



Mécanismes déployés par le virus Zika dans le contrôle de l'apoptose lors de l'infection

Jonathan Turpin

► To cite this version:

Jonathan Turpin. Mécanismes déployés par le virus Zika dans le contrôle de l'apoptose lors de l'infection. Virologie. Université de la Réunion, 2021. Français. NNT: 2021LARE0017. tel-03403907

HAL Id: tel-03403907

<https://theses.hal.science/tel-03403907>

Submitted on 26 Oct 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

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de La Réunion

Ecole doctorale

Science, Technologies et Santé

Discipline : Biologie Santé, Biochimie

Unité mixte de Recherche

INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249 Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical

Mécanismes déployés par le virus Zika dans le contrôle de l'apoptose lors de l'infection

Présentée pour soutenance le 5 Juillet 2021

Jonathan TURPIN

Pr. Laurent CHATEL-CHAIX

Pr. Joëlle SOBCZAK-THEPOT

Pr. Yves GAUDIN

Dr. Cécile VINDIS

Pr. Christian LEFEBVRE-D'HELLENCOURT

Dr. Wildriss VIRANAICKEN

Dr. Pascale KREJBICH-TROTOT

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Co-directeur de thèse

Directrice de thèse

Résumé :

Le but de mon travail de thèse a été de caractériser les interactions entre le virus Zika (ZIKV) et son hôte humain en étudiant plusieurs réponses cellulaires, l'apoptose et l'UPR au cours de l'infection *in vitro* de cellules épithéliales et de discuter des conséquences physiopathologiques du contrôle que le virus semble exercer sur ces réponses. Le ZIKV est un arbovirus appartenant au genre flavivirus, transmis principalement par les moustiques du genre *Aedes* et responsable de la maladie à virus Zika. ZIKV connu depuis les années 1950 était réputé responsable de cas sporadiques en Afrique et l'infection était considérée comme bénigne, ne se manifestant que par des symptômes pseudo-grippaux légers (éruptions cutanées, fièvre, arthralgie). ZIKV a subitement mobilisé l'attention internationale en raison de son émergence en Asie en 2007 suivie d'une propagation épidémique fulgurante ayant touché plusieurs millions de personnes de par le monde en moins de 10 ans dont la grande majorité en 2015-2016 au Brésil. Il a également été identifié comme urgence de santé publique par l'OMS en 2015 en raison de l'augmentation de formes neurologiques graves comme le syndrome de Guillain-Barré (GBS) chez les adultes et de syndromes congénitaux (SCZ) jusque-là ignorés comme la microcéphalie chez les nouveau-nés de mères infectées pendant la grossesse. Les mécanismes moléculaires de l'émergence épidémique et de la pathogénicité de ce virus n'avaient que très peu été étudiés avant l'épidémie brésilienne de 2015. L'effet cytopathique induit par le virus dans les cellules hôtes joue un rôle majeur dans la pathogenèse tout en étant ambigu car il conditionne la résolution de l'infection en permettant l'élimination du pathogène. En caractérisant la mort cellulaire programmée au cours de la cinétique d'infection j'ai pu montrer que celle-ci est retardée et que ZIKV est

capable de maintenir un état anti-apoptotique qui lui est favorable en stabilisant la protéine Bcl-2. J'ai également mis en évidence que ZIKV était en mesure de moduler l'UPR en réponse au stress du RE et d'interférer avec le programme pro-apoptotique dirigé par le facteur CHOP. Ces données montrent l'importance du contrôle que le virus peut exercer sur les principales réponses cellulaires antivirales et apportent des pistes d'explication de certaines spécificités du virus ZIKV telles que la persistance virale observée dans certains tissus. Elles ouvrent des perspectives dans l'utilisation de ces propriétés virales singulières pour traiter des pathologies en lien avec le stress du RE et l'apoptose.

Abstract :

The goal of this thesis was to characterize the interactions between Zika virus (ZIKV) and its human host by studying several cellular responses, apoptosis, and Unfold protein responses UPR during *in vitro* infection of epithelial cells and to discuss the pathophysiological consequences in the modulation of viral infection. ZIKV is an arbovirus belonging to the genus *flavivirus*, transmitted primarily by *Aedes* mosquitoes and responsible for Zika virus disease. ZIKV was discovered in the 1950's and was thought to cause sporadic disease in Africa, where infections were considered mild, manifesting only as mild flu-like symptoms (rash, fever, arthralgia). ZIKV suddenly gained international attention due to its emergence in Asia in 2007 followed by a very dramatic epidemic spread that affected several million people worldwide in less than 10 years, the vast majority in 2015-2016 in Brazil. It was also identified as a public health emergency by WHO in 2015 due to the increase in severe neurological sequelae such as Guillain-Barré syndrome in adults and previously unknown congenital syndromes (SCZ) such as microcephaly in newborns of mothers infected during

