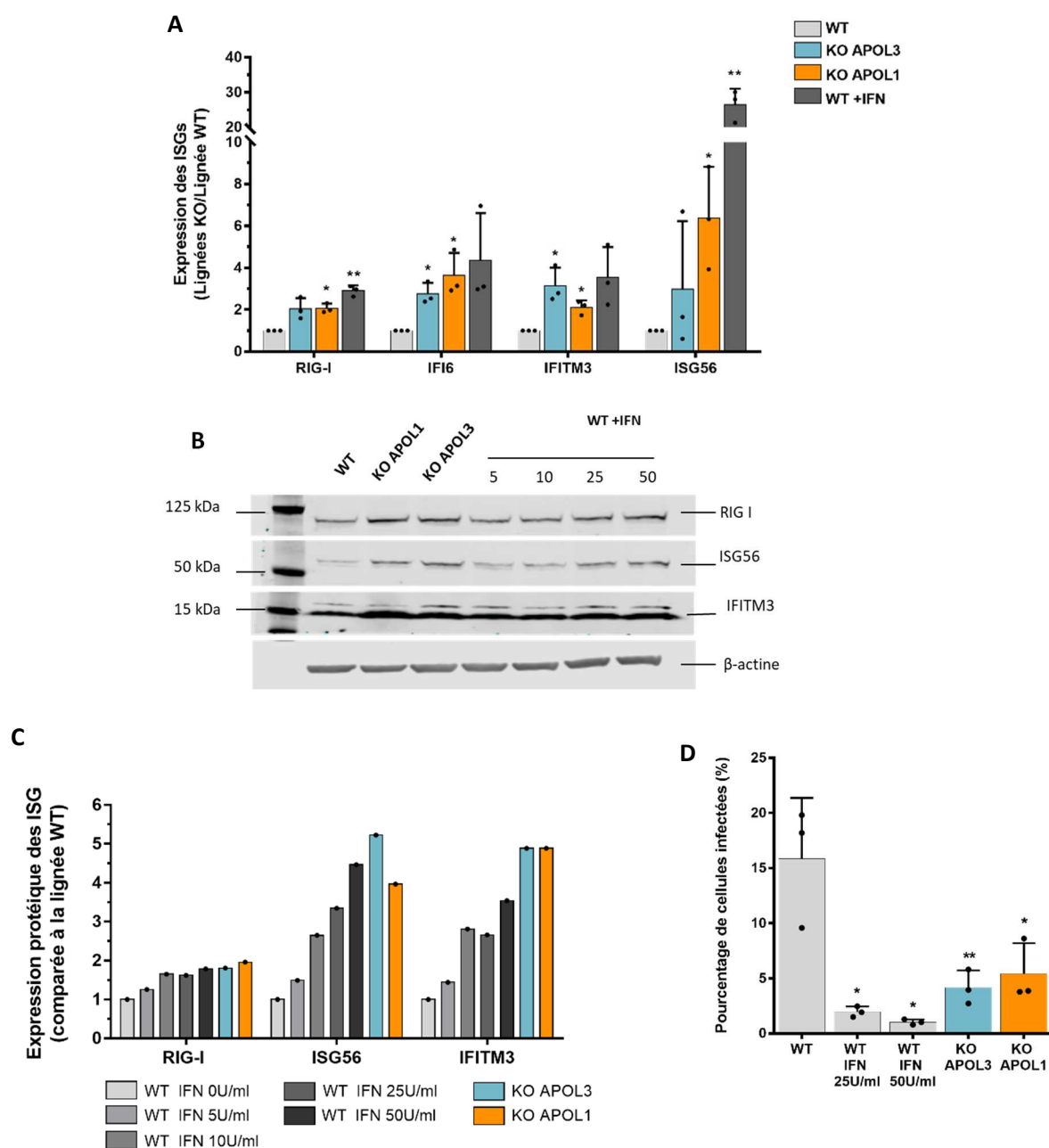


Figure 37. Induction des ISG dans lignées podocytes KO. (A) L'expression de différents ISGs est déterminée par RT-qPCR dans les différentes lignées de podocyte KO et WT traitée ou non avec 50 U/ml d'IFN α . (B) L'expression de différents ISGs est déterminée par western blot dans les différentes lignées de podocyte KO et WT traitée ou non avec différentes doses d'IFN α . (C) Quantification de l'expression des ISGs obtenue par western blot après normalisation par l'actine. (D) Les différentes lignées de podocyte sont infectées à MOI 10 par ZIKV. La lignée WT a préalablement été traitée avec différentes dose d'IFN α . Le pourcentage de cellules infectées est déterminé par cytométrie en flux. Chaque point sur ces figures représente une expérience indépendante. Le western blot est représentatif des trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett sur les données et RT-qPCR et par t-test apparié multiples sur les données de cytométrie en flux (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Pour finir, nous avons vérifié qu'un traitement avec une faible dose d'IFN α permettant l'induction des ISGs, de façon comparable à ce qui est observé dans les lignées KO, était suffisant pour obtenir l'inhibition de la réplication de ZIKV observée dans ces lignées. La lignée WT a reçu préalablement différentes doses d'IFN α . Nous pouvons voir, après analyse par cytométrie en flux, que le traitement IFN α à 25 U/ml est suffisant pour inhiber, autant et même plus l'infection par ZIKV en comparaison des lignées KO (**Figure 37D**). Une dose plus faible d'IFN α pourrait même être suffisante pour observer le phénotype observé dans les lignées KO.

Toutes ces observations nous indiquent qu'une extinction de l'expression d'APOL1 ou d'APOL3 dans les podocytes permet l'induction de certains ISG. De plus, cette faible induction est suffisante pour être à l'origine du phénotype observé dans les lignées KO lors de l'infection par ZIKV. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les protéines APOL1 et APOL3 seraient impliquées dans la régulation de la réponse IFN. En effet, s'ils permettent un rétrocontrôle négatif sur la voie d'induction et/ou de signalisation des IFNs, il est logique que l'inhibition de leur expression aboutisse à une induction de tous les ISGs. Si cette faible induction concerne tous les ISGs, une réduction drastique de la réplication virale est attendue.

b. Absence d'induction d'IFN dans les lignées podocytes KO

Nous avons ensuite voulu déterminer si l'induction des ISGs dans les lignées KO pouvait être due à une sécrétion accrue d'IFN-I qui permettrait alors l'activation de la voie JAK-STAT et une induction de l'expression des ISGs. L'expression de l'IFN β a été déterminée dans les lignées KO par RT-qPCR. Cette technique ne nous a pas permis de conclure sur une production accrue de cet IFN dans les lignées KO. Une légère induction est présente mais elle n'est pas significative (**Figure 38A**). Afin de tester la production d'IFN-I et non plus seulement l'expression d'IFN β , nous avons quantifié les IFN-I dans le surnageant des différentes lignées. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire Sting37. Les cellules Sting37 sont des HEK-293T qui expriment la luciférase sous le contrôle de l'élément de réponse stimulé par l'IFN (ISRE) (Khiar et al., 2017). Ainsi, nous avons traité les cellules Sting37 avec le surnageant des différentes lignées et quantifié l'activité de la luciférase. En parallèle, nous avons également effectué un traitement IFN α sur les cellules pour permettre une quantification relative de l'IFN-I potentiellement présent dans les surnageants de lignées de podocytes. Cependant, nous pouvons observer sur la **figure 38B** que les surnageants des cellules KO pour APOL1 et APOL3 ne contiennent pas d'IFN en quantité suffisante pour induire une activité de la luciférase détectable. Ces deux quantifications suggèrent que la sécrétion d'IFN-I n'est pas modulée dans les lignées KO. Cela signifie que l'induction des ISG serait régulée par APOL1 et APOL3 en aval de la production d'IFN-I.

Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la régulation des ISG médiée par APOL1 et APOL3 pourrait s'effectuer au niveau de la voie JAK-STAT et non au niveau de la production d'IFN-I.

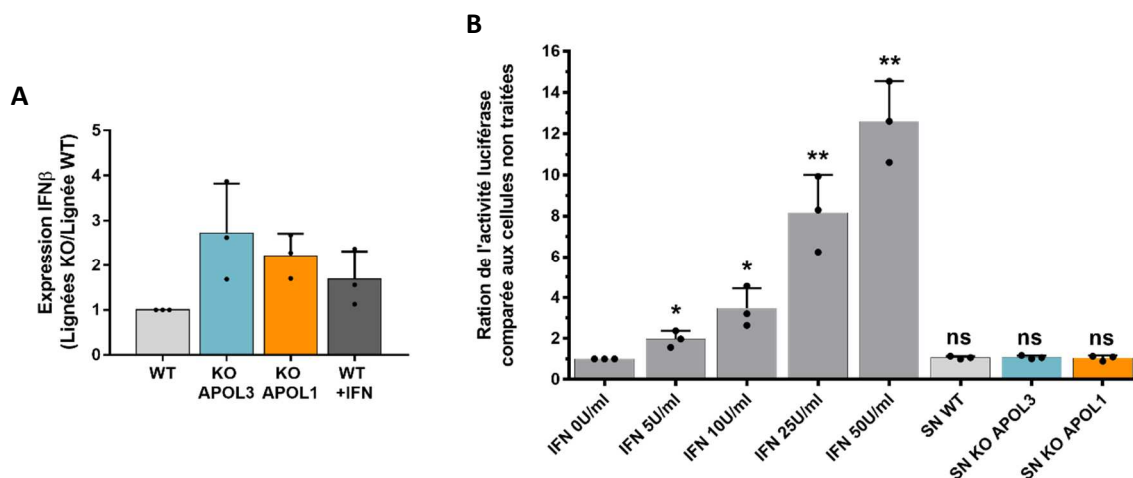


Figure 38. Absence d'induction d'IFN-I dans lignées podocytes KO. (A) L'expression d'IFN β est déterminée par RT-qPCR dans les différentes lignées de podocyte KO et WT traitée ou non avec 50 U/ml d'IFN α . (B) Les cellules Sting37 sont traitées avec différentes dose d'IFN α ou avec du surnageant provenant des différentes lignées de podocytes. L'activité luciférase est mesurée 24 h après traitement. Chaque point sur ces figures représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett sur les données et RT-qPCR et par t-test apparié multiples sur les données de cytométrie en flux (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

c. Rôle d'APOL3 dans le contrôle d'ISRE

Pour valider notre hypothèse qu'APOL1 et APOL3 pourraient être des régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT, nous avons déterminé si la surexpression d'APOL3 impactait sur l'activation d'ISRE. Des cellules 293-T ont été transfectées avec 3 plasmides : le premier permettant l'expression d'APOL3, le

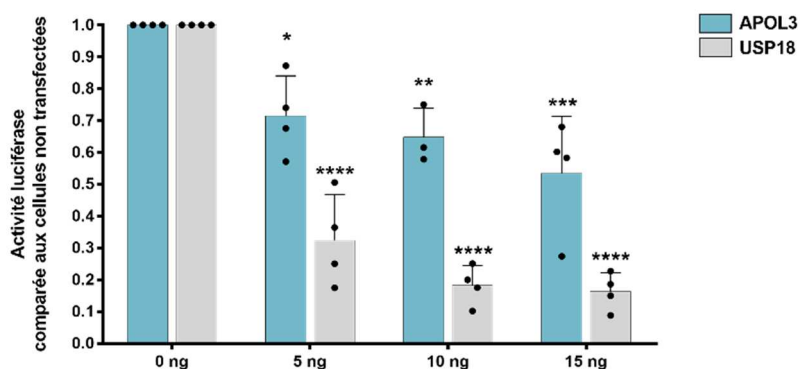


Figure 39. Contrôle d'ISRE par APOL3. Les cellules 293-T sont transfectées avec différentes doses de plasmide permettant l'expression d'APOL3 ou USP18, ainsi que par un plasmide codant pour la luciférase sous le contrôle d'ISRE. L'activité luciférase est mesurée 24 h après transfection. Chaque point sur ces figures représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$).

deuxième codant pour la luciférase sous le contrôle de ISRE (ISRE-Luc) et un plasmide codant la GFP comme contrôle de transfection. La forte surexpression d'APOL3 étant toxique, nous n'avons transfecté que de faibles doses de ce plasmide. Pour le contrôle positif, le plasmide APOL3 a été remplacé par un plasmide codant USP18. L'activité luciférase a été quantifiée 24 h post-transfection. Ainsi, nous pouvons observer qu'avec la surexpression d'APOL3, il y a diminution de l'activité luciférase mesurée. Cette diminution est moins importante que celle induite par USP18, toutefois, elle est significative (**Figure 39**). Cette expérience n'a pas été réalisée avec un plasmide codant APOL1, néanmoins, il serait intéressant de voir si cet effet est également visible dans cette condition.

2. Régulation potentielle des voies IFN dans les podocytes et les cellules microgliales traitées avec des ARNi ciblant APOL1 ou APOL3

Pour poursuivre la validation de l'hypothèse qu'APOL1 et APOL3 pourraient être des régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT, nous avons étudié l'expression des ISGs dans les HMC3 et les podocytes WT traités avec des ARNi ciblant APOL1 ou APOL3, ou, en contrôle positif, USP18. Nous rappelons que dans ce modèle d'extinction, le phénotype sur l'infection virale n'est observé qu'après un traitement à l'IFN α (**Figure 27**). Dans ce contexte, nous avons quantifié l'expression des différents ISGs dans les 2 lignées cellulaires avec ou sans traitement IFN α .

En ce qui concerne les HMC3, nous observons une tendance à l'augmentation d'expression pour les différents ISGs dans les cellules traitées avec les ARNi. Dans la condition non traitée à l'IFN, nous pouvons voir une induction significative d'IFITM3 et ISG56 avec l'ARNi APOL1 (**Figure 40A**). Pour l'ARNi ciblant APOL3, l'induction est significative seulement pour IFI6 même si celle-ci est faible. Pour les autres ISGs, l'augmentation n'est pas significative, toutefois, la tendance est systématiquement à la hausse. Sans traitement à l'IFN α , l'ARNi USP18 n'a aucun effet sur l'expression des ISGs (**Figure 40A**).

Lorsque les HMC3 sont traitées à l'IFN, l'induction des ISGs par l'ARNi APOL3 ne semble toujours pas significative (**Figure 40B**). L'ARNi ciblant APOL1 semble quant à lui avoir un effet plus important sur l'induction de l'expression des ISGs sélectionnés. En effet, là encore, on note une induction significative de l'expression de 2 ISGs, RIG-I et ISG56. Les inductions observées pour l'ARNi APOL1 sont comparables à celles obtenues avec l'ARNi USP18 (**Figure 40B**).

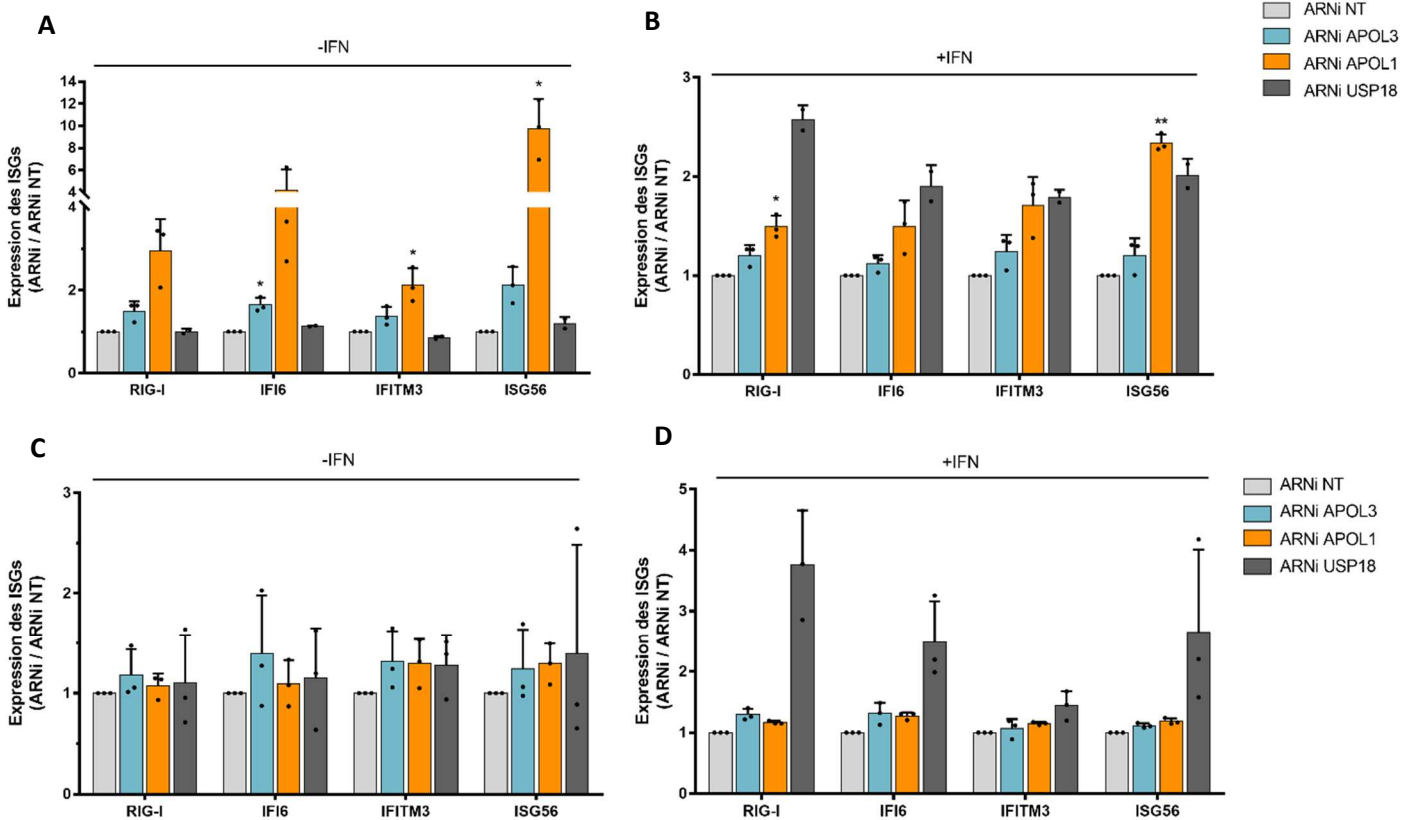


Figure 40. Induction des ISGs dans cellules HMC3 et les podocytes exprimant moins d'APOL1 ou APOL3. (A-B) Les HMC3 sont transfectées avec des ARNi ciblant APOL3, APOL1 ou USP18 puis sont traitées ou non avec l'IFN α (200 U/ml, 24 h). L'expression de différents ISGs est déterminée par RT-qPCR. (C-D) Les podocytes WT sont transfectées avec des ARNi ciblant APOL3, APOL1 ou USP18 puis sont traitées ou non avec l'IFN α (200 U/ml, 24 h). L'expression de différents ISGs est déterminée par RT-qPCR. Chaque point sur ces figures représente une expérience indépendante. Les analyses statistiques ont été effectuées par test de Dunnett (* p < 0,05 ; ** p < 0,001).

Il est surprenant de voir que, dans ces cellules, même sans traitement IFN, l'expression de certains ISG semblent régulées par les ARNi ciblant APOL1 ou APOL3. Puisqu'aucun effet sur l'infection de ZIKV n'est visible sans traitement IFN α (Figure 27), nous ne nous attendions pas à ne voir une régulation des ISGs. Cela s'explique peut-être par le fait que nous quantifions le niveau basal des ISGs. Le niveau d'expression de certains de ces ISGs étant très faible dans la condition ARNi NT, un facteur 2 d'induction ne permet peut-être pas une restriction de l'infection virale. Au contraire, dans les cellules traitées à l'IFN le niveau d'expression des ISGs est déjà très important dans la condition ARNi NT, un facteur d'induction de 2 permet alors une forte différence d'expression de l'ISG en question et l'impact est potentiellement plus visible sur l'infection virale.

De façon surprenante, dans la lignée de podocytes WT l'expression des ISGs ne semble pas impactée par les ARNi ciblant APOL1 et APOL3 (Figure 40C-D). Seul l'ARNi ciblant USP18, dans la condition traitée

à l'IFN, permet une légère augmentation de certains ISGs. Toutefois, même cette induction n'est pas significative (**Figure 40D**). Ce résultat est très inattendu. En effet, au vu de la surexpression de certains ISGs observés dans les lignées de podocytes KO (**Figure 37A-C**) et des résultats obtenus pour les HMC3 (**Figure 40A-B**), nous nous attendions à observer là encore une induction des ISGs avec les ARNi ciblant les APOLs.

3. Questionnement sur les clones de podocytes KO APOL1 et KO APOL3

Au vu des différences d'induction d'ISGs entre les lignées podocytes KO (**Figure 37**) et le modèle d'extinction par ARNi (**Figure 40C-D**) ainsi que de la différence d'inhibition de l'infection par différents virus dans ces deux modèles (**Figure 27-28**), nous nous sommes questionné sur un possible biais dû à la clonalité des cellules. En effet, la technique de CRISPR Cas9 utilisée pour la mise au point des lignées KO permet la sélection de cellules n'exprimant plus les protéines ciblées, ici, APOL1 ou APOL3. Cependant, une fois la cellule KO sélectionnée, l'expansion est clonale. Le fait d'utiliser une culture clonale pourrait intégrer un biais si la cellule sélectionnée à l'origine possède des caractéristiques particulières.