pregnancy. The molecular mechanisms associated with epidemic emergence and pathogenicity of ZIKV had been only minimally studied before the 2015 Brazilian epidemic. The cytopathic effect induced by the virus in host cells plays a major role in pathogenesis, but is also beneficial, promoting the body's elimination of the virus and the eventual resolution of infection. By characterizing programmed cell death during *in vitro* infection kinetics, I was able to show that apoptosis is delayed by ZIKV infection, allowing the virus to maintain a favorable anti-apoptotic state through the stabilization of the Bcl-2 protein. I also demonstrated that ZIKV was able to modulate the UPR in response to ER stress and interfere with the pro-apoptotic program driven by CHOP factor. These data demonstrate the important rôle of cellular hijacking during certain viral infections, and shed light on some of the mechanisms that could lead to the persistence of ZIKV infections and ZIKV disease symptoms. My findings additionally identify cellular pathways specific to ER stress and apoptosis as potential drug targets for the treatment of ZIKV infections.

Publications en premier auteur :

Turpin, Jonathan, Etienne Frumence, Wissal Harrabi, Chaker El Kalamouni, Philippe Desprès, Pascale Krejbich-Trotot, et Wildriss Viranaïcken. « Crosstalk Between Endoplasmic Reticulum Stress and The Unfolded Protein Response During ZIKA Virus Infection », 2 octobre 2019. <https://doi.org/10.20944/preprints201910.0024.v1>.

Turpin, Jonathan, Daed El-Safadi, Grégoire Lebeau, Etienne Frumence, Philippe Desprès, Wildriss Viranaïcken, et Pascale Krejbich-Trotot. « CHOP Pro-Apoptotic Transcriptional Program in Response to ER Stress Is Hacked by Zika Virus ». *International Journal of Molecular Sciences* 22, n° 7 (janvier 2021): 3750. <https://doi.org/10.3390/ijms22073750>.

Turpin, Jonathan, Etienne Frumence, Philippe Desprès, Wildriss Viranaïcken, et Pascale Krejbich-Trotot. « The ZIKA Virus Delays Cell Death Through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins ». *Cells* 8, n° 11 (novembre 2019): 1338. <https://doi.org/10.3390/cells8111338>.

Turpin, Jonathan, Etienne Frumence, Daed El Safadi, Olivier Meilhac, Pascale Krejbich-Trotot, et Wildriss Viranaïcken. « Improvement of Immunodetection of the Transcription Factor C/EBP Homologous Protein by Western Blot ». *Analytical Biochemistry* 601 (15 juillet 2020): 113775. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113775>.

Turpin, Jonathan, Etienne Frumence, Wissal Harrabi, Juliano G. Haddad, Chaker El Kalamouni, Philippe Desprès, Pascale Krejbich-Trotot, et Wildriss Viranaïcken. « Zika Virus Subversion of Chaperone GRP78/BiP Expression in A549 Cells during UPR Activation ». *Biochimie* 175 (1 août 2020): 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.011>.

Publications en tant que co-auteur :

Bos, Sandra, Wildriss Viranaïcken, **Jonathan Turpin**, Chaker El-Kalamouni, Marjolaine Roche, Pascale Krejbich-Trotot, Philippe Desprès, et Gilles Gadea. « The Structural Proteins of Epidemic and Historical Strains of Zika Virus Differ in Their Ability to Initiate Viral Infection in Human Host Cells ». *Virology* 516 (2018): 265-73. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.003>.

El Kalamouni, Chaker, Etienne Frumence, Sandra Bos, **Jonathan Turpin**, Brice Nativel, Wissal Harrabi, David A. Wilkinson, et al. « Subversion of the Heme Oxygenase-1 Antiviral Activity by Zika Virus ». *Viruses* 11, n° 1 (20 décembre 2018). <https://doi.org/10.3390/v11010002>.

Lebeau, Grégoire, Etienne Frumence, **Jonathan Turpin**, Floran Begue, Jean-Jacques Hoarau, Gilles Gadea, Pascale Krejbich-Trotot, Philippe Desprès, et Wildriss Viranaïcken. « Zika E Glycan Loop Region and Guillain–Barré Syndrome-Related Proteins: A Possible Molecular Mimicry to Be Taken in Account for Vaccine Development ». *Vaccines* 9, n° 3 (mars 2021): 283. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030283>.

Pascalis, Hervé, **Jonathan Turpin**, Marjolaine Roche, Pascale Krejbich, Gilles Gadea, Célestine Atyame Nten, Philippe Desprès, et Patrick Mavingui. « The epidemic of Dengue virus type-2 Cosmopolitan genotype on Reunion Island relates to its active circulation in the Southwestern Indian Ocean neighboring islands ». *Heliyon* 5, n° 4 (10 avril 2019). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01455>.

Remerciements:

Je remercie tout d'abord ceux qui ont participé aux révisions de mon manuscrit et à ma soutenance. C'est un immense honneur de pouvoir compter sur des rapporteurs ayant autant d'expérience dans leur domaine. Donc merci au Professeur CHATEL-CHAIX d'avoir répondu pendant ses congés à cette demande et au professeur SOBCZAK-THEPOT pour avoir accepté de prendre le temps d'analyser mon manuscrit. Merci aux examinateurs, le Pr. Yves GAUDIN, Pr. Christian LEFEBVRE D'HELLEN COURT et Dr. Cécile VINDIS et à tous les membres du jury d'avoir accepté d'échanger et d'enrichir ma soutenance.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr. David WILKINSON (pour faire partie de mon comité et pour ses nombreuses relectures critiques de mes manuscrits), le Dr. Mélanie DENIZOT et le Dr. Jean-Loup BASCANDS, pour m'avoir offert des discussions enrichissantes qui m'ont encouragé à poursuivre mes efforts pour aboutir à cette soutenance.

Je vais évidemment remercier mon laboratoire d'accueil, l'UMR PIMIT, qui m'a donné l'opportunité de poursuivre en thèse sur un sujet qui me passionne. Ce laboratoire est un vrai réservoir de connaissances, mêlant expérience et ouverture d'esprit sur de nombreux sujets scientifiques. Je remercie donc le directeur d'unité, le Dr. Patrick MAVINGUI, qui a toujours placé l'intérêt des étudiants et leurs conditions de travail comme une priorité, en particulier lors des différents conseils de l'école doctorale où j'ai eu la chance de siéger en tant que représentant élu des doctorants.

Dans ce laboratoire j'ai pu côtoyer des chercheurs d'exception, avec un humour à toute épreuve, puisqu'ils ont pu supporter mes vanes pourries pendant près de 4 ans. Dans l'équipe DYSIIS, merci à Célestine ATYAME N'TEN, qui a accepté d'être ma co-directrice au départ, pour la partie entomologique, qui n'a pas pu se faire, mais qui m'a permis d'avoir une vision plus large de mon sujet. Merci au Dr. Camille LEBARBENCHON, et sa dream team 'viraupéculaire' auprès de qui j'ai pu en apprendre énormément sur l'écologie virale de la faune sauvage. Merci au Dr. Hervé PASCALIS, avec qui j'ai appris de nombreuses choses sur la 'vraie' virologie et l'isolement de virus et avec qui j'ai aussi beaucoup ri. Chez MOCA

(ex-I2T, ex-ex-GRII), je remercie le Pr. Philippe DESPRES pour m'avoir énormément appris sur les *Flavivirus*. Je remercie le Dr. Chaker El-KALAMOUNI, pour ses connaissances sur la phytochimie, les antiviraux et surtout pour sa bonne humeur. Le Dr. Jean-Jacques HOARAU, pour ses cours sur l'immunologie et pour avoir essayé de me protéger de la thèse en disant à ma femme que la thèse serait pire que le master. Le Dr. Gilles GADEA pour ses questions sur toutes les présentations des étudiants. Le Dr. Marjolaine ROCHE pour ses conseils toujours bienveillants.

Merci à tous les enseignants qui m'ont donné l'envie de faire ce métier le Dr. Fabrice GARDEBIEN (son exigence et sa rigueur m'ont permis d'acquérir des bases solides en biochimie), merci au professeur Christian LEFEBVRE-D'HELLEN COURT de m'avoir fait douter de mes réponses aux examens, mais toujours avec bienveillance, le Pr. Philippe GASQUE pour ses cours de l'immunologie innée et les réponses antivirales passionnantes, le Dr. Loïc RAFFRAY, pour le volet clinique en Master.

Je remercie maintenant mes directeurs de thèse, le Dr. Pascale KREJBICH-TROTOT (Ne pas prononcer le 'J' surtout !) et le Dr. Wildriss VIRANAICKEN. Je crois que jamais les mots que j'utiliserai auront la portée nécessaire pour décrire toute la reconnaissance que j'ai pour eux. Hormis bien évidemment leurs compétences scientifiques indiscutables, humainement, aucune personne existante ne pourrait leur arriver à la cheville. En écrivant ces remerciements, je n'ai qu'un regret, l'impression qu'ils méritaient un meilleur doctorant.

La première fois que j'ai vu Pascale en première année de médecine, faire son cours sur la biologie cellulaire en lien avec le CHIKV, j'ai su que ça serait un chercheur comme elle, que je voudrais devenir, un chercheur passionné. Je me suis donc toujours donné à fond dans mes études supérieures, grâce à elle. Elle n'en a pas conscience, mais elle m'a donné un objectif professionnel et personnel. Alors oui, un jour, sous la pression de mes collègues de master, je lui ai dit que ça ne servirait à rien de venir faire cours puisqu'on ne viendrait pas. Mais j'ai au moins pu marquer son esprit ce jour-là. Puisque 1 an plus tard, je me retrouve en stage sous sa supervision. L'illusion était parfaite, j'étais arrivé je ne sais comment à finir major de promo sur la licence et le master (peut être grâce à des clins d'œil ?), elle accepte ensuite de me prendre en thèse, j'y étais enfin. Seule comptait l'opinion que pourrait avoir Pascale.