Toutefois, il est important de noter que les lignées podocytes utilisées ont été séquencées par nos collaborateurs pour vérifier que l'expression de la protéine cible (APOL1 ou APOL3) était bien éteinte (**Annexes, Tableau 11**) (Uzureau et.al, 2020).

Par la suite, pour déterminer si l'effet exacerbé des APOLs dans le modèle d'extinction CRISPR en comparaison à l'ARNi était un biais des lignées clonales, nous avons travaillé avec autre clone de podocytes KO APOL3 (KO APOL3 clone2) généré par nos collaborateurs. Cette lignée a également été séquencée (**Annexes, Tableau 11**). Nous avons alors réalisé l'infection de ces cellules par ZIKV et quantifié le pourcentage de cellules infectées par cytométrie en flux. De façon très surprenante cette nouvelle lignée KO APOL3 clone2 ne permet pas un contrôle de l'infection par ZIKV (**Figure 41**). Cette observation remet en question le modèle des lignées podocytes KO. En effet, nous nous serions attendu à obtenir le même phénotype que présenté en **figure 28A**. Malheureusement, puisqu'aucun autre clone de cellule KO APOL1 n'a été généré, nous ne pouvons donc pas vérifier le rôle d'APOL1 dans une autre lignée KO.

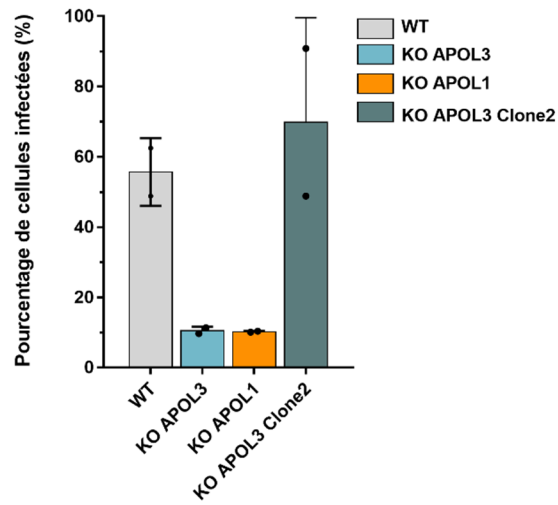


Figure 41. Comportement de différents clones podocytes KO APOL3 lors de l'infection par ZIKV. Les différentes lignées de podocytes sont infectées à différentes MOI 10 pendant 24 h. Le pourcentage de cellules infectées est ensuite déterminé par cytométrie en flux. Chaque point de ces figures représente une expérience indépendante. Aucune analyse statistique n'a été réalisée car l'expérience n'a été répétée que 2 fois.

Discussion

Discussion

I. Crible à haut débit pour identifier des gènes de la réponse innée modulant l'infection virale

1. Stratégie de criblage utilisée, quels avantages et quelles limites ?

Les cribles à haut débit sont de plus en plus couramment utilisés pour identifier des facteurs cellulaires permettant le contrôle d'infection virale. Comme détaillé dans l'introduction, ce projet vient compléter différentes études de ce type qui ont déjà été menées sur des virus de la famille des *Flaviviridae* (Zhao et al., 2012 ; Metz et al., 2012 ; Schoggins et al., 2011 ; Richardson et al., 2018 ; Dukhovny et al., 2019).

a. Extinction d'expression des gènes sélectionnés par ARNi

Notre crible à haut débit a permis, via l'inhibition d'expression spécifique de certains gènes par ARNi, d'identifier et de valider, parmi 386 candidats, 10 acteurs de la réponse immunitaire innée capable de moduler l'infection par ZIKV dans les cellules HMC3. Précédemment, plusieurs équipes ont réalisé des cribles à haut débit pour identifier des facteurs cellulaires permettant le contrôle de l'infection par ZIKV. Une étude a choisi une approche de surexpression de gènes via la technique CRISPR Cas9 permettant une inhibition d'infection si le gène ciblé possède une activité antivirale (Dukhovny et al., 2019). D'autres études ont opté, toujours à l'aide de la technique CRISPR cas9, pour une approche d'extinction d'expression de tous les gènes sans présélection (*whole genome screening*) (Savidis et al., 2016b ; Li et al., 2019). Nous utilisons ici la technique d'extinction par ARNi qui a notamment été utilisée dans des cribles étudiant l'infection par HCV ou encore WNV (Krishnan et al., 2008 ; Zhao et al., 2012 ; Metz et al., 2012). Toutefois, il est important de noter que ces méthodes d'extinction des gènes possèdent l'inconvénient de pouvoir présenter des effets *off-target*. Par ailleurs, les ARNi ne permettent qu'une diminution de l'expression du gène cible contrairement à la technique CRISPR Cas9 qui permet, en théorie, une extinction totale. Les effets *off-target* ainsi que l'efficacité des ARNi n'ont pu être quantifiés lors du crible. Cependant, pour les validations des candidats (**Figure 25**), les extinctions des expressions ont été testées.

De plus, contrairement aux autres études menées sur ZIKV (Savidis et al., 2016b ; Li et al., 2019 ; Dukhovny et al., 2019), notre crible a été réalisé dans un contexte de cellules stimulées à l'IFN α . Ce

traitement nous permet d'identifier plus facilement des ISGs responsables de la mise en place de la réponse immunitaire innée.

Pour finir, notre crible a été conçu pour permettre l'identification dans candidats ayant une activité pro-virale ce qui n'est pas le cas de la majorité des études précédentes. Ainsi, nous avons pu identifier et valider 6 gènes favorisant l'infection par ZIKV (LY6E, USP18, ISG15, APOL3, GBP3, NAPA). Il est surprenant d'observer un plus grand nombre de candidats ayant une activité pro-virale. En effet, notre crible ciblant des ISGs, nous nous attendions à observer un plus grand nombre de gènes antiviraux. Cependant, nous savons que ZIKV peut contrecarrer la réponse immunitaire innée à différentes étapes (**Tableau 2, Figure 10-11**). Nous pouvons donc supposer qu'il peut également détourner de nombreux ISGs comme cela a déjà été montré pour LY6E ou MCOLN2 (Hackett and Cherry, 2018 ; Rinkenberger and Schoggins, 2018).

b. Particularité de la banque d'ARNi utilisée

Les gènes regroupés dans cette banque sont issus de l'activation de lymphocytes T CD4+ par différentes cytokines secrétées par les MDCC, elles-mêmes activées suite à un traitement par différents stimuli notamment IFN α ou stimuli viraux (**Figure 16**) (Manel et al, en cours de préparation). Il est possible que les gènes dont l'expression est induite par ces stimuli ne soient pas identiques dans les lymphocytes T CD4+ et dans les HMC3. Cependant, cette approche atypique a permis d'obtenir une liste de gènes candidats atypiques. En effet, si l'on compare cette liste à celle de Schoggins publiée en 2011 seul 47 % des gènes sont retrouvés (Schoggins et al., 2011). De plus, ces gènes correspondent à des gènes dont l'expression est similaire à MX1 suite au traitement des cellules par différents stimuli. MX1 étant un ISG antiviral bien décrit, l'hypothèse est donc que notre banque permet de cibler des gènes ayant également des fonctions antivirales.

Une autre méthode plus adaptée à notre modèle cellulaire aurait été de faire une analyse transcriptomique sur les HMC3 traitées à l'IFN α . En effet, dans ce cas, nous aurions pu avoir une liste d'ISGs spécifiques aux HMC3 et réaliser une banque ciblant ces ISGs.

c. Quantification de l'infection durant le crible

L'impact des différents ARNi sur la réplication virale a été déterminé 24 h post-infection par immunofluorescence. Cette approche nous a permis de quantifier dans chaque condition le pourcentage de cellules infectées via la présence et l'intensité du signal émis par la protéine d'enveloppe. Cependant, elle ne permet de mettre en évidence que les modulations sur les étapes précoces du cycle viral (de l'entrée jusqu'à la production de protéines). En effet, si l'inhibition d'un

gène influe sur le bourgeonnement de la particule virale, par exemple, elle n’aura aucun effet sur la présence de la protéine d’enveloppe à 24 h. Un moyen de remédier à ce biais pourrait être de réaliser le crible sur une infection plus longue. Ainsi si le bourgeonnement du virus est impacté, les réinfections seront moins nombreuses et la différence pourrait être significative. Nous pourrions également imaginer de mettre au point une technique automatisée pour quantifier par titrage le relargage des particules infectieuses dans le surnageant des cultures pour chaque condition.

2. Mise en évidence de nouveaux candidats modulant la réplication du virus ZIKV

Les candidats ayant été sélectionnés suite aux analyses du crible ont pu être validés ou non par trois techniques différentes : la cytométrie en flux, la RT-qPCR et les titrations (**Figures 25**). De façon inattendue, 11 candidats sur 21 n’ont pas été validés par au moins une seconde méthode. Cela pourrait s’expliquer par le phénomène de *off-target* potentiel des ARNi utilisés pendant le crible. En effet, pour le crible nous avons utilisé des ARNi individuels qui peuvent avoir des effets *off target* plus marqués en comparaison des mélanges d’ARNi utilisés lors des validations. De plus, aucun candidat validé par les approches de cytométrie et de RT-qPCR n’est validé de façon significative par titration. Ce résultat est également surprenant. Nous pouvons émettre l’hypothèse que la technique utilisée n’est pas assez sensible. En effet, des dilutions de 10 en 10 ont été utilisées, au vu de l’effet en cytométrie et en RT-qPCR qui est plutôt de l’ordre du facteur 2-4, nous aurions dû réaliser des dilutions de 2 en 2 pour un titrage plus précis.

De façon surprenante, certains ISGs présent dans notre liste et connus comme ayant un impact sur l’infection par ZIKV n’ont pas été identifiés comme modulateur de la réplication, parmi eux, IFI6, Vipérine, PARP-12, C19orf66 (Van der Hoek et al., 2017 ; Richardson et al., 2018 ; Li et al., 2018 ; Wu et al., 2020). IFI6 est à la limite de la sélection suite aux analyses du crible. Si nous avions opté pour une sélection des candidats moins stringente, il aurait probablement été identifié comme candidat antiviral. Pour les 3 autres ISGs, nous pouvons avancer l’hypothèse que leur influence sur la réplication virale est plus faible dans les HMC3 que dans les cellules dans lesquelles leur rôle ont été préalablement établi. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que la restriction de la réplication des *flavivirus* TBEV et Langkat par la vipérine est fonction du type cellulaire (Lindqvist et al., 2018). D’autres hypothèses sont envisageables. Il se peut que les ARNi utilisés dans le crible et ciblant PARP-12, C19orf66 et Vipérine étaient peu efficaces. Enfin, il est possible que les niveaux d’expression de PARP-12, C19orf66 et Vipérine soit faibles, même en présence d’IFN α , dans les HMC3 et donc peu ou pas impacté par la présence des ARNi. Ces candidats ne seraient alors pas des ISGs dans la lignée HMC3. Les résultats présentés dans la **figure 24** sont consistant avec cette hypothèse.

Malgré ces limites, le crible et les expériences de validation ont mis en évidence de nouveaux acteurs de l'immunité innée jouant un rôle antiviral ou pro-viral sur ZIKV. Nous détaillons ci-dessous les candidats pour lesquels l'impact a été validé par différentes techniques.

a. Les candidats antiviraux

Nous avons validé le rôle anti-ZIKV de 4 candidats : IRF9, IFITM3, MTA2 et GPD2. (**Figure 25**).

La confirmation des fonctions d'IRF9 et IFITM3, qui sont connus pour, respectivement, jouer un rôle dans la régulation positive de l'expression des ISGs et avoir un impact négatif sur l'infection par ZIKV, valide notre approche et conforte notre sélection de candidats antiviraux (Savidis et al., 2016a ; Fink and Grandvaux, 2013).

MTA2 (metastasis-associated protein 2) est le candidat issu du crible ayant l'impact antiviral le plus fort parmi les candidats (**Figure 25**). En effet l'inhibition de son expression en présence d'IFN α aboutit à un niveau de réplication virale comparable à l'inhibition d'IFNAR1 (que ce soit par les analyses de cytométrie en flux comme de RT-qPCR). MTA2 est une protéine nucléaire appartenant au complexe NuRD (Zhang et al., 1999). Ce complexe est majoritairement étudié en cancérologie. En effet, il joue un rôle important dans la mise en place de métastase via le remodelage de la chromatine (Fu et al., 2011). A l'heure actuelle, une seule étude a exploré le rôle du complexe NuRD sur la réplication virale. Cette étude a abouti à la conclusion que ce complexe favoriserait l'infection de fibroblastes primaires humain par le cytomégalovirus humain (HCMV) (Terhune et al., 2010). Un autre membre de l'équipe a commencé à étudier de façon plus approfondie le rôle de MTA2 sur la réplication des flavivirus. L'effet de l'inhibition de l'expression de MTA2 a été validé en utilisant un mélange de 4 ARNi, différents de ceux utilisés dans le crible, dans les HCM3 (**Figure 42A**) et dans les cellules de foie Huh7 (**Figure 42B**). Cet effet est observé uniquement en présence d'IFNs dans les cellules Huh7 (**Figure 42B**). Des anticorps spécifiques de MTA2 nous ont permis de valider l'efficacité des ARNi utilisés (**Figure 42C**).

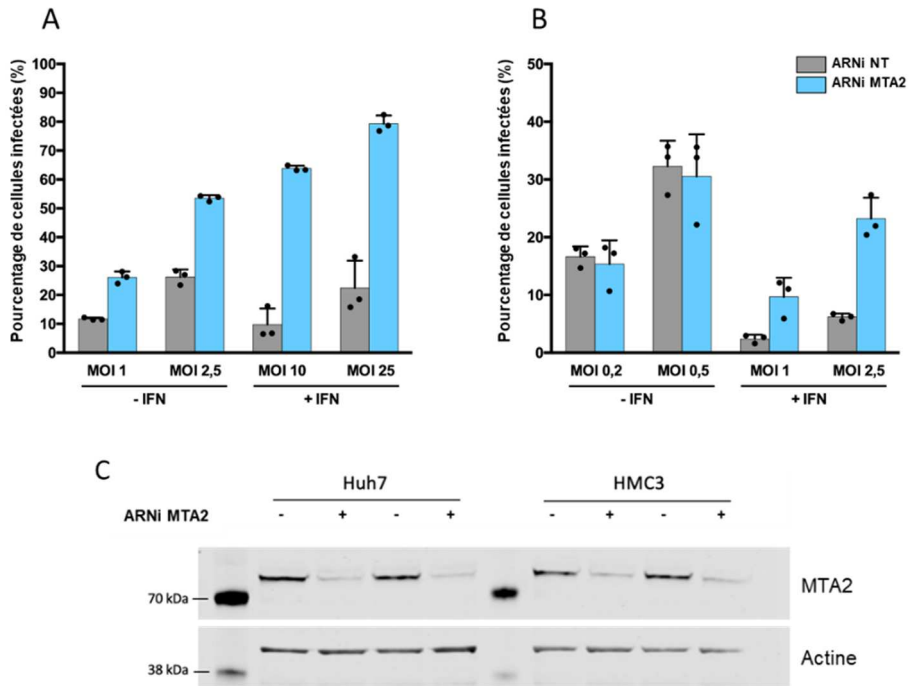


Figure 42. MTA2 inhibe l'infection par ZIKV dans les cellules HMC3 et les cellules Huh7. Les HMC3 (A) ou les Huh7 (B) sont transfectées avec des ARNi NT ou ciblant MTA2 puis traitées ou non à l'IFN α (200 U/ml, 24 h) et enfin infectées avec ZIKV à moi 0,2 ou moi 2,5. Le pourcentage de cellules infectées est déterminé 24 h post-infection par cytométrie en flux. (C) L'extinction de l'expression de MTA2 est vérifié en Western blot 48 post-transfection des ARNi.

De plus, MTA2 inhibe également l'infection par le virus de la fièvre jaune et par le virus du Nil occidental dans les cellules Huh7 (**Figure 43**). MTA2 a donc potentiellement une activité antivirale à large spectre. Il sera intéressant de déterminer si MTA2 agit contre des virus non apparentés aux *Flavivirus*.

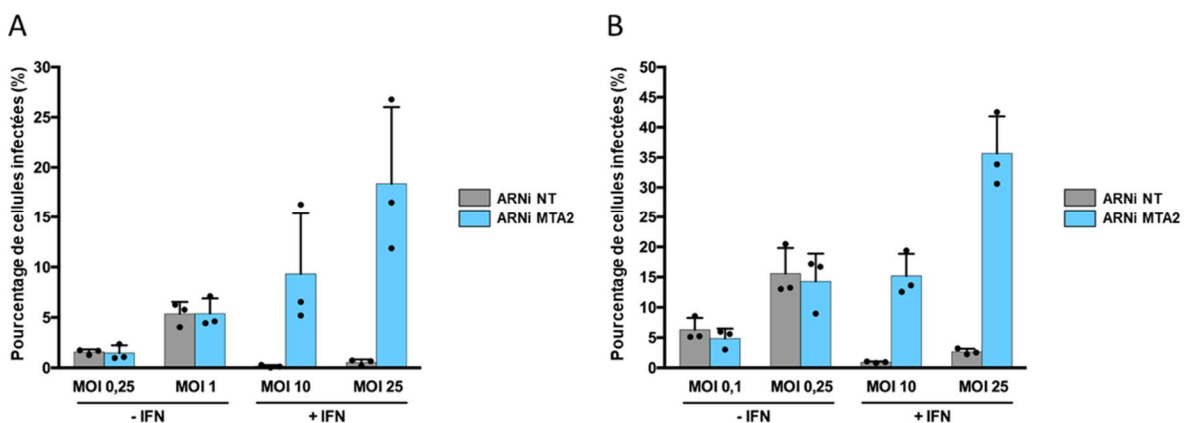


Figure 43. La réplication de YFV et WNV est inhibée par MTA2 dans les cellules traitées à l'IFN α . Les cellules Huh7 ont été transfectées avec des ARNi ciblant MTA2 puis traitées à l'IFN (200 U/ml) et infectées par YFV(A) ou WNV (B). Le pourcentage de cellules infectées est déterminé par cytométrie en flux.

Il a récemment été montré que le complexe NurD pouvait interagir avec STAT1 dans le contexte d'une infection par le parasite *Toxoplasma gondii* de la lignée cellulaire de fibroblaste humain U3A. L'interaction entre le complexe NurD, STAT1 et une protéine parasitaire aboutit à l'inhibition de la transcription médiée par STAT1 (Olias et al., 2016). Par ailleurs, deux études transcriptomiques ont révélé une interaction potentielle, non validée par d'autres approches, entre MTA2 et la protéine NS5 de ZIKV (Coyaud et al., 2018 ; Kovanich et al., 2019). Le rôle de cette interaction sur la réplication virale n'a pas été approfondi. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le complexe NurD pourrait interagir avec STAT1 dans des cellules stimulées à l'IFN α et que cette interaction pourrait aboutir à l'induction de certains ISGs et donc jouer un rôle antiviral à large spectre. Dans le contexte d'une infection par un *Flavivirus*, le complexe NurD/STAT1 pourrait alors être ciblé par NS5 pour permettre au virus d'échapper à l'action de MTA2. Cette hypothèse pourrait être testée par des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules infectées. Le laboratoire va poursuivre les investigations visant à comprendre le rôle de MTA2 dans la réplication virale.

GPD2 (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2) est une protéine localisée à la mitochondrie et impliquée dans le métabolisme du glycérol. Il semblerait que GPD2 joue un rôle dans la réponse immunitaire innée. En effet, en présence d'un stimulus (infection virale ou bactérienne, traitement LPS...) les macrophages vont être les premières cellules à être activées pour permettre la mise en place d'une réponse inflammatoire efficace. Toutefois, si le stimulus persiste les macrophages vont entrer dans une phase de tolérance durant laquelle la production de cytokine pro-inflammatoire va diminuer pour éviter les effets délétères d'une tempête cytokinique (Seeley and Ghosh, 2017). Il a été montré que cette reprogrammation des macrophages nécessite une diminution de l'oxydation du glucose régulée par GPD2 (Langston et al., 2019). Mis à part ce lien avec l'immunité innée, aucune étude n'a fait état de lien entre GPD2 et les infections virales. Si GPD2 joue un rôle dans la régulation de l'immunité nous pouvons faire l'hypothèse que cette protéine pourrait impacter de façon non spécifique toutes les infections virales.

b. Les candidats pro-viraux

Le crible a permis d'identifier et de valider 6 candidats jouant un rôle pro-viral lors de l'infection par ZIKV. Comme pour les candidats antiviraux, parmi les résultats nous avons retrouvé 3 ISGs attendu. D'une part, ISG15 et USP18 qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la voie IFN et ont donc, par conséquent, un effet pro-viral, et d'autre part, LY6E qui favorise l'internalisation des *Flavivirus* dans les cellules épithéliales U2OS (Hackett and Cherry, 2018 ; Malakhova et al., 2006 ; Kim et al., 2008). Les candidats pro-ZIKV identifiés lors de notre crible et validés par au moins une approche sont APOL3, NAPA et GBP3.