Merci encore pour tous tes enseignements, et les échanges, sans jamais limiter mes réflexions.

Wildriss c'est le couteau suisse d'une équipe de recherche, que dis-je, une équipe de recherche à lui seul. Sollicité par toutes les équipes du plateau technique. La première rencontre se fait en licence, sa pédagogie est... atypique. Néanmoins, dès le premier contact, on sent l'immense connaissance accumulée. Toujours armé d'un 'moukatage', il a le don de vous faire percuter les aspects les plus abstraits de la biochimie. La pression est énorme sous son encadrement, on est souvent écrasé par sa polyvalence et les nombreux projets sur lesquels il collabore, mais ça en fait l'expérience la plus enrichissante qui soit.

Merci d'avoir participé à ma formation, si je deviens un dixième de ce que vous êtes j'aurais accompli mes objectifs.

Je remercie bien sûr tous ceux qui m'ont supporté pendant ces années, Magalie, Céline, Etienne, Elodie, Colette, Léa. Les collègues de chez DéTrois dont Stéphane et la team 'ti pipe', Janice et les autres. La team Liban, en particulier Daed, la bienveillance incarnée.

Particulièrement, je vais remercier les sardines, Eva (toujours là pour briser votre estime de vous, mais toujours généreuse) Riana (Rin) pour m'avoir découragé d'aller vivre à Madagascar et tous les autres sardines et futures sardines, qui me rappellent que d'autres souffriront après moi.

Parmi ceux-là, Roger et les chatons. Merci à eux, toujours là pour vous soutenir, toujours là pour les situations les plus gênantes, pour les fous rires à la cafet, pour l'absence de discrétion totale, pour cette bonne ambiance dans la boîte des sardines. Axel, la mémoire, certainement le chercheur le plus abouti de nous quatre, mais aussi le plus humain sûrement, un soutien indéfectible, une loyauté sans faille. Jason, le pragmatisme, la neutralité, 'bradaframanadamada', dit le gênant, merci pour les discussions sur des sujets divers et variés et avec qui j'ai pu échanger ma culture geek, et les débats toujours très constructifs. Merci Marie dit Roger, tu as été d'un grand soutien dans cette dernière ligne droite. Une liberté d'être et de penser qui n'égale nulle autre. Merci d'avoir activé mes caspases 12

pendant tes pauses clopes. Vous faites partie des gens qui font grandir (même si pour moi c'est mort), mais surtout des personnes qu'on n'oublie jamais.

Bien sûr qu'aurai-je fait sans ma famille ? Merci mes parents qui m'ont fait, si ils voient ce manuscrit un jour, j'espère qu'ils en seront fier. Merci mes beaux-parents Nadia et Jacky, qui me supportent depuis près de 14 ans maintenant. Ils m'ont permis d'arriver là où je suis en nous accompagnant pendant mes études.

Merci Leslie, ma femme, qui je ne sais pas pourquoi continue de persister à rester avec moi. La vie d'un doctorant est loin d'être compatible avec une vie de famille, sans compter les autres problèmes qui nous sont tombés dessus. Merci d'avoir supporté cette pression et d'être toujours là pour moi, j'espère que tu tiendras encore un moment. Sans toi à la maison j'aurais pu abandonner depuis longtemps.

Enfin merci mon petit ange, ma fille Olivia. Tu es arrivée en même temps que le début de ma thèse. Je me rappellerai toujours mon mémoire de fin d'étude fini à la maternité. Tu es, ma force de vivre, ma motivation pour avancer et faire au mieux, ma priorité, une source d'énergie inépuisable. Les sacrifices professionnels et personnels que j'ai pu faire, n'en ont pas été puisque c'était pour toi. Pour toi je serai le prince, la princesse, une fée ou un chevalier, tant que tu es heureuse et fière de moi. Merci ma patatouille .

Merci à ceux qui ne sont pas cités mais qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Sommaire:

I. 1

A. 3

1. 3

a) 3

b) 4

2. 7

a) 7

i) 7

ii) 9

b) 11

i) 11

ii) 12

3. 13

4. 15

5. 18

a) 18

b) 21

6. 22

a) 22

b) 25

7. 26

a) 26

b) 29

c) 31

d) 32

(i) 33

(ii) 33

(iii) 33

B. 35

1. 36

a) 36

b) 37

2. 40

a) 40

b) 41

3. 44

a) 44

b) 45

c) 47

d) 49

4. 51

a) 51

b) 52

5. 53

a) 53

b) 54

6. 58

a) 58

b) 59

C. 61

1. 61

a) 61

b) 62

c) 63

d) 64

2. 65

a) 65

b) 66

c) 68

3. 69

a) 69

b) 70

4. 71

a) 71

b) 72

c) 73

5. 74

a) 74

b) 75

6. 76

a) 76

b) 77

c) 78

7. 79

8. 82

II. 86

III. 88

A. 92

1. 93

2. 95

3. 120

B. 124

1. 124

2. 125

3. 134

c. 138

1. 138

2. 140

3. 145

4. 146

5. 165

IV. 168

V. 173

RÉFÉRENCES:

177

Liste des Figures :

Figure 1. Carte des pays ayant rapporté des cas de Zika dans le monde

Figure 2. Analyse phylogénétique de souche du virus Zika

Figure 3. Transmission des arboviroses par les moustiques.

Figure 4. Carte de répartition mondiale actuelle et prédictive des vecteurs Aedes

Figure 5. Données virologiques et immunologiques et diagnostic de l'infection par ZIKV.

Figure 6. Manifestations cliniques de l'infection par virus Zika.

Figure 7. Cibles de composés antiviraux lors de l'infection par virus Zika.

Figure 8. Structure et maturation des flavivirus

Figure 9. Cycle viral chez les flavivirus

Figure 10. Tropisme de ZIKV

Figure 11. Réponses cellulaires innée et adaptative lors d'une infection virale.

Figure 12. Système du complément lors de l'infection par flavivirus.

Figure 13. Mécanisme d'aggravation de l'infection médié par les anticorps.

Figure 14. Cascade de signalisation des IFNs.

Figure 15. Expression des gènes stimulés par l'interféron.

Figure 16. Voies de signalisation de l'UPR.

Figure 17. Les caspases et leurs fonctions

Figure 18. Les protéines de la famille Bcl-2

Figure 19. Schéma de l'activation de l'apoptose intrinsèque par les protéines à domaine BH3

Figure 20. Voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose

Figure 21. Mécanisme d'action des inhibiteurs d'apoptose (IAP) et leurs répresseurs

Figure 22. Mécanisme antiviral des foyers apoptotiques dans les épithéliums de moustique

Figure 23. Induction de l'apoptose par les flavivirus dans les cellules humaines

Figure 24. Technologie d'amplicons subgénomiques infectieux (ISA)

Figure 25. Schéma de virus chimérique obtenu par ISA

Figure 26. Apoptose viro induite dans les cellules infectées par les virus Zika africain (MR766) et Brésilien (BR15) et leurs virus chimériques.

Figure 27. Schéma du réplicon ZIKV obtenu par ISA.

Figure 28. Progénie virale dans les U251MG infectées par ZIKV.

Figure 29. Immunoblot de Bcl-2 et des protéines ubiquitinylées dans les cellules A549.

Figure 30. Les protéines d'enveloppe forment des agrégats liés de manière covalente par des ponts disulfures.

Figure 31. Schéma récapitulatif du contrôle de l'UPR et de l'apoptose par ZIKV.

Figure 32. Impact du retard de mort cellulaire et de la formation d'agrégat dans la pathogenèse et le cycle viral.

Listes des abréviations:

ADE	Antibody-dependant enhancement
AeDronc	Aedes Dronc
AeIAP1	Aedes Inhibitor of apoptosis protein 1
ALR	AIM2 like receptors
APAF1	Apoptotic protease-activating factor 1
APC	Antibody producing cells
ARN	Acide ribonucléique
ASC domain	Apoptosis associated speck like protein containing a caspase recruitment
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF	Activating transcription factor
Atg	Autophagy related
Bak	Bcl-2 antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B cell CLL/lymphoma 2
BH	Bcl-2 Homology domain
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2-like protein 11
BIR	Baculovirus IAP Repeat domain
CARD	Caspase recruitment domain
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
CHOP	C/EBP Homologous protein
c-IAP	Cellular inhibitor of apoptosis protein

CMH	Complexe majeure d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DAMP	Danger associated molecular pattern
DC	Dendritic cells
DC-SIGN integrin	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DENV	Dengue virus
DISC	Death inducing signal complex
DR4/5	Death receptor 4/5
EBV	Epstein Barr virus
EGF	Epidermal growth factor
eIF2α	Eucaryotic translation initiation factor 2 alpha
ELOVL7	Elongation of very long chain fatty acids protein 7
ERAD	Endoplasmic reticulum associated degradation
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FAM134B	Reticulophagy regulator 1
FasL	Fas ligand
FGF	Fibroblast growth factor
cFLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
GADD34	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34
GAS6	Growth Arrest Specific 6
GRP78	Glucose related protein 78
GRP94	Glucose related protein 94