NAPA ou α -SNAP (*alpha –soluble NSF attachment protein*) interagit avec des complexes de protéines SNAREs (v-SNARE et t-SNARE) pour induire leurs désassemblages (Huang et al., 2019). Les protéines SNAREs appartiennent à une superfamille regroupant des protéines de fusion de membranes. Elles sont retrouvées notamment à la membrane plasmique, à l'appareil de Golgi ou encore sur différents types de vésicule. Elles sont impliquées dans différentes voies de recyclage et dans le trafic RE - appareil de Golgi (Jahn and Scheller, 2006). Par ailleurs, il a été mis en évidence que plusieurs virus détournent ces mécanismes de fusion pour favoriser leur réplication. L'enterovirus D68 (EV-D68) inhibe la protéine SNARE SNAP29 pour favoriser sa réplication en inhibant la fusion autophagosome - lysosome (Corona et al., 2018). Le virus de l'hépatite C agit sur les mêmes mécanismes cellulaires en inhibant la Syntaxin 17, une autre protéine SNARE impliquée dans la fusion autophagosome – lysosome (Ren et al., 2016). Le mécanisme de fusion via les protéines SNAREs semble également détourné par le virus de la rage pour permettre un relargage des particules virales néoformées (Yin et al., 2020). Au vu des interactions entre les complexes SNAREs et différents virus nous pouvons émettre l'hypothèse que NAPA exerce un rôle pro-viral lors de certaines infections via la régulation des complexes SNARE. A l'heure actuelle, la protéine NAPA n'est pas décrite comme étant induite par l'interféron. Il serait intéressant de tester si après traitement IFN α sur les HMC3 nous observons une augmentation de son niveau d'expression.

GBP3 (Guanylate-binding protein 3) permet de catalyser l'hydrolyse du GTP en GDP. Cette protéine ne possède aucun rôle pro-viral décrit dans la littérature. De façon surprenante par rapport à nos résultats, GBP3 inhibe l'infection des cellules humaines de poumon A549 par le virus influenza A H1N1 (Nordmann et al., 2012). Il se pourrait que l'activité pro-virale de GBP3 que nous observons soit alors spécifique de ZIKV ou du genre *Flavivirus*. Toutefois, en raison de sa faible expression dans les HMC3, l'inhibition de GBP3 dans les expériences de validation n'a pu être vérifiée. Pour valider son inhibition et son rôle pro-viral il serait donc nécessaire de réaliser les expériences de validation sur des lignées cellulaires expriment plus de GBP3 que les HMC3.

II. Etude du rôle des protéines APOL1 et APOL3 lors de l'infection par ZIKV

1. Rôle d'APOL1 et APOL3 dans les infections virales

Le rôle d'APOL1 et APOL3 dans les infections virales est très peu décrit. Ces protéines étant des ISGs, elles sont retrouvées dans certaines études menées sur un large panel d'ISGs mais très peu se sont focalisées sur leur fonction. Notre étude permet d'apporter des éléments nouveaux. Nous observons sur 2 modèles cellulaires différents que l'inhibition d'APOL1 comme d'APOL3 induit une diminution d'au moins 50 % de l'infection par ZIKV, WNV, DENV et VSV et démontrons que des virus non apparentés requièrent l'expression de ces 2 ISGs pour leur réplication. Cette observation est cohérente avec l'étude menée par Schoggins en 2011 montrant qu'une surexpression d'APOL1 aboutit à l'augmentation de l'infection de cellules Huh7 par YFV (Schoggins et al., 2011). Cependant cela est à nuancer avec une étude montrant qu'une surexpression d'APOL1 permet d'inhiber l'infection de monocytes par le VIH (Taylor et al., 2014). D'autre part, une étude publiée en 2019 observe une augmentation d'infection par ZIKV lors du traitement de Huh7.5 par un ARNi ciblant APOL1. Toutefois, de manière surprenante, cette étude montre des résultats contradictoires car une surexpression d'APOL1 favorise l'infection par ZIKV et DENV, laissant supposer un rôle pro-viral d'APOL1 (Yamane et al., 2019). Cette incohérence entre l'impact de la surexpression des APOLs et leur inhibition n'est pas discutée dans l'article.

Une des hypothèses pour expliquer ces différences est le fait que nous travaillons sur des cellules préalablement traitées à l'IFN α . En effet, nous remarquons très clairement que les effets des ARNi ciblant APOL1 et surtout ceux ciblant APOL3 sont bien moins marqués sans traitement IFN α dans les 2 modèles cellulaires. Dans les études citées ci-dessus, les expériences n'ont pas été réalisées dans ce contexte. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un co-facteur dont l'expression est stimulée par l'IFN α est nécessaire pour observer le phénotype induit par la surexpression ou l'inhibition d'APOL1 et APOL3. Néanmoins, nous observons pour ZIKV et WNV un effet pro-viral d'APOL1 sans traitement préalable. Par ailleurs, il serait intéressant de tester dans notre modèle d'extinction d'expression l'impact sur l'infection par le VIH, le papier de Taylor et al. étant surtout basé sur l'impact d'APOL1 après surexpression (Taylor et al., 2014).

De plus, nous n'avons pas démontré clairement si l'impact pro-viral d'APOL1 et d'APOL3 faisaient appel au même mécanisme. En effet, le fait que la lignée podocyte double KO APOL1/APOL3 ne possède pas un phénotype plus marqué que les lignées simples KO lors de l'infection par ZIKV semblent indiquer qu'APOL1 et APOL3 réguleraient cette infection via le même mécanisme (**Figure 29**). Cependant, nous

pouvons remarquer qu'APOL1 semble avoir un impact sur les événements de fusion ce qui n'est pas observé pour APOL3 (**Figure 33**). L'effet pro-viral d'APOL1 est également visible lors de l'infection des HMC3 par les virus ZIKV, WNV et VSV sans traitement préalable à l'IFN α , ce qui n'est pas le cas pour APOL3 (**Figure 34**). Ces derniers éléments nous font penser qu'APOL1 et APOL3 pourraient favoriser l'infection de différents virus via différents processus.

2. Validation du rôle des APOLs dans les lignées clonales podocytes KO

Nous avons cherché à valider le rôle des APOLs par une seconde technique d'extinction d'expression de gène. Pour ce faire nous avons utilisé des lignées de podocytes KO pour APOL1 ou APOL3 mises au point par nos collaborateurs via la technique CRISPR Cas9 (Uzureau et al., 2020). Cependant nous avons pu observer qu'entre 2 lignées clonales KO APOL3, le phénotype d'infection par ZIKV n'était pas conservé (**Figure 41**). Une seule lignée KO APOL1 a pu être testée et le phénotype est cohérent avec l'extinction par ARNi. Ces résultats n'ont été obtenus que tard dans le déroulement du projet de thèse et nous amènent à penser que les lignées podocytes KO pourraient présenter un dérèglement induisant l'inhibition exacerbée de l'infection par ZIKV et d'autre virus. Ce phénotype pourrait donc ne pas être en lien avec l'extinction de l'expression des APOLs. Toutefois, il est important de noter que si le modèle des lignées KO de podocyte est à réétudier du fait de cette dernière observation, les résultats obtenus grâce à l'extinction par ARNi dans les deux modèles cellulaires ne sont en aucun cas remis en question. Le phénotype observé lors de l'infection serait donc bien la conséquence de l'extinction d'expression des APOLs, cependant, celui-ci serait amplifié dans les lignées KO pour une raison encore inconnue. Dans la lignée KO APOL3 clone2, un dérèglement physiologie est peut-être présent induisant la perte de l'inhibition observée dans la lignée KO APOL3 et dans les modèles d'extinction par ARNi.

De plus, la validation du KO effectué dans ces lignées KO a été difficile à obtenir. En ce qui concerne APOL1, l'extinction de l'expression est visible par RT-qPCR et en western blot (**Figure 28A, 29C**). Pour la lignée KO APOL3 la technique de RT-qPCR ne nous a pas permis de voir une diminution de l'expression de l'ARNm d'APOL3. En effet, la mutation intégrée dans le gène ne semble pas déstabiliser l'ARNm produit. Par ailleurs, nous n'avons pu observer une diminution de l'expression d'APOL3 au niveau protéique par western blot car aucun anticorps commercial n'a permis une bonne détection de cette protéine. Pour la lignée KO APOL3 clone2 nous n'avons pas effectué les validations, il serait intéressant de quantifier le niveau d'expression par RT-qPCR et de voir si nous rencontrons le même problème que pour la lignée KO APOL3. Toutefois, ces trois lignées ont été séquencées par nos collaborateurs et ne permettent pas l'expression des protéines ciblées par le KO (**Annexe, Tableau 11**).

Nous avons cherché à démontrer que le phénotype observé dans les podocytes KO était bien dû à l'extinction de l'expression des APOLs. Nous avons tenté d'induire de nouveau l'expression de chaque APOL dans les lignées KO respectives par des expériences dites de « *rescue* » ou de « *add-back* ». Cependant nous nous sommes retrouvés confrontés à différents problèmes techniques. Tout d'abord les lignées de podocytes sont difficilement transfectables. Après de nombreuses tentatives et mises au point, l'efficacité de transfection est restée très faible et nous n'avons donc pas pu re-exprimer transitoirement les APOLs dans les lignées KO par transfection d'un plasmide. Nous avons donc cherché à établir des lignées permettant l'expression stable des APOLs dans les podocytes KO. Pour ce faire nous avons utilisé 2 techniques différentes. Tout d'abord nous avons transfecté les cellules KO avec un plasmide permettant l'expression de chaque APOL, puis nous avons sélectionné les cellules transfectées par traitement antibiotique. Nous avons également exprimé les APOL via la transduction de vecteurs lentiviraux dans les lignées KO en sélectionnant là encore par traitement antibiotique.

Bien qu'une sous-population de cellules étaient résistantes aux traitements antibiotiques, nous n'avons pas réussi à valider l'expression des APOLs dans ces deux systèmes, ni par RT-qPCR ni par western blot. Lors de cette étude nous nous sommes rendu compte que la surexpression des APOLs induisait la mort cellulaire, or ces techniques de restauration d'expression aboutissent souvent à la surexpression de la protéine d'intérêt. Il a précédemment été montré qu'une surexpression d'APOL1 pouvait effectivement induire la mort cellulaire dans différentes lignées (Wan et al., 2008). Il est possible que ce soit pour cette raison que nous n'avons pas réussi à restaurer l'expression des APOLs dans les lignées KO. Par ailleurs, surtout dans les lignées transduites, et ce même avec un plasmide contrôle, l'infection par ZIKV était très fortement diminuée en comparaison des cellules non transduites et il était donc très difficile de comparer les phénotypes d'infection avant et après restauration de l'expression des APOLs. Nous pourrions imaginer d'autres techniques nous permettant d'exprimer plus faiblement les APOLs. En effet, des plasmides permettant l'expression des APOLs de manière inducible suite à un traitement, pourrait permettre une expression faible de la protéine d'intérêt.

Cette validation est indispensable pour nous permettre d'utiliser tous les résultats obtenus sur les lignées podocytes. En effet, si nous réussissons à exprimer à nouveau les APOLs dans ces lignées nous pourrions vérifier si cela suffit à restaurer l'infection par ZIKV et les autres virus. Si c'est ce que nous observons, nous pourrions affirmer que le phénotype observé est bien dû aux APOLs et non à un dérèglement cellulaire artefactuel.

3. Autres validations envisagées

Il serait très intéressant de tester si APOL1 et APOL3 favorisent la réplication virale dans des cellules primaires, en présence ou non d'IFN. Une telle expérience permettrait de vérifier le rôle d'APOLs dans un contexte plus physiologique. Puisqu'il a été montré que les progéniteurs neuronaux humain étaient sensibles à l'infection par ZIKV (Tang et al., 2016), nous pourrions réaliser cette expérience sur ce type cellulaire. Une collaboration avec l'équipe de Muriel Couplier (INRA, Ecole Vétérinaire de Maison Alfort) est en cours afin de réaliser ces expériences.

Nous avons essayé de mettre au point des lignées KO CRISPR Cas9 dans les cellules HMC3. Nous avons transduit les HMC3 avec des vecteurs lentiviraux permettant l'expression d'ARNg (ARN guide ciblant les APOLs) et de l'enzyme Cas9. Cependant, après sélection, le niveau d'expression des APOLs reste élevé. Or, nous souhaitons éviter de faire une sélection clonale qui pourrait nous amener aux mêmes limitations que celles observées pour les lignées de podocytes. Nous envisageons de renouveler l'expérience avec une nouvelle technique de KO par CRISPR Cas9 permettant une efficacité plus importante. Cette méthode est basée sur la transfection d'un complexe d'une ribonucléoprotéine permettant l'expression directe de la Cas9 et des ARNg (Santos et al., 2020). Avec cette technique, la sélection de cellules transfectées n'est pas possible, toutefois, les HMC3 étant des cellules facilement transfectables, nous pouvons imaginer que cette méthode fonctionnerait.

Si nous parvenons à obtenir des HMC3 KO pour APOL1 et APOL3, nous réaliserons les expériences de restauration d'expression mentionnées plus haut. Les restaurations seront effectuées avec des plasmides exprimant les protéines APOL1 et APOL3 dans leurs intégralités et également avec des plasmides exprimant des formes tronquées. Ces expériences nous aideraient à comprendre quels sont les domaines protéiques d'APOL1 et APOL3 qui sont potentiellement responsables de leur activité provirale. Nous envisageons également de travailler des cellules HAP-1, qui sont des cellules haploïdes couramment utilisés pour générer des cellules KO par la technique CRISPR Cas9.

4. APOL1 et 3 n'impactent pas l'infection par ZIKV via le métabolisme lipidique

Certains virus à ARN, dont les *Enterovirus*, ont besoin du phospholipide PI(4)P pour une réplication efficace (Hsu et al., 2010 ; Arita et al., 2011 ; Berger et al., 2011). Or les APOL1 et 3 jouent un rôle dans la régulation de la production de ce phospholipide via une interaction avec la kinase PI4KB (Uzureau et al., 2020). Nous avons cherché à savoir si l'impact de ces 2 APOLs sur l'infection par ZIKV pouvait être lié à ce mécanisme. Ainsi nous avons montré qu'un inhibiteur de la PI4KB permettait de diminuer

drastiquement l'infection par un *Enterovirus* (CVB3) mais pas celles des *Flavivirus* ZIKV et WNV (**Figure 36**). Cette expérience nous permet d'affirmer que l'inhibition de l'infection par les APOLs n'est pas médiée par l'inhibition de la production de PI(4)P. Le rôle pro-viral des APOLs n'est donc pas lié à leur activité de régulation du métabolisme lipidique.

5. Régulation potentielle des voies IFN par les APOL1 et 3

Du fait de l'impact des APOL1 et APOL3 sur des virus non apparentés, nous avons émis l'hypothèse que les APOLs pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'expression des ISGs. Ayant une activité pro-virale, ils pourraient être des régulateurs négatifs des voies IFN. Ce rétrocontrôle pourrait agir à différents niveaux des voies avec une action possible directement sur la sécrétion d'IFN et donc réguler une des voies décrites en **figure 10**. Il serait également envisageable que les APOLs n'influencent pas la production d'IFN mais agissent sur l'induction des ISGs via la voie JAK-STAT (**Figure 11**).

Les expériences que nous avons réalisées au cours de notre étude montrent une claire induction des ISGs dans les lignées podocytes KO (**Figure 37**). Nous n'observons cependant pas dans ces lignées une augmentation d'induction d'IFN-I (**Figure 38**). Cela signifierait qu'APOL 1 et 3 jouent un rôle de régulateur négatif de la voie JAK-STAT en aval de la production d'IFN-I. Toutefois nous pouvons nous demander si cette observation n'est pas simplement due à un dérèglement des lignées clonales comme expliqué plus tôt.

Cette observation n'a pas été entièrement validée dans le modèle d'extinction par ARNi. En effet, l'augmentation significative du niveau d'expressions de certains ISGs est visible dans le HMC3 ayant reçu les ARNi mais pas dans les podocytes. Cette observation est surprenante du fait de l'observation d'un phénotype similaire lors de l'infection par ZIKV dans ces 2 lignées cellulaires. Cela peut être dû au fait que le niveau basal d'expression de APOL1 et 3 dans les podocytes est environ 10 fois plus important dans les podocytes que dans les HMC3, ainsi une inhibition par ARNi n'est peut-être pas suffisante pour observer le phénotype attendu (**Figure 26**).

Par ailleurs, la sécrétion d'IFN-I a été analysée seulement dans les lignées KO. Il serait intéressant d'analyser celle-ci dans les HMC3 et podocyte WT ayant reçu les ARNi. Il serait également important de tester des méthodes permettant une détection plus fine de la sécrétion d'IFN-I que celle que nous avons utilisée au cours de l'étude. Le traitement des cellules Sting37 avec les différents surnageants semble cependant pouvoir détecter une sécrétion d'IFN-I équivalente à un traitement de faible dose (5 U/ml) (**Figure 38**). Le recours à un dosage SIMOA (*Single Molecular Assay*) pourrait être une solution de détection plus fine. Cette technique est basée sur la détection de molécules par immunoessais comme un test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Cependant, il permet la quantification

d'IFN α de l'ordre du fg/ml (Wu et al., 2015). La localisation d'APOL1 et APOL3 au Golgi (**Figure 35A**) est consistante avec un rôle possible sur la sécrétion de nombreuses protéines, y compris les IFNs.

Pour étudier de façon plus approfondie le potentiel effet des APOL1 et 3 sur la voie JAK-STAT et afin de discriminer quelle voie serait impactée par les APOLs, il serait intéressant d'analyser les niveaux de phosphorylation des différents acteurs des voies IFN-I (IRF3, IRF7, JAK1, STAT1, STAT2 et IRF9). En effet, comme pour USP18, il est très courant pour des régulateurs de voies de signalisation d'agir sur ces niveaux de phosphorylation pour moduler l'activation de la voie (Malakhova et al., 2006).

6. Régulation de l'autophagie par APOL1

Une hypothèse que nous n'avons pas eu le temps d'explorer ici et le potentiel rôle des APOLs sur les mécanismes d'autophagie. En effet, il a été décrit que la surexpression d'APOL1 pouvait être à l'origine de la mort cellulaire dans plusieurs lignées via l'induction de l'autophagie. APOL1 possède un unique domaine BH3 qui est à l'origine de cette induction (Wan et al., 2008 ; Bhardwaj et al., 2017). Il n'est pas décrit à l'heure actuelle si APOL3 possède également ce domaine. Lors de la surexpression d'APOL1 dans les HMC3, nous avons pu observer par immunofluorescence des structures particulières en forme de vésicules (**Figure 35**). Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces structures sont des autophagosomes associés à APOL1. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions réaliser un marquage avec un marqueur d'autophagosome comme LC3 et observer par immunofluorescence s'il y a colocalisation entre d'APOL1-GFP et LC3.

Par ailleurs, il est largement décrit que de nombreux virus, dont ZIKV, détournent le mécanisme d'autophagie pour favoriser leur réplication. En effet, l'autophagie joue un rôle très important dans le contrôle de certaines infections virales, cependant plusieurs virus ont trouvés un moyen de contourner ce mécanisme. Parmi ces virus, on retrouve CVB3 qui utilise les autophagosomes comme plateforme de réplication (Wong et al., 2008 ; Shi et al., 2016). Le détournement de ce mécanisme est également établi pour d'autres *Picornaviridae*, comme le virus à l'origine du syndrome pied-main-bouche (Berryman et al., 2012). Il a également été montré que l'autophagie est nécessaire à la réplication du virus influenza A (A/WSN/33) dans la lignée cellulaire MDCK (Zhou et al., 2009). De plus, pour les *Flavivirus*, l'autophagie permet de favoriser la réplication virale, comme cela a pu être montré pour DENV-3 dans des cellules HepG2 ou pour JEV dans des neuroblastes de souris N2a (Khakpoor et al., 2009 ; Jin et al., 2013). Il a également été montré que l'autophagie jouait un rôle pro-viral dans l'infection par ZIKV (Liang et al., 2016 ; Cao et al., 2017). Cependant, ce processus cellulaire ne semble pas indispensable pour WNV. En effet, l'inhibition de l'autophagie dans des cellules BHK, HEK-293T ou des fibroblastes embryonnaires murins n'induit pas de diminution d'infection par WNV (Beatman et

al., 2012 ; Vandergaast and Fredericksen, 2012), au contraire, l'autophagie semble inhiber la réplication de ce virus (Kobayashi et al., 2014).

Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'inhibition de l'expression des APOLs aboutirait à la diminution du phénomène d'autophagie. Puisque ZIKV nécessite ce mécanisme pour une réplication optimale (Liang et al., 2016), une diminution de l'infection serait attendue. Pour vérifier cette hypothèse nous pourrions imaginer de comparer l'infection par ZIKV de HMC3 transfectées avec les ARNi ciblant les APOLs et traitées ou non avec un activateur de l'autophagie (par exemple de l'hydroxichloroquine). En effet, si cette hypothèse est juste, alors une drogue permettant l'induction d'autophagie devrait rétablir le niveau d'infection même en présence des ARNi APOL1. Toutefois, le fait que l'autophagie ne joue pas un rôle pro-viral pour WNV (Vandergaast and Fredericksen, 2012), alors que sa réplication est dépendante d'APOL1 (**Figure 34**), rend cette hypothèse peu probable.

7. Autres approches pour comprendre les fonctions pro-virales d'APOL1 et APOL3

Le traitement IFN α est nécessaire pour observer une diminution d'infection par ZIKV des HMC3 lors de l'inhibition d'APOL3 et permet l'amplification du phénotype observé lors de l'inhibition d'APOL1 (**Figure 27C**). Dans les podocytes, où le niveau d'expression d'APOL1 et APOL3 est élevé (**Figure 26**), un traitement IFN α est également requis pour observer le rôle pro-viral de ces 2 protéines (**Figure 27D**). Ces données laissent supposer que la fonction pro-virale d'APOL1 et APOL3 est dépendante d'un ou plusieurs cofacteurs dont l'activité et/ou l'expression sont stimulées par le traitement IFN α . Un crible double-hybride mené chez la levure a permis d'identifier des protéines interagissant avec APOL1 et APOL3 (Uzureau et al., 2020). Cependant, cette approche ne représente pas un modèle physiologique pour l'étude des interactions protéiques. Nous souhaitons réaliser des immuno-précipitations d'APOL1 et APOL3 dans des cellules traitées ou non à l'IFN α puis réaliser une analyse de spectrométrie de masse. Cela nous permettrait d'identifier les partenaires des 2 protéines dans les conditions traitées ou non à l'IFN α . Nous pourrions réaliser cette expérience dans les HMC3 ainsi que dans les podocytes.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Le crible à haut débit réalisé dans cette étude nous a permis d’approfondir les connaissances sur la réponse immunitaire innée mise en place lors de l’infection par ZIKV. Malgré certaines limites dans la conception de la banque, dûes notamment à son élaboration dans un autre modèle cellulaire, la réalisation du crible dans un contexte de cellules traitées à l’IFN α , nous a permis d’identifier des gènes dont les propriétés modulatrices de la réplication de ZIKV n’étaient pas encore décrites.

Suite aux expériences de validation, nous avons confirmé le rôle des protéines MTA2 et GPD2 comme acteurs antiviraux dans la lignée HMC3 lors de l’infection par ZIKV. Ces deux protéines n’ont, à l’heure actuelle, aucun rôle antiviral décrit. Nous avons également identifié trois candidats jouant un rôle pro-viral lors de l’infection : APOL3, GBP3 et NAPA. Là encore, leur rôle dans la mise en place de la réponse immunitaire innée devra être établi. Ce projet apporte des perspectives de recherche sur les différents candidats validés. En effet, il serait intéressant d’étudier l’impact de ces candidats sur d’autres virus et dans d’autres modèles cellulaires. Ces expériences ont été réalisées sur MTA2 et les résultats semblent très encourageants. Nous avons démarré une collaboration pour tester l’effet de l’extinction de l’expression des 21 candidats issus du crible sur la réplication du HCV dans des cellules Huh7. Nous pouvons imaginer que les mêmes candidats seront validés, toutefois si certains sont spécifiques de ZIKV ou HCV nous pourrions le mettre en évidence lors de ces expériences. Nous envisageons également de tester les effets de certains candidats sur d’autres virus émergents, notamment le SARS-CoV-2.

Le rôle d’APOL1 et APOL3 a été étudié plus en détail lors de ce travail. Nous pouvons affirmer que ces 2 protéines exercent une activité provirale à large spectre. Au vu des différentes expériences menées, nous pouvons affirmer que le rôle pro-viral de ces deux protéines n’est pas lié à leur implication dans le métabolisme lipidique ni dans la production de PI(4)P. Il est toutefois envisageable qu’elles permettent la régulation de la production de certains ISGs. En effet, l’inhibition d’APOL1 comme APOL3 permet l’induction de certains ISGs dans la lignée HMC3 et les lignées podocytes KO. Pour finir, nous n’avons pas investigué le lien entre autophagie et APOLs. Or celui-ci ayant été mis en évidence pour APOL1, il est possible que cela soit lié à l’effet pro-viral observé pour ces protéines. Les mécanismes moléculaires à l’origine de l’activité provirale de ces 2 APOLs restent à approfondir.

Annexes

Annexes

Nom	Gène ID	Description
ABCD1	215	ATP binding cassette subfamily D member 1
ABI3	51225	ABI family member 3
ADAR	103	adenosine deaminase, RNA specific
ADGRG5	221188	adhesion G protein-coupled receptor G5
AEN	64782	apoptosis enhancing nuclease
AGRN	375790	agrin
AIM2	9447	absent in melanoma 2
AKAP7	9465	A-kinase anchoring protein 7
AMER1	139285	APC membrane recruitment protein 1
ANKFY1	51479	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1
ANKIB1	54467	ankyrin repeat and IBR domain containing 1
APOBEC3G	60489	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G
APOBEC3H	164668	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3H
APOL2	23780	apolipoprotein L2
APOL3	80833	apolipoprotein L3
APOL6	80830	apolipoprotein L6
ARHGAP17	55114	Rho GTPase activating protein 17
ARHGEF12	23365	Rho guanine nucleotide exchange factor 12
ARHGEF18	23370	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 18
ATP6V1H	51606	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit H
ATP8B4	79895	ATPase phospholipid transporting 8B4 (putative)
ATRIP	84126	ATR interacting protein
AZI2	64343	5-azacytidine induced 2
B2M	567	beta-2-microglobulin
B3GNT2	10678	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2
B4GALT5	9334	beta-1,4-galactosyltransferase 5
BAX	581	BCL2 associated X, apoptosis regulator
BCL2L14	79370	BCL2 like 14
BLZF1	8548	basic leucine zipper nuclear factor 1
BRD2	6046	bromodomain containing 2
BRPF1	7862	bromodomain and PHD finger containing 1
BST2	684	bone marrow stromal cell antigen 2
BTG2	7832	BTG anti-proliferation factor 2
BTG3	10950	BTG anti-proliferation factor 3
C15orf39	56905	chromosome 15 open reading frame 39
C19orf66	55337	chromosome 19 open reading frame 66
C1R	715	complement C1r
C1RL	51279	complement C1r subcomponent like
C21orf91	54149	chromosome 21 open reading frame 91
C22orf39	128977	chromosome 22 open reading frame 39
C2orf66	401027	chromosome 2 open reading frame 66
C3AR1	719	complement C3a receptor 1
C5orf56	441108	chromosome 5 open reading frame 56
CAPN2	824	calpain 2
CARMIL3	90668	capping protein regulator and myosin 1 linker 3
CARS	833	cysteinyl-tRNA synthetase
CASP10	843	caspase 10
CASP7	840	caspase 7

CCDC73	493860	coiled-coil domain containing 73
CCL3L1	6349	C-C motif chemokine ligand 3 like 1
CCL3L3	414062	C-C motif chemokine ligand 3 like 3
CCL4	6351	C-C motif chemokine ligand 4
CCL4L1	388372	C-C motif chemokine ligand 4 like 1
CCL4L2	9560	C-C motif chemokine ligand 4 like 2
CCL5	6352	C-C motif chemokine ligand 5
CCND3	896	cyclin D3
CCR1	1230	C-C motif chemokine receptor 1
CD48	962	CD48 molecule
CD59	966	CD59 molecule (CD59 blood group)
CEACAM1	634	carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1
CENPP	401541	centromere protein P
CHMP5	51510	charged multivesicular body protein 5
CHST12	55501	carbohydrate sulfotransferase 12
CLSTN1	22883	calsyntenin 1
CMPK2	129607	cytidine/uridine monophosphate kinase 2
CMTR1	23070	cap methyltransferase 1
CNP	1267	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
CREM	1390	cAMP responsive element modulator
CSAG3	389903	CSAG family member 3
CSF1	1435	colony stimulating factor 1
CSNK1G1	53944	casein kinase 1 gamma 1
CTSC	1075	cathepsin C
CTSW	1521	cathepsin W
CXCL10	3627	C-X-C motif chemokine ligand 10
CXCL11	6373	C-X-C motif chemokine ligand 11
CXCR3	2833	C-X-C motif chemokine receptor 3
CXXC1	30827	CXXC finger protein 1
CYP2J2	1573	cytochrome P450 family 2 subfamily J member 2
DBF4B	80174	DBF4 zinc finger B
DCBLD1	285761	discoidin, CUB and LCCL domain containing 1
DCTN4	51164	dynactin subunit 4
DDIAS	220042	DNA damage induced apoptosis suppressor
DDX58	23586	DExD/H-box helicase 58
DDX60	55601	DExD/H-box helicase 60
DDX60L	91351	DExD/H-box 60 like
DGLUCY	80017	D-glutamate cyclase
DHX58	79132	DExH-box helicase 58
DLG3	1741	discs large MAGUK scaffold protein 3
DNPEP	23549	aspartyl aminopeptidase
DRAP1	10589	DR1 associated protein 1
DTX3L	151636	deltex E3 ubiquitin ligase 3L
DUS2	54920	dihydrouridine synthase 2
DYNLT1	6993	dynein light chain Tctex-type 1
E2F1	1869	E2F transcription factor 1
EAF1	85403	ELL associated factor 1
EIF2AK2	5610	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2
EIF4E3	317649	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3
ELF4	2000	E74 like ETS transcription factor 4
ELMO2	63916	engulfment and cell motility 2
ENDOD1	23052	endonuclease domain containing 1
EOMES	8320	eomesodermin
EPST11	94240	epithelial stromal interaction 1
ERI1	90459	exoribonuclease 1

ERVK-7	449619	endogenous retrovirus group K member 7
FAM46A	55603	family with sequence similarity 46 member A
FAM46C	54855	family with sequence similarity 46 member C
FAS	355	Fas cell surface death receptor
FASLG	356	Fas ligand
FBXO39	162517	F-box protein 39
FBXO6	26270	F-box protein 6
FLAD1	80308	flavin adenine dinucleotide synthetase 1
GAK	2580	cyclin G associated kinase
GALM	130589	galactose mutarotase
GBP1	2633	guanylate binding protein 1
GBP1P1	400759	guanylate binding protein 1 pseudogene 1
GBP3	2635	guanylate binding protein 3
GBP4	115361	guanylate binding protein 4
GBP5	115362	guanylate binding protein 5
GCH1	2643	GTP cyclohydrolase 1
GCNT1	2650	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2
GMPR	2766	guanosine monophosphate reductase
GNGT2	2793	G protein subunit gamma transducin 2
GPD2	2820	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2
GTPBP1	9567	GTP binding protein 1
GTPBP2	54676	GTP binding protein 2
GZMA	3001	granzyme A
GZMB	3002	granzyme B
HEATR9	256957	HEAT repeat containing 9
HELB	92797	DNA helicase B
HELZ2	85441	helicase with zinc finger 2
HERC5	51191	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5
HERC6	55008	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6
HIRA	7290	histone cell cycle regulator
HIST1H4A	8359	histone cluster 1 H4 family member a
HIST1H4B	8366	histone cluster 1 H4 family member b
HIST1H4C	8364	histone cluster 1 H4 family member c
HIST1H4D	8360	histone cluster 1 H4 family member d
HIST1H4E	8367	histone cluster 1 H4 family member e
HIST1H4F	8361	histone cluster 1 H4 family member f
HIST1H4H	8365	histone cluster 1 H4 family member h
HIST1H4I	8294	histone cluster 1 H4 family member i
HIST1H4J	8363	histone cluster 1 H4 family member j
HIST1H4K	8362	histone cluster 1 H4 family member k
HIST1H4L	8368	histone cluster 1 H4 family member l
HIST2H4A	8370	histone cluster 2 H4 family member a
HIST2H4B	554313	histone cluster 2 H4 family member b
HIST4H4	121504	histone cluster 4 H4
HLA-DOB	3112	major histocompatibility complex, class II, DO beta
HOXB3	3213	homeobox B3
HSH2D	84941	hematopoietic SH2 domain containing
IFI16	3428	interferon gamma inducible protein 16
IFI27	3429	interferon alpha inducible protein 27
IFI35	3430	interferon induced protein 35
IFI44	10561	interferon induced protein 44
IFI44L	10964	interferon induced protein 44 like
IFI6	2537	interferon alpha inducible protein 6
IFIH1	64135	interferon induced with helicase C domain 1
IFIT1	3434	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1

IFIT2	3433	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2
IFIT3	3437	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3
IFIT5	24138	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5
IFITM1	8519	interferon induced transmembrane protein 1
IFITM3	10410	interferon induced transmembrane protein 3
IFITM4P	340198	interferon induced transmembrane protein 4 pseudogene
IFNAR1	3454	interferon alpha and beta receptor subunit 1
IFNAR2	3455	interferon alpha and beta receptor subunit 2
IFNG	3458	interferon gamma
IKZF3	22806	IKAROS family zinc finger 3
IL10RA	3587	interleukin 10 receptor subunit alpha
IL12RB2	3595	interleukin 12 receptor subunit beta 2
IL15RA	3601	interleukin 15 receptor subunit alpha
IL18RAP	8807	interleukin 18 receptor accessory protein
INPP4A	3631	inositol polyphosphate-4-phosphatase type I A
IRF1	3659	interferon regulatory factor 1
IRF2	3660	interferon regulatory factor 2
IRF7	3665	interferon regulatory factor 7
IRF9	10379	interferon regulatory factor 9
ISG15	9636	ISG15 ubiquitin-like modifier
ISG20	3669	interferon stimulated exonuclease gene 20
ITGA1	3672	integrin subunit alpha 1
ITGB7	3695	integrin subunit beta 7
ITPR1	3708	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1
KAT2A	2648	lysine acetyltransferase 2A
KDEL1	79070	KDEL motif containing 1
KDEL2	143888	KDEL motif containing 2
KLHDC7B	113730	kelch domain containing 7B
KSR1	8844	kinase suppressor of ras 1
LAMP3	27074	lysosomal associated membrane protein 3
LAP3	51056	leucine aminopeptidase 3
LGALS3BP	3959	galectin 3 binding protein
LIN52	91750	lin-52 DREAM MuvB core complex component
LIN54	132660	lin-54 DREAM MuvB core complex component
LINC00487	400941	long intergenic non-protein coding RNA 487
LINC00996	285972	long intergenic non-protein coding RNA 996
LINC01094	10050570 2	long intergenic non-protein coding RNA 1094
LRRC34	151827	leucine rich repeat containing 34
LY6E	4061	lymphocyte antigen 6 family member E
LY6E-DT	10013366 9	LY6E divergent transcript
LYRM1	57149	LYR motif containing 1
MASTL	84930	microtubule associated serine/threonine kinase like
MCOLN1	57192	mucolipin 1
MCOLN2	255231	mucolipin 2
MDM2	4193	MDM2 proto-oncogene
MICB	4277	MHC class I polypeptide-related sequence B
MILR1	284021	mast cell immunoglobulin like receptor 1
MLKL	197259	mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MMP25-AS1	10050741 9	MMP25 antisense RNA 1
MOV10	4343	Mov10 RISC complex RNA helicase
MR1	3140	major histocompatibility complex, class I-related
MT1E	4493	metallothionein 1E

MT1F	4494	metallothionein 1F
MT1G	4495	metallothionein 1G
MT2A	4502	metallothionein 2A
MTA2	9219	metastasis associated 1 family member 2
MTVR2	246754	mouse mammary tumor virus receptor homolog 2
MVB12A	93343	multivesicular body subunit 12A
MVB12B	89853	multivesicular body subunit 12B
MX1	4599	MX dynamin like GTPase 1
MX2	4600	MX dynamin like GTPase 2
MYD88	4615	myeloid differentiation primary response 88
N4BP1	9683	NEDD4 binding protein 1
NADK	65220	NAD kinase
NAPA	8775	NSF attachment protein alpha
NBN	4683	nibrin
NECAP1	25977	NECAP endocytosis associated 1
NEXN	91624	nexilin F-actin binding protein
NFIL3	4783	nuclear factor, interleukin 3 regulated
NKG7	4818	natural killer cell granule protein 7
NMI	9111	N-myc and STAT interactor
NOD1	10392	nucleotide binding oligomerization domain containing 1
NT5C3A	51251	5'-nucleotidase, cytosolic IIIA
NUB1	51667	negative regulator of ubiquitin like proteins 1
OAS1	4938	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1
OAS2	4939	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2
OAS3	4940	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3
OASL	8638	2'-5'-oligoadenylate synthetase like
ODF3B	440836	outer dense fiber of sperm tails 3B
OGFR	11054	opioid growth factor receptor
OR52N4	390072	olfactory receptor family 52 subfamily N member 4 (gene/pseudogene)
OR56B1	387748	olfactory receptor family 56 subfamily B member 1
OTOF	9381	otoferlin
PARP10	84875	poly(ADP-ribose) polymerase family member 10
PARP11	57097	poly(ADP-ribose) polymerase family member 11
PARP12	64761	poly(ADP-ribose) polymerase family member 12
PARP14	54625	poly(ADP-ribose) polymerase family member 14
PARP8	79668	poly(ADP-ribose) polymerase family member 8
PARP9	83666	poly(ADP-ribose) polymerase family member 9
PCNA	5111	proliferating cell nuclear antigen
PELO	53918	pelota mRNA surveillance and ribosome rescue factor
PGAP1	80055	post-GPI attachment to proteins 1
PHF11	51131	PHD finger protein 11
PI4K2B	55300	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta
PIK3R5	23533	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5
PIP4K2C	79837	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type 2 gamma
PLSCR1	5359	phospholipid scramblase 1
PML	5371	promyelocytic leukemia
PNPT1	87178	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1
POLH	5429	DNA polymerase eta
PPCDC	60490	phosphopantothienoylcysteine decarboxylase
PPM1K	152926	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1K
PPP3CC	5533	protein phosphatase 3 catalytic subunit gamma
PRF1	5551	perforin 1
PRKD2	25865	protein kinase D2
PRPS2	5634	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2
PRRG4	79056	proline rich and Gla domain 4

PSD3	23362	pleckstrin and Sec7 domain containing 3
PSMB8	5696	proteasome subunit beta 8
PSMB8-AS1	100507463	PSMB8 antisense RNA 1 (head to head)
PSMB9	5698	proteasome subunit beta 9
PSME2	5721	proteasome activator subunit 2
PTGIS	5740	prostaglandin I2 synthase
PXK	54899	PX domain containing serine/threonine kinase like
RAB29	8934	RAB29, member RAS oncogene family
RAD9A	5883	RAD9 checkpoint clamp component A
RBM11	54033	RNA binding motif protein 11
REC8	9985	REC8 meiotic recombination protein
RELL1	768211	RELT like 1
RFK	55312	riboflavin kinase
RGS14	10636	regulator of G protein signaling 14
RGS6	9628	regulator of G protein signaling 6
RHEBL1	121268	RHEB like 1
RMC1	29919	regulator of MON1-CCZ1
RNF114	55905	ring finger protein 114
RNF19B	127544	ring finger protein 19B
RNF31	55072	ring finger protein 31
RPL26L1	51121	ribosomal protein L26 like 1
RPS6KC1	26750	ribosomal protein S6 kinase C1
RSAD2	91543	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
RTCB	51493	RNA 2',3'-cyclic phosphate and 5'-OH ligase
RTP4	64108	receptor transporter protein 4
RUBCN	9711	RUN and cysteine rich domain containing beclin 1 interacting protein
RUFY4	285180	RUN and FYVE domain containing 4
RUNX3	864	runt related transcription factor 3
SAMD9	54809	sterile alpha motif domain containing 9
SAMD9L	219285	sterile alpha motif domain containing 9 like
SAMHD1	25939	SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1
SAP30BP	29115	SAP30 binding protein
SCARB2	950	scavenger receptor class B member 2
SCO2	9997	SCO2, cytochrome c oxidase assembly protein
SEMA4A	64218	semaphorin 4A
SEPSECS-AS1	285540	SEPSECS antisense RNA 1 (head to head)
SERPIN9	5272	serpin family B member 9
SHC4	399694	SHC adaptor protein 4
SIDT1	54847	SID1 transmembrane family member 1
SLA2	84174	Src like adaptor 2
SLAMF7	57823	SLAM family member 7
SLC25A28	81894	solute carrier family 25 member 28
SLC35A4	113829	solute carrier family 35 member A4
SLFN12L	100506736	schlafen family member 12 like
SMARCA5	8467	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5
SMCHD1	23347	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1
SMCR8	140775	Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 8
SMG7	9887	SMG7, nonsense mediated mRNA decay factor
SMTNL1	219537	smoothelin like 1
SOAT2	8435	sterol O-acyltransferase 2

SP100	6672	SP100 nuclear antigen
SP110	3431	SP110 nuclear body protein
SP140	11262	SP140 nuclear body protein
SPAG6	9576	sperm associated antigen 6
SPATA2	9825	spermatogenesis associated 2
ST3GAL1	6482	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1
STAP1	26228	signal transducing adaptor family member 1
STAT1	6772	signal transducer and activator of transcription 1
STAT2	6773	signal transducer and activator of transcription 2
STIL	6491	STIL, centriolar assembly protein
STRN4	29888	striatin 4
SUSD3	203328	sushi domain containing 3
SYTL3	94120	synaptotagmin like 3
TANK	10010	TRAF family member associated NFKB activator
TAP1	6890	transporter 1, ATP binding cassette subfamily B member
TAP2	6891	transporter 2, ATP binding cassette subfamily B member
TARS2	80222	threonyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial
TBK1	29110	TANK binding kinase 1
TBKBP1	9755	TBK1 binding protein 1
TBX21	30009	T-box 21
TESC	54997	tescalcin
TIMD4	91937	T cell immunoglobulin and mucin domain containing 4
TLR7	51284	toll like receptor 7
TM6SF1	53346	transmembrane 6 superfamily member 1
TMEM140	55281	transmembrane protein 140
TMEM62	80021	transmembrane protein 62
TMPRSS13	84000	transmembrane serine protease 13
TNFSF10	8743	TNF superfamily member 10
TNFSF13B	10673	TNF superfamily member 13b
TOP1	7150	DNA topoisomerase I
TRAFD1	10906	TRAF-type zinc finger domain containing 1
TRANK1	9881	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1
TREX1	11277	three prime repair exonuclease 1
TRIM14	9830	tripartite motif containing 14
TRIM21	6737	tripartite motif containing 21
TRIM22	10346	tripartite motif containing 22
TRIM25	7706	tripartite motif containing 25
TRIM26	7726	tripartite motif containing 26
TRIM38	10475	tripartite motif containing 38
TRIM5	85363	tripartite motif containing 5
TRIM56	81844	tripartite motif containing 56
TRIM69	140691	tripartite motif containing 69
TTC38	55020	tetratricopeptide repeat domain 38
TYMP	1890	thymidine phosphorylase
UBA7	7318	ubiquitin like modifier activating enzyme 7
UBE2L6	9246	ubiquitin conjugating enzyme E2 L6
UBXN10	127733	UBX domain protein 10
UNC93B1	81622	unc-93 homolog B1, TLR signaling regulator
USP11	8237	ubiquitin specific peptidase 11
USP15	9958	ubiquitin specific peptidase 15
USP18	11274	ubiquitin specific peptidase 18
USP30-AS1	10013173 3	USP30 antisense RNA 1
VPS37B	79720	VPS37B, ESCRT-I subunit
WARS	7453	tryptophanyl-tRNA synthetase

WDR63	126820	WD repeat domain 63
WHAMM	123720	WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules
WIP1	55062	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
WWC3	55841	WWC family member 3
XAF1	54739	XIAP associated factor 1
XCL1	6375	X-C motif chemokine ligand 1
XCL2	6846	X-C motif chemokine ligand 2
XPC	7508	XPC complex subunit, DNA damage recognition and repair factor
XRN1	54464	5'-3' exoribonuclease 1
ZBP1	81030	Z-DNA binding protein 1
ZBTB39	9880	zinc finger and BTB domain containing 39
ZCCHC2	54877	zinc finger CCHC-type containing 2
ZFYVE26	23503	zinc finger FYVE-type containing 26
ZNF267	10308	zinc finger protein 267
ZNF282	8427	zinc finger protein 282
ZNF367	195828	zinc finger protein 367
ZNF689	115509	zinc finger protein 689
ZNF79	7633	zinc finger protein 79
ZNFX1	57169	zinc finger NFX1-type containing 1

Tableau 9. Liste des gènes présents dans la banque d'ARNi. Cette liste détaille le nom le plus couramment utilisé pour chaque gène ainsi que son numéro d'identification et une courte description.

Nom du gène ciblé	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
ZIKV NS5	ZIKV_sens	AARTACACATACCARAACAAAGTGGT
	ZIKV_antisens	TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG
GAPDH	GAPDH_sens	GGTCGGAGTCAACGGATTTG
	GAPDH_antisens	ACTCCACGACGTAAGTCTCAGCG
RIG-I	RIG-I_sens	AGAGCACTTGTGGACGCTTT
	RIG-I_antisens	TGCAATGTCAATGCCTTCAT
ISG56	ISG56_sens	GGACAGGAAGCTGAAGGAG
	ISG56_antisens	AGTGGGTGTTTCTGCAA
Viperin	Viperin_sens	TGCAACTACAAATGCGGCTT
	Viperin_antisens	TTGATCTTCTCCATACCAGCTTCC
IFITM3	IFITM3_sens	CCGTGAAGTCTAGGGACAGG
	IFITM3_antisens	AGTGATGCCTCCTGATCTATCC
IFI6	IFI6_sens	CCTCCAAGGTCTAGTGACGG
	IFI6_antisens	TTTCTTACCTGCCTCCACCC
IFNAR1	IFNAR1_sens	TTCCACATCACAGTATCTACCC
	IFNAR1_antisens	TGCAAATTCAGCAGAAGCTA
IRF9	IRF9_sens	GGGAGCAGTCCATTAGACA
	IRF9_antisens	CAGCAGTGAGTAGTCTGGCT
MTA2	MTA2_sens	ATCATTACCAGCCACCCA
	MTA2_antisens	CGATTATCAGATTCTCCCTC
PXK	PXK_sens	CATTACCTCCACCTCTCCA
	PXK_antisens	GATCACAGGTTTCGGCTTTC
GPD2	GPD2_sens	CGTGAGGATCTATCTCAGGCT
	GPD2_antisens	TAGGCCAGGTTTCATTTGTTCC

XCL1	XCL1_sens	TACATTGTGGAAGGTGTAGG
	XCL1_antisens	TGGTGTAGGTCTTGATTCTG
C1R	C1R_sens	CCTGGAGCCTTTTGATATTG
	C1R_antisens	GACTCATCTGTGAAGAACAG
NMI	NMI_sens	CGCGTGGACTATGACAGACA
	NMI_antisens	CAGTAACTCTATGGCAGTTTGA
IFI16	IFI16_sens	ACAAACCCGAGAAACAATGACC
	IFI16_antisens	GCATCTGAGGAGTCCGAAGA
LY6E	LY6E_sens	GGACAGGCTGCTTTGGTTTG
	LY6E_antisens	GAGCTGGCTCGCTCCAC
USP18	USP18_sens	GGCTCTGAGGCAAATCTGT
	USP18_antisens	CAACCAGGCCATGAGGGTAG
ISG15	ISG15_sens	GCGGCAGATCACCCAGAAGAT
	ISG15_antisens	GTTCTGCGCATTTGTCCACC
APOL3	APOL3_sens	AGAGAGTCAGCCCAGTGCAT
	APOL3_antisens	AGAGAGCATCTGCCTCATCC
GBP3	GBP3_sens	GAAGAGTTATCAAGAACATGTG
	GBP3_antisens	AGCTTATGCGACATATATCTCT
NAPA	NAPA_sens	GAAGGAAGCGGAGGCCGATG
	NAPA_antisens	TCCAGCAGCACTCCAGTTTT
NADK	NADK_sens	AACGGCATCAGTGTTTTTCTG
	NADK_antisens	GATTCGGCCTGGATAGG
ISG20	ISG20_sens	TGGACTGCGAGATGGTGG
	ISG20_antisens	GGTTCTGTAATCGGTGAT
IRF2	IRF2_sens	ACGGTGAACATCATAGTTGTAGGA
	IRF2_antisens	GGGGAGATCTGCAGAGGGTA
CCND3	CCND3_sens	TACCCGCCATCCATGATCG
	CCND3_antisens	AGGCAGTCCACTTCAGTGC
C22orf39	C22orf39_sens	TGATTTGAGAGGCCGGCTGAC
	C22orf39_antisens	CGAGCAACCAATAGCAACCG
RUBCN	RUBCN_sens	AGGAGGCCCCAGGAATATCA
	RUBCN_antisens	CAGGTACCGACCACCTTCATA

Tableau 10. Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression de gènes en RT-qPCR.

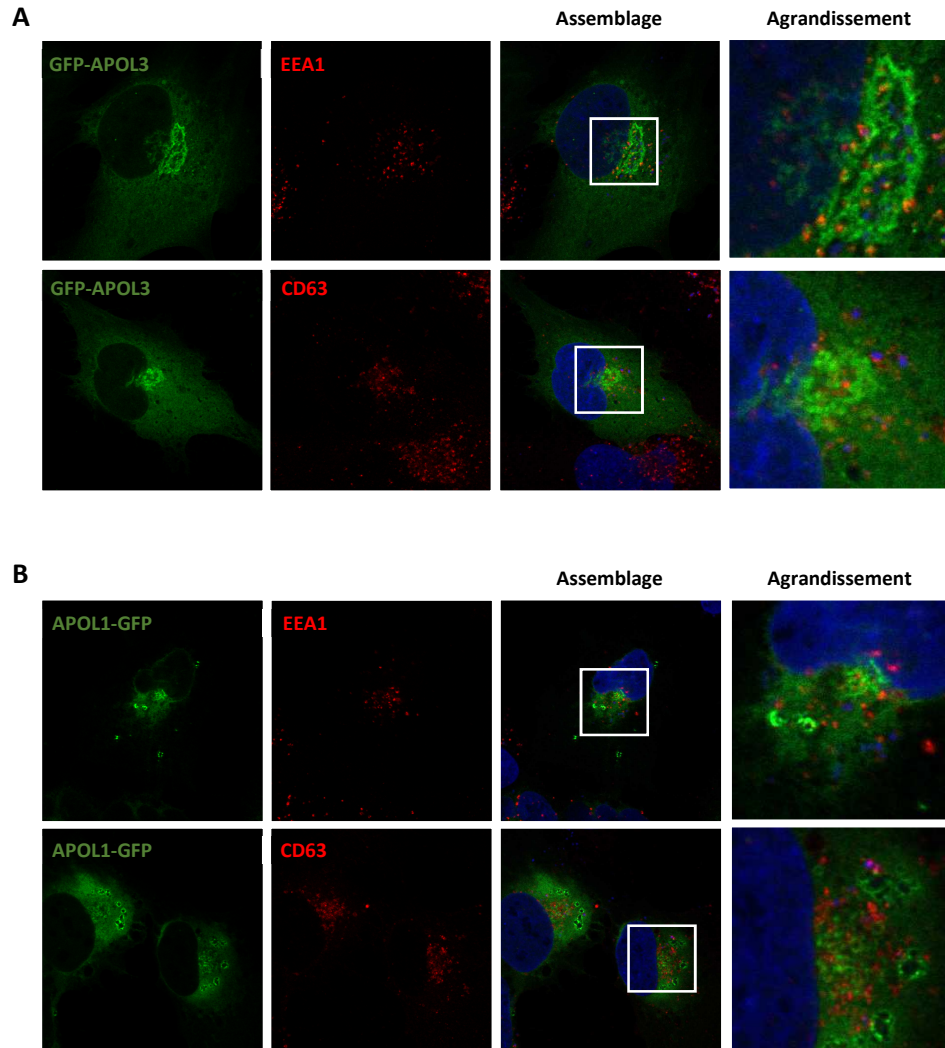


Figure 44. Localisation cellulaire des APOLs. Les HMC3 sont transfectées avec des constructions GFP-APOL3 (A) et APOL1-GFP (B). Vingt heures post-transfection, les cellules sont fixées et marquées par des anticorps dirigés contre EEA1 (marqueur des endosomes précoces) et CD63 (marqueur des endosomes tardifs). Le carré blanc correspond à la zone d'agrandissement représentée sur la droite de la figure.

A

>APOL1

MEGAALLRVSVLCIWM S A L F L G V G V R A E E A G A **RVQQNVPSGTD TGDPQSKPLGD** WAAGTMDPESSIFIEDAIKYF
 KEKVSTQNLLLLLLTDNEAWNGFVAAAELPRNEADELRKALDNLARQMIMKDKNWHDKGQYRNWFLKEFPRLKSE
 LEDNIRRLRALADGVQKVHKGTTIANVVSGLSISISSGILTLVGMGLAPFTEGGSLVLEPGMELGITAALTGITS
 STMDYGKKWWTQAQAHLVIKSLDKLKEVREFLGENISNFLSLAGNTYQLTRGIGKDIRALRRARANLQSVPHAS
 ASRPRVTEPISAESGEQVERVNEP S I L E M S R G V K L T D V A P V S F F L V L D V V Y L V Y E S K H L H E G A K S E T A E E L K K V A
 QELEEKLNILNNNYKILQADQEL

B

>APOL3

MDSEKKRFTEEATKYFRERVSPVHLQILLTNNEAWKRFTVTAELPR **DEADALYEALKKLRTYAA** EDEYVQQKDE
 QFREWFLKEFPQVKRKIQESIEKLRALANGIEEVHRGCTISNVVSSSTGAASGIMSLAGLVLPFTAGTSLALTA
 AGVGLGAASAVTGITTSIVEHSYTS S A E A E A S R L T A T S I D R L K V F K E V M R D I T P N L L S L L N N Y E A T Q T I G S E I R
 A I R Q A R A R A R L P V T T W R I S A G S G G Q A E R T I A G T T R A V S R G A R I L S A T T S G I F L A L D V V N L V Y E S K H L H E G A K S A S
 A E E L R R Q A Q E L E E N L M E L T Q I Y Q R L N P C H T H

C

Protéine	Lignée cellulaire	Allèle 1	Allèle 2
APOL1	KO APOL1	RVQQNVPSGTD TGDPQSKPLG ALGC WHHGPR*	RVQQNVPSGTD TGDPQSKPLG ALGC WHHGPR*
	KO APOL1/APOL3	RVQQNVPSGTD TGDPQSKPLG ALGC WHHGPR*	RVQQNVPSGTD TGDPQSKPLG ALGC WHHGPR*
APOL3	KO APOL3	DEADALYEALKKLRT MRTNMCSRKMS SLGNF*	DEADALYEALKKLRT FRTNMCSRKMSS LGNF*
	KO APOL3 clone2	DEADALYEALKKLRTYAA SRMFVPIQPL PLSLPILHTGPICVRT*	DEADALYEALKKLRTYAA SRMFVPIQPL PLSLPILHTGPICVRT*
	KO APOL1/APOL3	DEADALYKKLRTYAA PRPLAPSPKPPDS PLQALPCPPHPLRLQVSSTSSRCDD*	DEADALYKKLRTYAA PRPLAPSPKPPDS PLQALPCPPHPLRLQVSSTSSRCDD*

Tableau 11. Séquence protéique des APOLs dans les lignées podocytes KO. (A) séquence sauvage de la protéine APOL1. En bleu est surlignée la séquence protéique éditée par la technique CRISPR. (B) Séquence sauvage de la protéine APOL3. En vert est surlignée la séquence protéique éditée par la technique CRISPR. (C) Tableau représentant la séquence protéique d'APOL1 ou APOL3 en fonction de chaque lignée utilisée dans l'étude.

Bibliographie

Bibliographie

van Aalst, M., Nelen, C.M., Goorhuis, A., Stijns, C., and Grobusch, M.P. (2017). Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease* 15, 8–22.

Aguirre, S., Luthra, P., Sanchez-Aparicio, M.T., Maestre, A.M., Patel, J., Lamothe, F., Fredericks, A.C., Tripathi, S., Zhu, T., Pintado-Silva, J., et al. (2017). Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nat Microbiol* 2, 1–11.

Alcendor, D.J. (2017). Zika Virus Infection of the Human Glomerular Cells: Implications for Viral Reservoirs and Renal Pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 216, 162–171.

Araujo, L.M., Ferreira, M.L.B., Nascimento, O.J., Araujo, L.M., Ferreira, M.L.B., and Nascimento, O.J. (2016). Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 74, 253–255.

Arita, M., Kojima, H., Nagano, T., Okabe, T., Wakita, T., and Shimizu, H. (2011). Phosphatidylinositol 4-Kinase III Beta Is a Target of Enviroxime-Like Compounds for Antipoliiovirus Activity. *Journal of Virology* 85, 2364–2372.

Arvind, T.A., and Rangarajan, P.N. (2016). Mouse Apolipoprotein L9 is a phosphatidylethanolamine-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479, 636–642.

Barrett, A.D.T. (2017). Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. *Vaccine* 35, 5951–5955.

Barros, J.B. de S., Silva, P.A.N. da, Koga, R. de C.R., Gonzalez-Dias, P., Carmo Filho, J.R., Nagib, P.R.A., Coelho, V., Nakaya, H.I., Fonseca, S.G., and Pfrimer, I.A.H. (2018). Acute Zika Virus Infection in an Endemic Area Shows Modest Proinflammatory Systemic Immunoactivation and Cytokine-Symptom Associations. *Front. Immunol.* 9.

Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Lavezzo, E., Trevisan, M., Sgarabotto, D., and Palù, G. (2016). Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. *Euro Surveill* 21.

Baz, M., and Boivin, G. (2019). Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections. *Pharmaceuticals* 12, 101.

Bearcroft, W.G.C. (1956). Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 50, 442–448.

Beatman, E., Oyer, R., Shives, K.D., Hedman, K., Brault, A.C., Tyler, K.L., and David Beckham, J. (2012). West Nile virus growth is independent of autophagy activation. *Virology* 433, 262–272.

Berger, K.L., Kelly, S.M., Jordan, T.X., Tartell, M.A., and Randall, G. (2011). Hepatitis C Virus Stimulates the Phosphatidylinositol 4-Kinase III Alpha-Dependent Phosphatidylinositol 4-Phosphate Production That Is Essential for Its Replication. *Journal of Virology* 85, 8870–8883.

- Berryman, S., Brooks, E., Burman, A., Hawes, P., Roberts, R., Netherton, C., Monaghan, P., Whelband, M., Cottam, E., Elazar, Z., et al. (2012). Foot-and-mouth disease virus induces autophagosomes during cell entry via a class III phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *J. Virol.* *86*, 12940–12953.
- Bhardwaj, M., Paul, S., Jakhar, R., Khan, I., Kang, J.I., Kim, H.M., Yun, J.W., Lee, S.-J., Cho, H.J., Lee, H.G., et al. (2017). Vitexin confers HSF-1 mediated autophagic cell death by activating JNK and ApoL1 in colorectal carcinoma cells. *Oncotarget* *8*, 112426–112441.
- Bhattacharyya, S., Zagórska, A., Lew, E.D., Shrestha, B., Rothlin, C.V., Naughton, J., Diamond, M.S., Lemke, G., and Young, J.A.T. (2013). Enveloped Viruses Disable Innate Immune Responses in Dendritic Cells by Direct Activation of TAM Receptors. *Cell Host & Microbe* *14*, 136–147.
- Bowen, J.R., Quicke, K.M., Maddur, M.S., O’Neal, J.T., McDonald, C.E., Fedorova, N.B., Puri, V., Shabman, R.S., Pulendran, B., and Suthar, M.S. (2017). Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. *PLOS Pathogens* *13*, e1006164.
- Brass, A.L., Huang, I.-C., Benita, Y., John, S.P., Krishnan, M.N., Feeley, E.M., Ryan, B.J., Weyer, J.L., van der Weyden, L., Fikrig, E., et al. (2009). The IFITM Proteins Mediate Cellular Resistance to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus, and Dengue Virus. *Cell* *139*, 1243–1254.
- Brinton, M.A., Fernandez, A.V., and Dispoto, J.H. (1986). The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* *153*, 113–121.
- Calvet, G., Aguiar, R.S., Melo, A.S.O., Sampaio, S.A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E.S.M., de Sequeira, P.C., de Mendonça, M.C.L., de Oliveira, L., et al. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases* *16*, 653–660.
- Cao, B., Parnell, L.A., Diamond, M.S., and Mysorekar, I.U. (2017). Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J Exp Med* *214*, 2303–2313.
- Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., Salje, H., Van Kerkhove, M.D., Abadie, V., Garel, C., et al. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *The Lancet* *387*, 2125–2132.
- CDC, 2020. Arbovirus Catalog - CDC Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). [WWW Document]. URL <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/> (accessed 19.03.20)
- Chakrabarti, A., Jha, B.K., and Silverman, R.H. (2010). New Insights into the Role of RNase L in Innate Immunity. *Journal of Interferon & Cytokine Research* *31*, 49–57.
- Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C.J., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., et al. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host & Microbe* *20*, 342–356.
- Chazal, M., Beauclair, G., Gracias, S., Najburg, V., Simon-Lorière, E., Tangy, F., Komarova, A.V., and Jouvenet, N. (2018). RIG-I Recognizes the 5' Region of Dengue and Zika Virus Genomes. *Cell Rep* *24*, 320–328.
- Chen, L.H., and Wilson, M.E. (2020). Yellow fever control: current epidemiology and vaccination strategies. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines* *6*, 1.