HCV	Hepatitis C virus
IFN	Interféron
IFNAR	Interferon alpha/beta receptor
Ig	Immunoglobuline
IκBα	NFκB inhibitor alpha
IKKϵ	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon
IL	Interleukine
IMD	Immune deficiency protein
IP3R	Inositol triphosphate receptor
IPS1	IFN-β promoter stimulator I
IRE1	Inositol required enzyme 1
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon stimulated genes
ISRE	Interferon-sensitive response element
JAK	Janus Kinase
JEV	Japanese encephalitis virus
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPS	Lipopolysaccharide
MAC	Membrane attack complex
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MBL	Mannose binding lectin
MCL-1	Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein 1
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MERS	Middle east respiratory syndrome

MLKL	Mixed lineage kinase domain-like
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MTase	Methyltransferase
NAAT	Nucleic acid amplification test
NALP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NFkB	Nuclear factor k B
NIRVS	Non-retroviral integrated RNA virus sequences
NK	Natural killer
NLR	NOD-like receptor
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NRF2	Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
OAS	2'-5'-oligoadenylate synthase 1
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open reading frame
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PE	Phosphatidylethanolamine
PERK	PKR-like ER protein kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKR	Protein kinase R
PP1a	Protein phosphatase 1a
PRR	Pattern recognition receptor
PtdSer	phosphatidylserine
PUMA	P53 upregulated modulator of apoptosis

RdRp	RNA dependant RNA polymerase
RE	Réticulum endoplasmique
RIG-I	Retinoid acid inducible gene I
RIPK	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase
RLR	RIG-I like receptor
ROS	Reactive oxygen species
S1P	Site 1 protease
SCZ	Syndrôme congénitale Zika
sfRNA	Small flavivirus RNA
SINV	Sindbis virus
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SRAS	Syndrome respiratoire aigu sévère
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	TYRO3, AXL and MER
TBK1	TANK-binding kinase 1
Th	T helper cell
TIM	T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein
TLR	Toll-like receptor
TM	Transmembrane
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TRADD protein	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2

TRAIL	tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
TRB3	Tribbles homolog 3
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TYK1	Leukocyte receptor tyrosine kinase 1
TYRO1	Tyrosine-protein kinase 1
UPR	Unfolded protein response
USP18	Ubiquitin specific peptidase 18
UTR	Untranslate region
UV	Ultraviolet
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene protein
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VISA	Virus-induced signaling adaptor
VV	Vaccinia virus
WNV	West Nile virus
XAF1	XIAP associated factor 1
XBP1	X-box binding protein 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
YFV	Yellow fever virus
ZIKV	Zika virus

I. Introduction

Les pathologies d'origine virale et les émergences épidémiques sont devenues des sujets récurrents de l'actualité de notre monde moderne. Elles se succèdent à une fréquence accélérée, probablement du fait des changements de nos modes de vie, associés à des mouvements accrus de populations et probablement en raison de l'appauvrissement de la biodiversité et d'une plus grande proximité entre l'Homme et la faune sauvage, qui constitue un important réservoir d'agents infectieux. Malgré les progrès scientifiques et médicaux acquis au cours des XXième et XXIème siècle, le risque d'émergence des zoonoses a en effet augmenté, avec les multiples changements sociétaux et environnementaux et avec un passage facilité des agents infectieux des espèces sauvages à l'Homme (Weiss and McMichael, 2004; Wilkinson et al., 2018). L'émergence d'un agent infectieux pathogène dépend non seulement de son environnement, mais aussi de la dynamique des autres pathogènes existant dans ce même environnement. Les équilibres entre les hôtes et leurs pathogènes font partie de la définition de la pathocénose apportée par M. D. Grmek dans les années 1970-1980. Pour occuper l'espace et utiliser les ressources disponibles, une espèce en remplace souvent une autre et des changements rapides de ces équilibres favorisent l'opportunisme des agents infectieux (Pollak, 1989).

Les exemples d'émergences ou ré-émergence d'agents infectieux zoonotiques sont nombreux au cours des vingt dernières années. On peut citer les arbovirus (arthropod born virus) tels que les virus du Chikungunya, de la Dengue, Zika et bien sûr les coronavirus avec le SARS-CoV 2 responsable de la pandémie que nous subissons depuis 2019, sans oublier

les émergences précédentes de SRAS, MERS ou les épidémies successives dues au virus Ebola. Des études de biologie évolutive effectuées sur plusieurs familles virales ont estimé que les virus à ARN ont plus particulièrement la capacité à franchir ce que l'on nomme la barrière d'espèce et à changer régulièrement d'hôte. Cette particularité pourrait être en partie liée au peu de fidélité de leur polymérase et de leur système de réplication dans leurs cellules hôtes (Geoghegan et al., 2017; H. Kim et al., 2019; Sanjuán et al., 2010). Le virus Zika (ZIKV) qui va nous intéresser ici et qui est un *Flavivirus*, appartient ainsi à un genre viral identifié comme susceptible de franchir les barrières d'espèces (Kitchen et al., 2011). Les flavivirus qui sont des arbovirus ont également une particularité qui est de pouvoir se multiplier chez des hôtes qui sont des mammifères et chez des arthropodes qui leur servent de vecteurs. Les modifications des équilibres entre les différentes populations d'hôtes, humains, réservoirs animaux et insectes sont déterminants dans les émergences d'épidémies de flavivirus pathogènes. Ces cinquante dernières années, les moustiques vecteurs d'arbovirus et de ZIKV entre autres, ont démontré leur capacité à coloniser de plus en plus de territoires, parfois bien loin des zones tropicales dans lesquelles ils étaient jusque-là contenus (Kraemer et al., 2015).