- Chen, J., Ng, M.M.-L., and Chu, J.J.H. (2015). Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLOS Pathogens* *11*, e1005053.
- Chen, S., Li, S., and Chen, L. (2016). Interferon-inducible Protein 6-16 (IFI-6-16, ISG16) promotes Hepatitis C virus replication in vitro. *Journal of Medical Virology* *88*, 109–114.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* *3*, 866–871.
- Chesarino, N.M., Compton, A.A., McMichael, T.M., Kenney, A.D., Zhang, L., Soewarna, V., Davis, M., Schwartz, O., and Yount, J.S. (2017). IFITM3 requires an amphipathic helix for antiviral activity. *EMBO Reports* *18*, 1740–1751.
- Combredet, C., Labrousse, V., Mollet, L., Lorin, C., Delebecque, F., Hurtrel, B., McClure, H., Feinberg, M.B., Brahic, M., and Tangy, F. (2003). A Molecularly Cloned Schwarz Strain of Measles Virus Vaccine Induces Strong Immune Responses in Macaques and Transgenic Mice. *J Virol* *77*, 11546–11554.
- Corona, A.K., Saulsbery, H.M., Corona Velazquez, A.F., and Jackson, W.T. (2018). Enteroviruses Remodel Autophagic Trafficking through Regulation of Host SNARE Proteins to Promote Virus Replication and Cell Exit. *Cell Rep* *22*, 3304–3314.
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E.G., Neufeldt, C.J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., et al. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports* *18*, 2113–2123.
- Costa, C.F. da Silva, A.V. da, Nascimento, V.A. do, Souza, V.C. de, Monteiro, D.C. da S., Terrazas, W.C.M., Passos, R.A. dos, Nascimento, S., Lima, J.B.P., and Naveca, F.G. (2018). Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. *PLOS Neglected Tropical Diseases* *12*, e0006594.
- Coutard, B., Barral, K., Lichière, J., Selisko, B., Martin, B., Aouadi, W., Lombardia, M.O., Debart, F., Vasseur, J.-J., Guillemot, J.C., et al. (2017). Zika Virus Methyltransferase: Structure and Functions for Drug Design Perspectives. *J Virol* *91*.
- Coyaud, E., Ranadheera, C., Cheng, D., Gonçalves, J., Dyakov, B.J.A., Laurent, E.M.N., St-Germain, J., Pelletier, L., Gingras, A.-C., Brumell, J.H., et al. (2018). Global Interactomics Uncovers Extensive Organellar Targeting by Zika Virus. *Mol Cell Proteomics* *17*, 2242–2255.
- Cui, S., Eisenächer, K., Kirchofer, A., Brzózka, K., Lammens, A., Lammens, K., Fujita, T., Conzelmann, K.-K., Krug, A., and Hopfner, K.-P. (2008). The C-Terminal Regulatory Domain Is the RNA 5'-Triphosphate Sensor of RIG-I. *Molecular Cell* *29*, 169–179.
- Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y.-Q., Musyoki, A.M., Cheng, H., Zhang, Y., Yuan, Y., Song, H., Haywood, J., et al. (2016). Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host & Microbe* *19*, 696–704.
- Dang, J., Tiwari, S.K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V.S., Eroshkin, A.M., and Rana, T.M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* *19*, 258–265.
- Dansako, H., Imai, H., Ueda, Y., Satoh, S., Shimotohno, K., and Kato, N. (2018). High-level expression of STING restricts susceptibility to HBV by mediating type III IFN induction. *FASEB Bioadv* *1*, 67–80.

- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R.G., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *PNAS* *95*, 15623–15628.
- Derraik, J.G., and Slaney, D. (2015). Notes on Zika virus – an emerging pathogen now present in the South Pacific. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* *39*, 5–7.
- Dick, G.W.A., Kitchen, S.F., and Haddock, A.J. (1952). Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* *46*, 509–520.
- Ding, Q., Gaska, J.M., Douam, F., Wei, L., Kim, D., Balev, M., Heller, B., and Ploss, A. (2018). Species-specific disruption of STING-dependent antiviral cellular defenses by the Zika virus NS2B3 protease. *PNAS* *115*, E6310–E6318.
- Driggers, R.W., Ho, C.-Y., Korhonen, E.M., Kuivanen, S., Jääskeläinen, A.J., Smura, T., Rosenberg, A., Hill, D.A., DeBiasi, R.L., Vezina, G., et al. (2016). Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *New England Journal of Medicine* *374*, 2142–2151.
- Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., et al. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia.
- Dukhovny, A., Lamkiewicz, K., Chen, Q., Fricke, M., Jabrane-Ferrat, N., Marz, M., Jung, J.U., and Sklan, E.H. (2019). A CRISPR Activation Screen Identifies Genes That Protect against Zika Virus Infection. *J Virol* *93*.
- Dupont-Rouzeyrol, M., Biron, A., O'Connor, O., Huguon, E., and Descloux, E. (2016). Infectious Zika viral particles in breastmilk. *The Lancet* *387*, 1051.
- Edgil, D., Polacek, C., and Harris, E. (2006). Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J. Virol.* *80*, 2976–2986.
- Fang, R., Jiang, Q., Zhou, X., Wang, C., Guan, Y., Tao, J., Xi, J., Feng, J.-M., and Jiang, Z. (2017). MAVS activates TBK1 and IKK ϵ through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLOS Pathogens* *13*, e1006720.
- Faria, N.R., Kraemer, M.U.G., Hill, S.C., Jesus, J.G. de, Aguiar, R.S., Iani, F.C.M., Xavier, J., Quick, J., Plessis, L. du, Dellicour, S., et al. (2018). Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* *361*, 894–899.
- Fink, K., and Grandvaux, N. (2013). STAT2 and IRF9. *JAK-STAT* *2*, e27521.
- Foo, S.-S., Chen, W., Chan, Y., Lee, W.-S., Lee, S.-A., Cheng, G., Nielsen-Saines, K., Brasil, P., and Jung, J.U. Biomarkers and immunoprofiles associated with fetal abnormalities of ZIKV-positive pregnancies. *JCI Insight* *3*.
- Foy, B.D., Kobylinski, K.C., Foy, J.L.C., Blitvich, B.J., Rosa, A.T. da, Haddock, A.D., Lanciotti, R.S., and Tesh, R.B. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA - Volume 17, Number 5— May 2011 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC.
- Fu, J., Qin, L., He, T., Qin, J., Hong, J., Wong, J., Liao, L., and Xu, J. (2011). The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res.* *21*, 275–289.

- Gao, D., Lou, Y., He, D., Porco, T.C., Kuang, Y., Chowell, G., and Ruan, S. (2016). Prevention and Control of Zika as a Mosquito-Borne and Sexually Transmitted Disease: A Mathematical Modeling Analysis. *Sci Rep* 6, 28070.
- Gao, H., Lin, Y., He, J., Zhou, S., Liang, M., Huang, C., Li, X., Liu, C., and Zhang, P. (2019). Role of heparan sulfate in the Zika virus entry, replication, and cell death. *Virology* 529, 91–100.
- Garg, H., Mehmetoglu-Gurbuz, T., and Joshi, A. (2018). Recent Advances in Zika Virus Vaccines. *Viruses* 10, 631.
- Genovese, G., Friedman, D.J., Ross, M.D., Lecordier, L., Uzureau, P., Freedman, B.I., Bowden, D.W., Langefeld, C.D., Oleksyk, T.K., Knob, A.L.U., et al. (2010). Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African Americans. *Science* 329, 841–845.
- Grant, A., Ponia, S.S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M.C., Sánchez-Seco, M.P., Evans, M.J., Best, S.M., et al. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host & Microbe* 19, 882–890.
- Grischott, F., Puhan, M., Hatz, C., and Schlagenhauf, P. (2016). Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease* 14, 313–330.
- Gubler, D.J., Vasilakis, N., and Musso, D. (2017). History and Emergence of Zika Virus. *J Infect Dis* 216, S860–S867.
- Guerbois, M., Fernandez-Salas, I., Azar, S.R., Danis-Lozano, R., Alpuche-Aranda, C.M., Leal, G., Garcia-Malo, I.R., Diaz-Gonzalez, E.E., Casas-Martinez, M., Rossi, S.L., et al. (2016). Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. *J Infect Dis* 214, 1349–1356.
- Guo, W., Malin, S.A., Johns, D.C., Jeromin, A., and Nerbonne, J.M. (2002). Modulation of Kv4-encoded K⁺ Currents in the Mammalian Myocardium by Neuronal Calcium Sensor-1. *J. Biol. Chem.* 277, 26436–26443.
- Hackett, B.A., and Cherry, S. (2018). Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *PNAS* 115, 4246–4251.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology* 89, 8880–8896.
- Harbach, R.E., and Besansky, N.J. (2014). Mosquitoes. *Current Biology* 24, R14–R15.
- Harsh, S., Fu, Y., Kenney, E., Han, Z., and Eleftherianos, I. (2020). Zika virus non-structural protein NS4A restricts eye growth in *Drosophila* through regulation of JAK/STAT signaling. *Disease Models & Mechanisms*.
- Hayashi, J., Stoyanova, R., and Seeger, C. (2005). The transcriptome of HCV replicon expressing cell lines in the presence of alpha interferon. *Virology* 335, 264–275.
- Heaton, N.S., and Randall, G. (2010). Dengue Virus-Induced Autophagy Regulates Lipid Metabolism. *Cell Host & Microbe* 8, 422–432.

- Heim, M.H., Kerr, I.M., Stark, G.R., and Darnell, J.E. (1995). Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 267, 1347–1349.
- Helbig, K.J., Eyre, N.S., Yip, E., Narayana, S., Li, K., Fiches, G., McCartney, E.M., Jangra, R.K., Lemon, S.M., and Beard, M.R. (2011). The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A. *Hepatology* 54, 1506–1517.
- Helbig, K.J., Carr, J.M., Calvert, J.K., Wati, S., Clarke, J.N., Eyre, N.S., Narayana, S.K., Fiches, G.N., McCartney, E.M., and Beard, M.R. (2013). Viperin is induced following dengue virus type-2 (DENV-2) infection and has anti-viral actions requiring the C-terminal end of viperin. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2178.
- Hemachudha, P., Wacharapluesadee, S., Buathong, R., Petcharat, S., Bunprakob, S., Ruchiseesarod, C., Roeksomtawin, P., and Hemachudha, T. (2019). Lack of Transmission of Zika Virus Infection to Breastfed Infant. *Clin Med Insights Case Rep* 12, 1179547619835179.
- Hertzog, J., Junior, A.G.D., Rigby, R.E., Donald, C.L., Mayer, A., Sezgin, E., Song, C., Jin, B., Hublitz, P., Eggeling, C., et al. (2018). Infection with a Brazilian isolate of Zika virus generates RIG-I stimulatory RNA and the viral NS5 protein blocks type I IFN induction and signaling. *European Journal of Immunology* 48, 1120–1136.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science* 314, 994–997.
- Hsu, N.-Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.-H., Takvorian, P.M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., et al. (2010). Viral Reorganization of the Secretory Pathway Generates Distinct Organelles for RNA Replication. *Cell* 141, 799–811.
- Huang, I.-C., Bailey, C.C., Weyer, J.L., Radoshitzky, S.R., Becker, M.M., Chiang, J.J., Brass, A.L., Ahmed, A.A., Chi, X., Dong, L., et al. (2011). Distinct Patterns of IFITM-Mediated Restriction of Filoviruses, SARS Coronavirus, and Influenza A Virus. *PLOS Pathogens* 7, e1001258.
- Huang, X., Sun, S., Wang, X., Fan, F., Zhou, Q., Lu, S., Cao, Y., Wang, Q.-W., Dong, M.-Q., Yao, J., et al. (2019). Mechanistic insights into the SNARE complex disassembly. *Sci Adv* 5, eaau8164.
- Hubálek, Z., Rudolf, I., and Nowotny, N. (2014). Chapter Five - Arboviruses Pathogenic for Domestic and Wild Animals. In *Advances in Virus Research*, K. Maramorosch, and F.A. Murphy, eds. (Academic Press), pp. 201–275.
- Hubert, M., Chiche, A., Legros, V., Jeannin, P., Montange, T., Gessain, A., Ceccaldi, P.-E., and Vidy, A. (2019). Productive Infection of Mouse Mammary Glands and Human Mammary Epithelial Cells by Zika Virus. *Viruses* 11, 950.
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C.D., Aitken, K., et al. (2001). CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409, 349–354.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 147, 258–267.
- Ishikawa, H., and Barber, G.N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674–678.

- Ishikawa, T., Yamanaka, A., and Konishi, E. (2014). A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine* *32*, 1326–1337.
- Izmirly, A.M., Alturki, S.O., Alturki, S.O., Connors, J., and Haddad, E.K. (2020). Challenges in Dengue Vaccines Development: Pre-existing Infections and Cross-Reactivity. *Front. Immunol.* *11*.
- Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 631–643.
- Jaitin, D.A., Roisman, L.C., Jaks, E., Gavutis, M., Piehler, J., Heyden, J.V. der, Uze, G., and Schreiber, G. (2006). Inquiring into the Differential Action of Interferons (IFNs): an IFN- α 2 Mutant with Enhanced Affinity to IFNAR1 Is Functionally Similar to IFN- β . *Molecular and Cellular Biology* *26*, 1888–1897.
- Jiang, X., Kinch, L.N., Brautigam, C.A., Chen, X., Du, F., Grishin, N.V., and Chen, Z.J. (2012). Ubiquitin-Induced Oligomerization of the RNA Sensors RIG-I and MDA5 Activates Antiviral Innate Immune Response. *Immunity* *36*, 959–973.
- Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K., and Li, X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) Receptor-Associated Kinase-Dependent IL-1-Induced Signaling Complexes Phosphorylate TAK1 and TAB2 at the Plasma Membrane and Activate TAK1 in the Cytosol. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 7158–7167.
- Jin, R., Zhu, W., Cao, S., Chen, R., Jin, H., Liu, Y., Wang, S., Wang, W., and Xiao, G. (2013). Japanese Encephalitis Virus Activates Autophagy as a Viral Immune Evasion Strategy. *PLoS One* *8*.
- Johanneson, B., McDonnell, S.K., Karyadi, D.M., Quignon, P., McIntosh, L., Riska, S.M., FitzGerald, L.M., Johnson, G., Deutsch, K., Williams, G., et al. (2010). Family-based association analysis of 42 hereditary prostate cancer families identifies the Apolipoprotein L3 region on chromosome 22q12 as a risk locus. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 3852–3862.
- Kariuki Njenga, M., Nderitu, L., Ledermann, J.P., Ndirangu, A., Logue, C.H., Kelly, C.H.L., Sang, R., Sergon, K., Breiman, R., and Powers, A.M. (2008). Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *Journal of General Virology*, *89*, 2754–2760.
- Karki, S., Li, M.M.H., Schoggins, J.W., Tian, S., Rice, C.M., and MacDonald, M.R. (2012). Multiple Interferon Stimulated Genes Synergize with the Zinc Finger Antiviral Protein to Mediate Anti-Alphavirus Activity. *PLOS ONE* *7*, e37398.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101–105.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* *205*, 1601–1610.
- Kaufmann, B., and Rossmann, M.G. (2011). Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and Infection* *13*, 1–9.
- Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* *5*.
- Khakpoor, A., Panyasrivanit, M., Wikan, N., and Smith, D.R. (2009). A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *Journal of General Virology* *90*, 1093–1103.

- Khalil, A., Poelvoorde, P., Fayyad-Kazan, M., Rousseau, A., Nuyens, V., Uzureau, S., Biston, P., EL-Makhour, Y., Badran, B., Van Antwerpen, P., et al. (2018). Apolipoprotein L3 interferes with endothelial tube formation via regulation of ERK1/2, FAK and Akt signaling pathway. *Atherosclerosis* 279, 73–87.
- Khan, I.A., MacLean, J.A., Lee, F.S., Casciotti, L., DeHaan, E., Schwartzman, J.D., and Luster, A.D. (2000). IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunity* 12, 483–494.
- Khiar, S., Lucas-Hourani, M., Nisole, S., Smith, N., Helynck, O., Bourguine, M., Ruffié, C., Herbeuval, J.-P., Munier-Lehmann, H., Tangy, F., et al. (2017). Identification of a small molecule that primes the type I interferon response to cytosolic DNA. *Sci Rep* 7.
- Khromykh, A.A., Varnavski, A.N., Sedlak, P.L., and Westaway, E.G. (2001). Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J. Virol.* 75, 4633–4640.
- Kim, M.-J., Hwang, S.-Y., Imaizumi, T., and Yoo, J.-Y. (2008). Negative Feedback Regulation of RIG-I-Mediated Antiviral Signaling by Interferon-Induced ISG15 Conjugation. *Journal of Virology* 82, 1474–1483.
- Kistler, K.E., Vosshall, L.B., and Matthews, B.J. (2015). Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep* 11, 51–60.
- Knight, E., and Korant, B.D. (1979). Fibroblast interferon induces synthesis of four proteins in human fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1824–1827.
- Kobayashi, S., Orba, Y., Yamaguchi, H., Takahashi, K., Sasaki, M., Hasebe, R., Kimura, T., and Sawa, H. (2014). Autophagy inhibits viral genome replication and gene expression stages in West Nile virus infection. *Virus Research* 191, 83–91.
- Kopp, J.B., Nelson, G.W., Sampath, K., Johnson, R.C., Genovese, G., An, P., Friedman, D., Briggs, W., Dart, R., Korbet, S., et al. (2011). APOL1 Genetic Variants in Focal Segmental Glomerulosclerosis and HIV-Associated Nephropathy. *JASN* 22, 2129–2137.
- Kostyuchenko, V.A., Lim, E.X.Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T.-S., Ooi, J.S.G., Shi, J., and Lok, S.-M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* 533, 425–428.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H., and Donnelly, R.P. (2003). IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4, 69–77.
- Kovanich, D., Saisawang, C., Sittipaisankul, P., Ramphan, S., Kalpongkul, N., Somparn, P., Pisitkun, T., and Smith, D.R. (2019). Analysis of the Zika and Japanese Encephalitis Virus NS5 Interactomes. *J. Proteome Res.* 18, 3203–3218.
- Kraemer, M.U.G., Faria, N.R., Reiner, R.C., Golding, N., Nikolay, B., Stasse, S., Johansson, M.A., Salje, H., Faye, O., Wint, G.R.W., et al. (2017). Spread of yellow fever virus outbreak in Angola and the Democratic Republic of the Congo 2015–16: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases* 17, 330–338.
- Kreit, M., Vertommen, D., Gillet, L., and Michiels, T. (2015). The Interferon-Inducible Mouse Apolipoprotein L9 and Prohibitins Cooperate to Restrict Theiler's Virus Replication. *PLoS ONE* 10, e0133190.

- Krishnan, M.N., Ng, A., Sukumaran, B., Gilfoy, F.D., Uchil, P.D., Sultana, H., Brass, A.L., Adametz, R., Tsui, M., Qian, F., et al. (2008). RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* *455*, 242–245.
- Kumar, A., Hou, S., Airo, A.M., Limonta, D., Mancinelli, V., Branton, W., Power, C., and Hobman, T.C. (2016). Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Reports* *17*, 1766–1775.
- Lai, C., Struckhoff, J.J., Schneider, J., Martinez-Sobrido, L., Wolff, T., García-Sastre, A., Zhang, D.-E., and Lenschow, D.J. (2009). Mice Lacking the ISG15 E1 Enzyme UbE1L Demonstrate Increased Susceptibility to both Mouse-Adapted and Non-Mouse-Adapted Influenza B Virus Infection. *Journal of Virology* *83*, 1147–1151.
- Langston, P.K., Nambu, A., Jung, J., Shibata, M., Aksoylar, H.I., Lei, J., Xu, P., Doan, M.T., Jiang, H., MacArthur, M.R., et al. (2019). Glycerol phosphate shuttle enzyme GPD2 regulates macrophage inflammatory responses. *Nat. Immunol.* *20*, 1186–1195.
- Ledermann, J.P., Guillaumot, L., Yug, L., Saweyog, S.C., Tided, M., Machieng, P., Pretrick, M., Marfel, M., Griggs, A., Bel, M., et al. (2014). *Aedes hensilli* as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases* *8*, e3188.
- Lee, A.J., and Ashkar, A.A. (2018). The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol* *9*.
- Leta, S., Beyene, T.J., De Clercq, E.M., Amenu, K., Kraemer, M.U.G., and Revie, C.W. (2018). Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases* *67*, 25–35.
- Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R., Reich, N., and Darnell, J.E. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev.* *2*, 383–393.
- Li, C., Deng, Y.-Q., Wang, S., Ma, F., Aliyari, R., Huang, X.-Y., Zhang, N.-N., Watanabe, M., Dong, H.-L., Liu, P., et al. (2017). 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model. *Immunity* *46*, 446–456.
- Li, H., Saucedo-Cuevas, L., Regla-Nava, J.A., Chai, G., Sheets, N., Tang, W., Terskikh, A.V., Shresta, S., and Gleeson, J.G. (2016). Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell Stem Cell* *19*, 593–598.
- Li, J., Ding, S.C., Cho, H., Chung, B.C., Gale, M., Chanda, S.K., and Diamond, M.S. (2013a). A Short Hairpin RNA Screen of Interferon-Stimulated Genes Identifies a Novel Negative Regulator of the Cellular Antiviral Response. *MBio* *4*.
- Li, L., Zhao, H., Liu, P., Li, C., Quanquin, N., Ji, X., Sun, N., Du, P., Qin, C.-F., Lu, N., et al. (2018). PARP12 suppresses Zika virus infection through PARP-dependent degradation of NS1 and NS3 viral proteins. *Sci. Signal.* *11*.
- Li, X.-D., Wu, J., Gao, D., Wang, H., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013b). Pivotal Roles of cGAS-cGAMP Signaling in Antiviral Defense and Immune Adjuvant Effects. *Science* *341*.
- Li, Y., Muffat, J., Omer Javed, A., Keys, H.R., Lungjangwa, T., Bosch, I., Khan, M., Virgilio, M.C., Gehrke, L., Sabatini, D.M., et al. (2019). Genome-wide CRISPR screen for Zika virus resistance in human neural cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *116*, 9527–9532.

- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S.-S., Lee, S.-A., Ge, J., Wang, S., Goldman, S.A., Zlokovic, B.V., et al. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* *19*, 663–671.
- Liao, W., Goh, F.Y., Betts, R.J., Kemeny, D.M., Tam, J., Bay, B.-H., and Wong, W.S.F. (2011). A novel anti-apoptotic role for apolipoprotein L2 in IFN- γ -induced cytotoxicity in human bronchial epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* *226*, 397–406.
- Lin, S., Yang, S., He, J., Guest, J.D., Ma, Z., Yang, L., Pierce, B.G., Tang, Q., and Zhang, Y.-J. (2019). Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. *Virology* *527*, 180–187.
- Lin, S.-C., Lo, Y.-C., and Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* *465*, 885–890.
- Lindqvist, R., Kurhade, C., Gilthorpe, J.D., and Överby, A.K. (2018). Cell-type- and region-specific restriction of neurotropic flavivirus infection by viperin. *J Neuroinflammation* *15*.
- Liu, S.-Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M.D., Smith, J.K., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, J.A., et al. (2013). Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity* *38*, 92–105.
- Liu, T., Yang, W.-Q., Xie, Y.-G., Liu, P.-W., Xie, L.-H., Lin, F., Li, C.-Y., Gu, J.-B., Wu, K., Yan, G.-Y., et al. (2019a). Construction of an efficient genomic editing system with CRISPR/Cas9 in the vector mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Science* *26*, 1045–1054.
- Liu, Z.-S., Cai, H., Xue, W., Wang, M., Xia, T., Li, W.-J., Xing, J.-Q., Zhao, M., Huang, Y.-J., Chen, S., et al. (2019b). G3BP1 promotes DNA binding and activation of cGAS. *Nat Immunol* *20*, 18–28.
- Lodeiro, M.F., Filomatori, C.V., and Gamarnik, A.V. (2009). Structural and Functional Studies of the Promoter Element for Dengue Virus RNA Replication. *Journal of Virology* *83*, 993–1008.
- Lowe, R., Barcellos, C., Brasil, P., Cruz, O.G., Honório, N.A., Kuper, H., and Carvalho, M.S. (2018). The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health* *15*, 96.
- Lucas, T.M., Richner, J.M., and Diamond, M.S. (2016). The Interferon-Stimulated Gene *Irfi27l2a* Restricts West Nile Virus Infection and Pathogenesis in a Cell-Type- and Region-Specific Manner. *J Virol* *90*, 2600–2615.
- Lum, F.-M., Low, D.K.S., Fan, Y., Tan, J.J.L., Lee, B., Chan, J.K.Y., Rénia, L., Ginhoux, F., and Ng, L.F.P. (2017). Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation. *Clin. Infect. Dis.* *64*, 914–920.
- Lum, F.-M., Lye, D.C.B., Tan, J.J.L., Lee, B., Chia, P.-Y., Chua, T.-K., Amrun, S.N., Kam, Y.-W., Yee, W.-X., Ling, W.-P., et al. (2018). Longitudinal Study of Cellular and Systemic Cytokine Signatures to Define the Dynamics of a Balanced Immune Environment During Disease Manifestation in Zika Virus–Infected Patients. *J Infect Dis* *218*, 814–824.
- Ma, J., Ketkar, H., Geng, T., Lo, E., Wang, L., Xi, J., Sun, Q., Zhu, Z., Cui, Y., Yang, L., et al. (2018). Zika Virus Non-structural Protein 4A Blocks the RLR-MAVS Signaling. *Front. Microbiol.* *9*.

- MacNamara, F.N. (1954). Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 48, 139–145.
- Malakhov, M.P., Malakhova, O.A., Kim, K.I., Ritchie, K.J., and Zhang, D.-E. (2002). UBP43 (USP18) Specifically Removes ISG15 from Conjugated Proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 9976–9981.
- Malakhova, O.A., Kim II, K., Luo, J.-K., Zou, W., Kumar, K.S., Fuchs, S.Y., Shuai, K., and Zhang, D.-E. (2006). UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. *The EMBO Journal* 25, 2358–2367.
- Malo, N., Hanley, J.A., Cerquozzi, S., Pelletier, J., and Nadon, R. (2006). Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nat Biotechnol* 24, 167–175.
- Mann, T.Z., Haddad, L.B., Williams, T.R., Hills, S.L., Read, J.S., Dee, D.L., Dziuban, E.J., Pérez-Padilla, J., Jamieson, D.J., Honein, M.A., et al. (2018). Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: A systematic review. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 32, 358–368.
- Mar, K.B., Rinkenberger, N.R., Boys, I.N., Eitson, J.L., McDougal, M.B., Richardson, R.B., and Schoggins, J.W. (2018). LY6E mediates an evolutionarily conserved enhancement of virus infection by targeting a late entry step. *Nat Commun* 9, 1–14.
- Marchette, N.J., Garcia, R., and Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18, 411–415.
- Marcombe, S., Mathieu, R.B., Pocquet, N., Riaz, M.-A., Poupardin, R., Sélior, S., Darriet, F., Reynaud, S., Yébakima, A., Corbel, V., et al. (2012). Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS ONE* 7, e30989.
- Martín-Acebes, M.A., Blázquez, A.-B., Oya, N.J. de, Escribano-Romero, E., and Saiz, J.-C. (2011). West Nile Virus Replication Requires Fatty Acid Synthesis but Is Independent on Phosphatidylinositol-4-Phosphate Lipids. *PLOS ONE* 6, e24970.
- Martines, R.B. (2016). Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses — Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65.
- Maucourant, C., Queiroz, G.A.N., Samri, A., Grassi, M.F.R., Yssel, H., and Vieillard, V. (2019). Zika virus in the eye of the cytokine storm. *European Cytokine Network* 30, 74–81.
- Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., and Amara, A. (2012). The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host & Microbe* 12, 544–557.
- Meertens, L., Labeau, A., Dejarnac, O., Cipriani, S., Sinigaglia, L., Bonnet-Madin, L., Le Charpentier, T., Hafirassou, M.L., Zamborlini, A., Cao-Lormeau, V.-M., et al. (2017). Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports* 18, 324–333.
- Melén, K., Kinnunen, L., and Julkunen, I. (2001). Arginine/Lysine-rich Structural Element Is Involved in Interferon-induced Nuclear Import of STATs. *J. Biol. Chem.* 276, 16447–16455.
- Metz, P., Dazert, E., Ruggieri, A., Mazur, J., Kaderali, L., Kaul, A., Zeuge, U., Windisch, M.P., Trippler, M., Lohmann, V., et al. (2012). Identification of type I and type II interferon-induced effectors controlling hepatitis C virus replication. *Hepatology* 56, 2082–2093.

- Meyer, K., Kwon, Y.-C., Liu, S., Hagedorn, C.H., Ray, R.B., and Ray, R. (2015). Interferon- α inducible protein 6 impairs EGFR activation by CD81 and inhibits hepatitis C virus infection. *Sci Rep* 5, 1–10.
- Miner, J.J., and Diamond, M.S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host & Microbe* 21, 134–142.
- Modhiran, N., Watterson, D., Blumenthal, A., Baxter, A.G., Young, P.R., and Stacey, K.J. (2017). Dengue virus NS1 protein activates immune cells via TLR4 but not TLR2 or TLR6. *Immunology & Cell Biology* 95, 491–495.
- Monajemi, H., Fontijn, R.D., Pannekoek, H., and Horrevoets, A.J.G. (2002). The Apolipoprotein L Gene Cluster Has Emerged Recently in Evolution and Is Expressed in Human Vascular Tissue. *Genomics* 79, 539–546.
- Moraga, I., Harari, D., Schreiber, G., Uzé, G., and Pellegrini, S. (2009). Receptor Density Is Key to the Alpha2/Beta Interferon Differential Activities. *Molecular and Cellular Biology* 29, 4778–4787.
- Morrone, S.R., Chew, V.S.Y., Lim, X.-N., Ng, T.-S., Kostyuchenko, V.A., Zhang, S., Wirawan, M., Chew, P.-L., Lee, J., Tan, J.L., et al. (2020). High flavivirus structural plasticity demonstrated by a non-spherical morphological variant. *Nat Commun* 11.
- Motta, I.J.F., Spencer, B.R., Cordeiro da Silva, S.G., Arruda, M.B., Dobbin, J.A., Gonzaga, Y.B.M., Arcuri, I.P., Tavares, R.C.B.S., Atta, E.H., Fernandes, R.F.M., et al. (2016). Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *New England Journal of Medicine* 375, 1101–1103.
- Murray, K.O., Gorchakov, R., Carlson, A.R., Berry, R., Lai, L., Natrajan, M., Garcia, M.N., Correa, A., Patel, S.M., Aagaard, K., et al. Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood - Volume 23, Number 1—January 2017 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC.
- Musso, D., Nilles, E.J., and Cao-Lormeau, V.-M. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection* 20, O595–O596.
- Musso, D., Cao-Lormeau, V.M., and Gubler, D.J. (2015). Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet* 386, 243–244.
- Mutso, M., Saul, S., Rausalu, K., Susova, O., Žusinaite, E., Mahalingam, S., and Merits, A. (2017). Reverse genetic system, genetically stable reporter viruses and packaged subgenomic replicon based on a Brazilian Zika virus isolate. *J. Gen. Virol.* 98, 2712–2724.
- Nasr, N., Maddocks, S., Turville, S.G., Harman, A.N., Woolger, N., Helbig, K.J., Wilkinson, J., Bye, C.R., Wright, T.K., Rambukwelle, D., et al. (2012). HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production. *Blood* 120, 778–788.
- Naveca, F.G., Pontes, G.S., Chang, A.Y., da Silva, G.A.V., do Nascimento, V.A., Monteiro, D.C. da S., da Silva, M.S., Abdalla, L.F., Santos, J.H.A., de Almeida, T.A.P., et al. (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.
- Nelson, B.R., Roby, J.A., Dobyys, W.B., Rajagopal, L., Gale, M., and Adams Waldorf, K.M. (2019). Immune Evasion Strategies Used by Zika Virus to Infect the Fetal Eye and Brain. *Viral Immunology* 33, 22–37.

- Ng, W.C., Soto-Acosta, R., Bradrick, S.S., Garcia-Blanco, M.A., and Ooi, E.E. (2017). The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses* *9*, 137.
- Nordmann, A., Wixler, L., Boergeling, Y., Wixler, V., and Ludwig, S. (2012). A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication. *FASEB J.* *26*, 1290–1300.
- Noronha, L. de, Zanluca, C., Azevedo, M.L.V., Luz, K.G., Santos, C.N.D. dos, Noronha, L. de, Zanluca, C., Azevedo, M.L.V., Luz, K.G., and Santos, C.N.D. dos (2016). Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* *111*, 287–293.
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparç-Goffart, I., Lastère, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H.P., Musso, D., and Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* *19*, 20720.
- Oli, M.W., Cotlin, L.F., Shiflett, A.M., and Hajduk, S.L. (2006). Serum resistance-associated protein blocks lysosomal targeting of trypanosome lytic factor in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* *5*, 132–139.
- Olias, P., Etheridge, R.D., Zhang, Y., Holtzman, M.J., and Sibley, L.D. (2016). Toxoplasma Effector Recruits the Mi-2/NuRD Complex to Repress STAT1 Transcription and Block IFN- γ -Dependent Gene Expression. *Cell Host Microbe* *20*, 72–82.
- Österlund, P., Jiang, M., Westenius, V., Kuivanen, S., Järvi, R., Kakkola, L., Lundberg, R., Melén, K., Korva, M., Županc, T.A., et al. (2019). Asian and African lineage Zika viruses show differential replication and innate immune responses in human dendritic cells and macrophages. *Sci Rep* *9*, 1–15.
- Panayiotou, C., Lindqvist, R., Kurhade, C., Vonderstein, K., Pasto, J., Edlund, K., Upadhyay, A.S., and Överby, A.K. (2018). Viperin Restricts Zika Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Replication by Targeting NS3 for Proteasomal Degradation. *J. Virol.* *92*.
- Pérez-Morga, D., Vanhollebeke, B., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., Lins, L., Homblé, F., Vanhamme, L., Tebabi, P., Pays, A., Poelvoorde, P., et al. (2005). Apolipoprotein L-I Promotes Trypanosome Lysis by Forming Pores in Lysosomal Membranes. *Science* *309*, 469–472.
- Persaud, M., Martinez-Lopez, A., Buffone, C., Porcelli, S.A., and Diaz-Griffero, F. (2018). Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Virology* *518*, 301–312.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Näslund, T.I., Liljeström, P., Weber, F., and Sousa, C.R. e (2006). RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates. *Science* *314*, 997–1001.
- Piganis, R.A.R., Weerd, N.A.D., Gould, J.A., Schindler, C.W., Mansell, A., Nicholson, S.E., and Hertzog, P.J. (2011). Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) 1 Inhibits Type I Interferon (IFN) Signaling via the Interferon α Receptor (IFNAR1)-associated Tyrosine Kinase Tyk2. *J. Biol. Chem.* *286*, 33811–33818.
- del Pilar Molina-Portela, M., Lugli, E.B., Recio-Pinto, E., and Raper, J. (2005). Trypanosome lytic factor, a subclass of high-density lipoprotein, forms cation-selective pores in membranes. *Molecular and Biochemical Parasitology* *144*, 218–226.
- Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* *5*, 375–386.

- Poelvoorde, P., Vanhamme, L., Abbeele, J.V.D., Switzer, W.M., and Pays, E. (2004). Distribution of apolipoprotein L-I and trypanosome lytic activity among primate sera. *Molecular and Biochemical Parasitology* 134, 155–157.
- Prasad, V.M., Miller, A.S., Klose, T., Sirohi, D., Buda, G., Jiang, W., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2017). Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* 24, 184–186.
- Prokunina-Olsson, L., Muchmore, B., Tang, W., Pfeiffer, R.M., Park, H., Dickensheets, H., Hergott, D., Porter-Gill, P., Mumy, A., Kohaar, I., et al. (2013). A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* 45, 164–171.
- Rastogi, M., Sharma, N., and Singh, S.K. (2016). Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology* 13, 131.
- Reed, W. (1902). Recent Researches concerning the Etiology, Propagation, and Prevention of Yellow Fever, by the United States Army Commission. *J Hyg (Lond)* 2, 101–119.
- Ren, H., Elgner, F., Jiang, B., Himmelsbach, K., Medvedev, R., Ploen, D., and Hildt, E. (2016). The Autophagosomal SNARE Protein Syntaxin 17 Is an Essential Factor for the Hepatitis C Virus Life Cycle. *J Virol* 90, 5989–6000.
- Richard, V., Paoaafaite, T., and Cao-Lormeau, V.-M. (2016). Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10, e0005024.
- Richardson, R.B., Ohlson, M.B., Eitson, J.L., Kumar, A., McDougal, M.B., Boys, I.N., Mar, K.B., Cruz-Rivera, P.C.D.L., Douglas, C., Konopka, G., et al. (2018). A CRISPR screen identifies IFI6 as an ER-resident interferon effector that blocks flavivirus replication. *Nat Microbiol* 3, 1214–1223.
- Riedl, W., Acharya, D., Lee, J.-H., Liu, G., Serman, T., Chiang, C., Chan, Y.K., Diamond, M.S., and Gack, M.U. (2019). Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity. *Cell Host & Microbe* 26, 493-503.e6.
- Rinkenberger, N., and Schoggins, J.W. (2018). Mucolipin-2 Cation Channel Increases Trafficking Efficiency of Endocytosed Viruses. *MBio* 9.
- Rinkenberger, N., and Schoggins, J.W. (2019). Comparative analysis of viral entry for Asian and African lineages of Zika virus. *Virology* 533, 59–67.
- Robinson, M.C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49, 28–32.
- Rosignol, E.D., Peters, K.N., Connor, J.H., and Bullitt, E. (2017). Zika virus induced cellular remodelling. *Cellular Microbiology* 19, e12740.
- Rusinova, I., Forster, S., Yu, S., Kannan, A., Masse, M., Cumming, H., Chapman, R., and Hertzog, P.J. (2013). INTERFEROME v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res* 41, D1040–D1046.
- Rutaganira, F.U., Fowler, M.L., McPhail, J.A., Gelman, M.A., Nguyen, K., Xiong, A., Dornan, G.L., Tavshanjian, B., Glenn, J.S., Shokat, K.M., et al. (2016). Design and Structural Characterization of Potent and Selective Inhibitors of Phosphatidylinositol 4 Kinase IIIβ. *J. Med. Chem.* 59, 1830–1839.

- Saeedi, B.J., and Geiss, B.J. (2013). Regulation of flavivirus RNA synthesis and capping. *WIREs RNA* 4, 723–735.
- Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.-M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., and Gale, M. (2007). Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 582–587.
- Saiz, J.-C., Martín-Acebes, M.A., Bueno-Marí, R., Salomón, O.D., Villamil-Jiménez, L.C., Heukelbach, J., Alencar, C.H., Armstrong, P.K., Ortega-Carvalho, T.M., Mendez-Otero, R., et al. (2017). Zika Virus: What Have We Learnt Since the Start of the Recent Epidemic? *Front. Microbiol.* 8.
- Saleem, M.A., O’Hare, M.J., Reiser, J., Coward, R.J., Inward, C.D., Farren, T., Xing, C.Y., Ni, L., Mathieson, P.W., and Mundel, P. (2002). A Conditionally Immortalized Human Podocyte Cell Line Demonstrating Nephritin and Podocin Expression. *JASN* 13, 630–638.
- Sanchez David, R.Y., Combredet, C., Najburg, V., Millot, G.A., Beauclair, G., Schwikowski, B., Léger, T., Camadro, J.-M., Jacob, Y., Bellalou, J., et al. (2019). LGP2 binds to PACT to regulate RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Sci Signal* 12.
- Santos, J.C., Boucher, D., Schneider, L.K., Demarco, B., Dilucca, M., Shkarina, K., Heilig, R., Chen, K.W., Lim, R.Y.H., and Broz, P. (2020). Human GBP1 binds LPS to initiate assembly of a caspase-4 activating platform on cytosolic bacteria. *Nat Commun* 11, 3276.
- dos Santos, T., Rodriguez, A., Almiron, M., Sanhueza, A., Ramon, P., de Oliveira, W.K., Coelho, G.E., Badaró, R., Cortez, J., Ospina, M., et al. (2016). Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries (Massachusetts Medical Society).
- Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., et al. (2000). Distinct and Essential Roles of Transcription Factors IRF-3 and IRF-7 in Response to Viruses for IFN- α/β Gene Induction. *Immunity* 13, 539–548.
- Savidis, G., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Meraner, P., Guo, Z., Green, S., and Brass, A.L. (2016a). The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. *Cell Reports* 15, 2323–2330.
- Savidis, G., McDougall, W.M., Meraner, P., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Trincucci, G., John, S.P., Aker, A.M., Renzette, N., Robbins, D.R., et al. (2016b). Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Reports* 16, 232–246.
- Schlecker, C., Boehmerle, W., Jeromin, A., DeGray, B., Varshney, A., Sharma, Y., Szigeti-Buck, K., and Ehrlich, B.E. (2006). Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *J. Clin. Invest.* 116, 1668–1674.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014a). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology* 32, 513–545.
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M. (2014b). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481–485.