Il semble donc que ce n'était qu'une question de temps, avant que le virus Zika repéré dans les années 1950 dans une forêt du centre de l'Afrique ne puisse émerger sous sa forme épidémique en 2007 à des milliers de kilomètres de son lieu de baptême (M et al., 2019), qu'on découvre qu'un virus qu'on pensait anodin pouvait devenir en quelques années une menace mondiale pour la santé humaine et qu'on mobilise nos forces pour mieux comprendre son potentiel épidémique, les modalités de ses interactions avec ses hôtes et les mécanismes moléculaires et cellulaires des processus infectieux et pathologiques.

A. Le virus Zika

1. Historique du virus Zika

a) Découverte

Le virus Zika (ZIKV) appartient à la famille des flaviviridae et au genre *Flavivirus*, qui signifie ‘virus jaune’. Ce nom fait référence à la jaunisse provoquée lors d’une infection par un virus de la même famille qui est le virus de la fièvre jaune (YFV). ZIKV appartient à un genre viral comportant d’autres membres connus pour être pathogéniques pour l’homme, tels que le virus de l’encéphalite japonaise (JEV), le virus du Nil occidental (WNV) ou le virus de la dengue (DENV) (Pierson and Diamond, 2020). ZIKV est un arbovirus vectorisé par les moustiques du genre *Aedes*. Il a été initialement isolé à partir d’un singe rhésus sentinelle fébrile (n°766) dans la forêt Zika en Ouganda en 1947, au cours d’une étude sur les vecteurs sylvatiques de la fièvre jaune. Cette souche ensuite inoculée à des souris est devenue une souche de référence dite ‘historique’ pour les études menées sur ZIKV. À la même époque, le virus fut également isolé à partir d’un moustique *Aedes africanus* (Dick et al., 1952), démontrant sa circulation sylvatique tandis que les premiers cas d’infection chez les humains étaient répertoriés par la détection d’anticorps sériques (Simpson, 1964; Smithburn, 1952). A partir de 1966, des apparitions sporadiques d’infection à ZIKV ont été rapportées en Afrique et en Asie et le virus a régulièrement été retrouvé dans ces régions chez le moustique *Aedes Aegypti* (Marchette et al., 1969) (Lim et al., 2017). ZIKV n’a cependant plus guère fait parler de lui avant le début du XXIème siècle, les souches ‘historiques’

disponibles devenant des souches de laboratoire, sur lesquelles peu de recherches fondamentales ont été poursuivies.

b) Émergence épidémique

L'émergence épidémique du ZIKV survient en 2007 en micronésie, sur l'île de Yap, où on estime à 70% le taux de contamination de la population après analyse sérologique (Duffy et al., 2009). L'épidémie atteint ensuite la Polynésie Française en 2013 (Cao-Lormeau et al., 2014), et touche le Brésil en 2015 (Campos et al., 2015), où on estime à plus de 1.5 million, le nombre de personnes infectées (**figure 1**). Les raisons de cette émergence épidémique sont floues, même si plusieurs données avancent que des facteurs génétiques viraux et environnementaux aient pu y contribuer (Zhu et al., 2016; Ali et al., 2017). Les recherches sur l'origine de l'introduction du ZIKV au Brésil évoquent le rôle qu'auraient joué de grandes compétitions sportives comme la coupe du monde de football en 2014, amplifiée par les Jeux Olympiques de 2016 (Massad et al., 2017). Cette flambée épidémique sans précédent qui gagne le continent sud américain et la découverte de formes graves de la maladie ont conduit l'organisation mondiale de la santé (OMS) à déclarer la maladie à virus Zika comme urgence de santé publique en février 2016.

Tout comme pour le chikungunya dans les années 2000, un virus d'origine africaine et une maladie supposée bénigne et qualifiée d'"exotique" suscite un intérêt nouveau, révélant un manque de données sur le processus infectieux et la pathogenèse. De nombreux efforts mis en œuvre au niveau international ont permis de combler ce retard puisque la quantité de publications sur Zika est passée d'une moyenne de 2 par an entre 1950 et 2006 à 733 par an entre 2007 et 2021, avec près de 2000 par an entre 2015 et 2020.