- Schoggins, J.W., MacDuff, D.A., Imanaka, N., Gainey, M.D., Shrestha, B., Eitson, J.L., Mar, K.B., Richardson, R.B., Ratushny, A.V., Litvak, V., et al. (2014). Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* *505*, 691–695.
- Schwarz, M.C., Sourisseau, M., Espino, M.M., Gray, E.S., Chambers, M.T., Tortorella, D., and Evans, M.J. (2016). Rescue of the 1947 Zika Virus Prototype Strain with a Cytomegalovirus Promoter-Driven cDNA Clone. *MSphere* *1*.
- Seeley, J.J., and Ghosh, S. (2017). Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.* *101*, 107–119.
- Seo, G.J., Kim, C., Shin, W.-J., Sklan, E.H., Eoh, H., and Jung, J.U. (2018). TRIM56-mediated monoubiquitination of cGAS for cytosolic DNA sensing. *Nat Commun* *9*, 1–13.
- Shang, Z., Song, H., Shi, Y., Qi, J., and Gao, G.F. (2018). Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *Journal of Molecular Biology* *430*, 948–962.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* *418*, 646–650.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., et al. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* *4*, 63–68.
- Shi, H.-X., Yang, K., Liu, X., Liu, X.-Y., Wei, B., Shan, Y.-F., Zhu, L.-H., and Wang, C. (2010). Positive Regulation of Interferon Regulatory Factor 3 Activation by Herc5 via ISG15 Modification. *Molecular and Cellular Biology* *30*, 2424–2436.
- Shi, X., Chen, Z., Tang, S., Wu, F., Xiong, S., and Dong, C. (2016). Coxsackievirus B3 infection induces autophagic flux, and autophagosomes are critical for efficient viral replication. *Arch. Virol.* *161*, 2197–2205.
- Siegel, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.-J. (1999). The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* *284*, 1835–1837.
- Silva, N.I.O., Sacchetto, L., de Rezende, I.M., Trindade, G. de S., LaBeaud, A.D., de Thoisy, B., and Drumond, B.P. (2020). Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virology Journal* *17*, 9.
- Sir, D., Kuo, C., Tian, Y., Liu, H.M., Huang, E.J., Jung, J.U., Machida, K., and Ou, J.J. (2012). Replication of Hepatitis C Virus RNA on Autophagosomal Membranes. *J. Biol. Chem.* *287*, 18036–18043.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T.C., Rossmann, M.G., and Kuhn, R.J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* *352*, 467–470.
- Smith, E.E., and Malik, H.S. (2009). The apolipoprotein L family of programmed cell death and immunity genes rapidly evolved in primates at discrete sites of host–pathogen interactions. *Genome Res* *19*, 850–858.
- Smith, D.R., Sprague, T.R., Hollidge, B.S., Valdez, S.M., Padilla, S.L., Bellanca, S.A., Golden, J.W., Coyne, S.R., Kulesh, D.A., Miller, L.J., et al. (2018). African and Asian Zika Virus Isolates Display Phenotypic Differences Both In Vitro and In Vivo. *Am J Trop Med Hyg* *98*, 432–444.

- Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P., and Michiels, T. (2008). IFN-Lambda (IFN- λ) Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells In Vivo. *PLOS Pathogens* 4, e1000017.
- Song, M.M., and Shuai, K. (1998). The Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but Not SOCS2 Proteins Inhibit Interferon-mediated Antiviral and Antiproliferative Activities. *J. Biol. Chem.* 273, 35056–35062.
- Song, Y., Mugavero, J., Stauff, C.B., and Wimmer, E. (2019). Dengue and Zika Virus 5' Untranslated Regions Harbor Internal Ribosomal Entry Site Functions. *MBio* 10.
- Sotelo, J.R., Sotelo, A.B., Sotelo, F.J.B., Doi, A.M., Pinho, J.R.R., Oliveira, R. de C., Bezerra, A.M.P.S., Deutsch, A.D., Villas-Boas, L.S., Felix, A.C., et al. Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy - Volume 23, Number 5—May 2017 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC.
- Stapleford, K.A., Coffey, L.L., Lay, S., Bordería, A.V., Duong, V., Isakov, O., Rozen-Gagnon, K., Arias-Goeta, C., Blanc, H., Beaucourt, S., et al. (2014). Emergence and Transmission of Arbovirus Evolutionary Intermediates with Epidemic Potential. *Cell Host & Microbe* 15, 706–716.
- Stephens, N.A., and Hajduk, S.L. (2011). Endosomal localization of the serum resistance-associated protein in African trypanosomes confers human infectivity. *Eukaryotic Cell* 10, 1023–1033.
- Streicher, F., and Jouvenet, N. (2019). Stimulation of Innate Immunity by Host and Viral RNAs. *Trends Immunol.* 40, 1134–1148.
- Sun, B., Sundström, K.B., Chew, J.J., Bist, P., Gan, E.S., Tan, H.C., Goh, K.C., Chawla, T., Tang, C.K., and Ooi, E.E. (2017). Dengue virus activates cGAS through the release of mitochondrial DNA. *Sci Rep* 7, 1–8.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science* 339, 786–791.
- Szretter, K.J., Brien, J.D., Thackray, L.B., Virgin, H.W., Cresswell, P., and Diamond, M.S. (2011). The Interferon-Inducible Gene viperin Restricts West Nile Virus Pathogenesis. *Journal of Virology* 85, 11557–11566.
- Tanaka, Y., and Chen, Z.J. (2012). STING Specifies IRF3 Phosphorylation by TBK1 in the Cytosolic DNA Signaling Pathway. *Sci. Signal.* 5, ra20–ra20.
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S.C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E.M., et al. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 18, 587–590.
- Tappe, D., Pérez-Girón, J.V., Zammarchi, L., Rissland, J., Ferreira, D.F., Jaenisch, T., Gómez-Medina, S., Günther, S., Bartoloni, A., Muñoz-Fontela, C., et al. (2016). Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol* 205, 269–273.
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., et al. (2003). DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *J Exp Med* 197, 823–829.

- Taylor, D.R., Puig, M., Darnell, M.E.R., Mihalik, K., and Feinstone, S.M. (2005). New Antiviral Pathway That Mediates Hepatitis C Virus Replicon Interferon Sensitivity through ADAR1. *Journal of Virology* *79*, 6291–6298.
- Taylor, H.E., Khatua, A.K., and Popik, W. (2014). The innate immune factor apolipoprotein L1 restricts HIV-1 infection. *J. Virol.* *88*, 592–603.
- Teijaro, J.R., Studer, S., Leaf, N., Kiosses, W.B., Nguyen, N., Matsuki, K., Negishi, H., Taniguchi, T., Oldstone, M.B.A., and Rosen, H. (2016). S1PR1-mediated IFNAR1 degradation modulates plasmacytoid dendritic cell interferon- α autoamplification. *PNAS* *113*, 1351–1356.
- Terhune, S.S., Moorman, N.J., Cristea, I.M., Savaryn, J.P., Cuevas-Bennett, C., Rout, M.P., Chait, B.T., and Shenk, T. (2010). Human cytomegalovirus UL29/28 protein interacts with components of the NuRD complex which promote accumulation of immediate-early RNA. *PLoS Pathog.* *6*, e1000965.
- Thekkinghat, A.A., Yadav, K.K., and Rangarajan, P.N. (2019). Apolipoprotein L9 interacts with LC3/GABARAP and is a microtubule-associated protein with a widespread subcellular distribution. *Biology Open* *8*.
- Thomson, R., and Finkelstein, A. (2015). Human trypanolytic factor APOL1 forms pH-gated cation-selective channels in planar lipid bilayers: Relevance to trypanosome lysis. *PNAS* *112*, 2894–2899.
- Thomson, S.J.P., Goh, F.G., Banks, H., Krausgruber, T., Kotenko, S.V., Foxwell, B.M.J., and Udalova, I.A. (2009). The role of transposable elements in the regulation of IFN- λ 1 gene expression. *PNAS* *106*, 11564–11569.
- Tsai, Y.-T., Chang, S.-Y., Lee, C.-N., and Kao, C.-L. (2009). Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cellular Microbiology* *11*, 604–615.
- Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., McGee, C.E., and Higgs, S. (2007). A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLOS Pathogens* *3*, e201.
- Upadhyay, A.S., Vonderstein, K., Pichlmair, A., Stehling, O., Bennett, K.L., Dobler, G., Guo, J.-T., Superti-Furga, G., Lill, R., Överby, A.K., et al. (2014). Viperin is an iron-sulfur protein that inhibits genome synthesis of tick-borne encephalitis virus via radical SAM domain activity. *Cell. Microbiol.* *16*, 834–848.
- Uzureau, P., Uzureau, S., Lecordier, L., Fontaine, F., Tebabi, P., Homblé, F., Grélard, A., Zhendre, V., Nolan, D.P., Lins, L., et al. (2013). Mechanism of *Trypanosoma brucei* gambiense resistance to human serum. *Nature* *501*, 430–434.
- Uzureau, S., Coquerelle, C., Vermeiren, C., Uzureau, P., Acker, A.V., Pilotte, L., Monteyne, D., Acolty, V., Vanhollebeke, B., Eynde, B.V. den, et al. (2016). Apolipoproteins L control cell death triggered by TLR3/TRIF signaling in dendritic cells. *European Journal of Immunology* *46*, 1854–1866.
- Uzureau, S., Lecordier, L., Uzureau, P., Hennig, D., Graversen, J.H., Homblé, F., Mfutu, P.E., Oliveira Arcolino, F., Ramos, A.R., La Rovere, R.M., et al. (2020). APOL1 C-Terminal Variants May Trigger Kidney Disease through Interference with APOL3 Control of Actomyosin. *Cell Reports* *30*, 3821-3836.e13.
- Valente, G., Ozmen, L., Novelli, F., Geuna, M., Palestro, G., Forni, G., and Garotta, G. (1992). Distribution of interferon- γ receptor in human tissues. *European Journal of Immunology* *22*, 2403–2412.

- Valentine, M.J., Murdock, C.C., and Kelly, P.J. (2019). Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasit Vectors* 12, 463.
- Van der Hoek, K.H., Eyre, N.S., Shue, B., Khantisitthiporn, O., Glab-Ampi, K., Carr, J.M., Gartner, M.J., Jolly, L.A., Thomas, P.Q., Adikusuma, F., et al. (2017). Viperin is an important host restriction factor in control of Zika virus infection. *Sci Rep* 7.
- Vandergaast, R., and Fredericksen, B.L. (2012). West Nile Virus (WNV) Replication Is Independent of Autophagy in Mammalian Cells. *PLOS ONE* 7, e45800.
- Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D.P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Jacquet, A., et al. (2003). Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 422, 83–87.
- Vanhollebeke, B., and Pays, E. (2006). The function of apolipoproteins L. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1937–1944.
- Vanhollebeke, B., Muylder, G.D., Nielsen, M.J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S.K., and Pays, E. (2008). A Haptoglobin-Hemoglobin Receptor Conveys Innate Immunity to *Trypanosoma brucei* in Humans. *Science* 320, 677–681.
- Vanwalleghem, G., Fontaine, F., Lecordier, L., Tebabi, P., Klewe, K., Nolan, D.P., Yamaryo-Botté, Y., Botté, C., Kremer, A., Burkard, G.S., et al. (2015). Coupling of lysosomal and mitochondrial membrane permeabilization in trypanolysis by APOL1. *Nat Commun* 6, 1–10.
- Vanwalscappel, B., Tada, T., and Landau, N.R. (2018). Toll-like receptor agonist R848 blocks Zika virus replication in human monocytes by inducing the antiviral protein viperin. *Virology* 522, 199–208.
- Vanwalscappel, B., Gadea, G., and Desprès, P. (2019). A Viperin Mutant Bearing the K358R Substitution Lost its Anti-ZIKA Virus Activity. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1574.
- Vasilakis, N., and Weaver, S.C. (2017). Flavivirus transmission focusing on Zika. *Current Opinion in Virology* 22, 30–35.
- Victora, C.G., Schuler-Faccini, L., Matijasevich, A., Ribeiro, E., Pessoa, A., and Barros, F.C. (2016). Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? *The Lancet* 387, 621–624.
- Voss, S., and Nitsche, C. (2020). Inhibitors of the Zika virus protease NS2B-NS3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 30, 126965.
- Wan, G., Zhaorigetu, S., Liu, Z., Kaini, R., Jiang, Z., and Hu, C.A. (2008). Apolipoprotein L1, a Novel Bcl-2 Homology Domain 3-only Lipid-binding Protein, Induces Autophagic Cell Death. *J. Biol. Chem.* 283, 21540–21549.
- Wang, J., Liu, J., Zhou, R., Ding, X., Zhang, Q., Zhang, C., and Li, L. (2018). Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 497, 619–625.
- Wang, J.P., Liu, P., Latz, E., Golenbock, D.T., Finberg, R.W., and Libraty, D.H. (2006). Flavivirus Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells Delineates Key Elements of TLR7 Signaling beyond Endosomal Recognition. *The Journal of Immunology* 177, 7114–7121.

- Wang, X., Hinson, E.R., and Cresswell, P. (2007). The Interferon-Inducible Protein Viperin Inhibits Influenza Virus Release by Perturbing Lipid Rafts. *Cell Host & Microbe* 2, 96–105.
- Wathelet, M.G., Lin, C.H., Parekh, B.S., Ronco, L.V., Howley, P.M., and Maniatis, T. (1998). Virus Infection Induces the Assembly of Coordinately Activated Transcription Factors on the IFN- β Enhancer In Vivo. *Molecular Cell* 1, 507–518.
- Wells, A.I., and Coyne, C.B. (2018). Type III Interferons in Antiviral Defenses at Barrier Surfaces. *Trends in Immunology* 39, 848–858.
- WHO, 2018. Dengue vaccine: WHO position paper - September 2018. [WWW Document] URL <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274315/WER9336.pdf?ua=1>
- WHO, 2019. Yellow fever – Nigeria. [WWW Document] <https://www.who.int/csr/don/17-december-2019-yellow-fever-nigeria/en/> (accessed 19.03.20)
- WHO, 2020a. Yellow fever. [WWW Document] URL <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever> (accessed 19.03.20)
- WHO, 2020b. Microcéphalie. [WWW Document] URL <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/microcephaly> (accessed 19.03.20)
- WHO 2020c. Syndrome de Guillain-Barré. [WWW Document] URL <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/guillain-barr%C3%A9-syndrome> (accessed 19.03.20)
- Wilson-Zbinden, C., Santos, A.X. da S. dos, Stoffel-Studer, I., Vaart, A. van der, Hofmann, K., Reggiori, F., Riezman, H., Kraft, C., and Peter, M. (2015). Autophagy Competes for a Common Phosphatidylethanolamine Pool with Major Cellular PE-Consuming Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 199, 475–485.
- Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B.M., and Luo, H. (2008). Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *J. Virol.* 82, 9143–9153.
- Wu, D., Milutinovic, M.D., and Walt, D.R. (2015). Single molecule array (Simoa) assay with optimal antibody pairs for cytokine detection in human serum samples. *Analyst* 140, 6277–6282.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013a). Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science* 339, 826–830.
- Wu, X., Wang, H., Bai, L., Yu, Y., Sun, Z., Yan, Y., and Zhou, J. (2013b). Mitochondrial proteomic analysis of human host cells infected with H3N2 swine influenza virus. *Journal of Proteomics* 91, 136–150.
- Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., Yang, H., and Cui, J. (2017). Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discov* 3, 1–14.
- Wu, Y., Yang, X., Yao, Z., Dong, X., Zhang, D., Hu, Y., Zhang, S., Lin, J., Chen, J., An, S., et al. (2020). C19orf66 interrupts Zika virus replication by inducing lysosomal degradation of viral NS3. *PLoS Negl Trop Dis* 14, e0008083.
- Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A.E., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., Zou, J., Xie, X., Giraldo, M.I., Vasconcelos, P.F.C., et al. (2018a). An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat Commun* 9, 1–13.

- Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A.E., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., Zou, J., Xie, X., Giraldo, M.I., Vasconcelos, P.F.C., et al. (2018b). An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat Commun* 9, 414.
- Xu, K., and Nagy, P.D. (2015). RNA virus replication depends on enrichment of phosphatidylethanolamine at replication sites in subcellular membranes. *PNAS* 112, E1782–E1791.
- Xu, Z., and Hobman, T.C. (2012). The helicase activity of DDX56 is required for its role in assembly of infectious West Nile virus particles. *Virology* 433, 226–235.
- Xu, S., Ci, Y., Wang, L., Yang, Y., Zhang, L., Xu, C., Qin, C., and Shi, L. (2019). Zika virus NS3 is a canonical RNA helicase stimulated by NS5 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 47, 8693–8707.
- Yamane, D., Feng, H., Rivera-Serrano, E.E., Selitsky, S.R., Hirai-Yuki, A., Das, A., McKnight, K.L., Misumi, I., Hensley, L., Lovell, W., et al. (2019). Basal expression of interferon regulatory factor 1 drives intrinsic hepatocyte resistance to multiple RNA viruses. *Nat Microbiol* 4, 1096–1104.
- Yang, Q., You, J., Zhou, Y., Wang, Y., Pei, R., Chen, X., Yang, M., and Chen, J. (2020). Tick-borne encephalitis virus NS4A ubiquitination antagonizes type I interferon-stimulated STAT1/2 signaling pathway. *Emerging Microbes & Infections* 0, 1–39.
- Ye, Q., Liu, Z.-Y., Han, J.-F., Jiang, T., Li, X.-F., and Qin, C.-F. (2016). Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infection, Genetics and Evolution* 43, 43–49.
- Yin, K., Li, Y., Ma, Z., Yang, Y., Zhao, H., Liu, C., Jin, M., Wudong, G., Sun, Y., Hang, T., et al. (2020). SNAP25 regulates the release of the Rabies virus in nerve cells via SNARE complex-mediated membrane fusion. *Veterinary Microbiology* 245, 108699.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., et al. (2005). Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *The Journal of Immunology* 175, 2851–2858.
- Young, P.R. (2018). Arboviruses: A Family on the Move. In *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*, R. Hilgenfeld, and S.G. Vasudevan, eds. (Singapore: Springer), pp. 1–10.
- Yu, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., and Chen, J. (2008). Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science* 319, 1834–1837.
- Yu, J., Liang, C., and Liu, S.-L. (2017). Interferon-inducible LY6E Protein Promotes HIV-1 Infection. *J. Biol. Chem.* 292, 4674–4685.
- Yuan, L., Huang, X.-Y., Liu, Z.-Y., Zhang, F., Zhu, X.-L., Yu, J.-Y., Ji, X., Xu, Y.-P., Li, G., Li, C., et al. (2017a). A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* 358, 933–936.
- Yuan, S., Chan, J.F.-W., den-Haan, H., Chik, K.K.-H., Zhang, A.J., Chan, C.C.-S., Poon, V.K.-M., Yip, C.C.-Y., Mak, W.W.-N., Zhu, Z., et al. (2017b). Structure-based discovery of clinically approved drugs as Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors that potently inhibit Zika virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* 145, 33–43.

- Zanluca, C., Melo, V.C.A. de, Mosimann, A.L.P., Santos, G.I.V. dos, Santos, C.N.D. dos, Luz, K., Zanluca, C., Melo, V.C.A. de, Mosimann, A.L.P., Santos, G.I.V. dos, et al. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* *110*, 569–572.
- Zhang, X., Shi, H., Wu, J., Zhang, X., Sun, L., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP Containing Mixed Phosphodiester Linkages Is An Endogenous High-Affinity Ligand for STING. *Molecular Cell* *51*, 226–235.
- Zhang, X., Wu, J., Du, F., Xu, H., Sun, L., Chen, Z., Brautigam, C.A., Zhang, X., and Chen, Z.J. (2014). The Cytosolic DNA Sensor cGAS Forms an Oligomeric Complex with DNA and Undergoes Switch-like Conformational Changes in the Activation Loop. *Cell Reports* *6*, 421–430.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* *13*, 1924–1935.
- Zhao, B., Yi, G., Du, F., Chuang, Y.-C., Vaughan, R.C., Sankaran, B., Kao, C.C., and Li, P. (2017). Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nat Commun* *8*, 1–9.
- Zhao, H., Lin, W., Kumthip, K., Cheng, D., Fusco, D.N., Hofmann, O., Jilg, N., Tai, A.W., Goto, K., Zhang, L., et al. (2012). A functional genomic screen reveals novel host genes that mediate interferon-alpha's effects against hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* *56*, 326–333.
- Zhao, X., Várnai, P., Tuymetova, G., Balla, A., Tóth, Z.E., Oker-Blom, C., Roder, J., Jeromin, A., and Balla, T. (2001). Interaction of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) with phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and affects membrane trafficking in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 40183–40189.
- Zheng, Y., Liu, Q., Wu, Y., Ma, L., Zhang, Z., Liu, T., Jin, S., She, Y., Li, Y.-P., and Cui, J. (2018). Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1-caspase-1 axis. *The EMBO Journal* *37*, e99347.
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K.A., Shi, P.-Y., and Li, H. (2007). Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *Journal of Virology* *81*, 3891–3903.
- Zhou, Z., Jiang, X., Liu, D., Fan, Z., Hu, X., Yan, J., Wang, M., and Gao, G.F. (2009). Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy* *5*, 321–328.