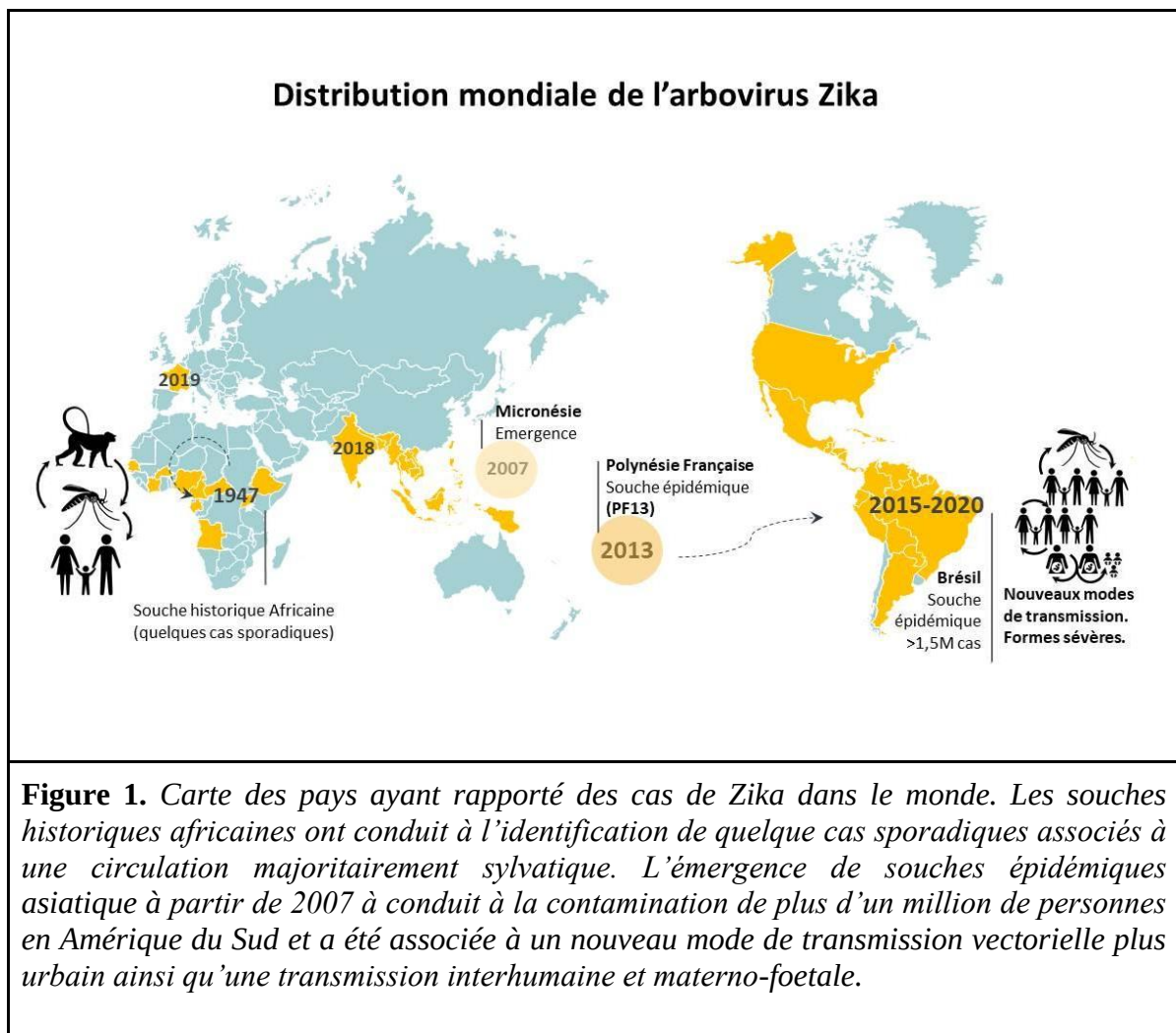


Figure 1. Carte des pays ayant rapporté des cas de Zika dans le monde. Les souches historiques africaines ont conduit à l'identification de quelque cas sporadiques associés à une circulation majoritairement sylvatique. L'émergence de souches épidémiques asiatique à partir de 2007 a conduit à la contamination de plus d'un million de personnes en Amérique du Sud et a été associée à un nouveau mode de transmission vectorielle plus urbain ainsi qu'une transmission interhumaine et materno-foetale.

Les analyses phylogénétiques ont révélé qu'il existe deux lignées pour ce virus, une lignée africaine et une lignée asiatico-américaine contenant quasiment toutes les souches ayant conduit à des émergences épidémiques (Ye et al., 2016) (**figure 2**). Néanmoins les données étant peu accessibles en Afrique et dans certaines régions d'Asie, plusieurs émergences épidémiques ont pu passer inaperçues, comme le montre une étude rétrospective révélant qu'une épidémie avait frappé le Mali dans les années 1990 (Diarra et al., 2020). Aujourd'hui le virus semble circuler de manière endémique dans plusieurs régions du monde et on

2. Transmission du virus Zika

a) Transmission vectorielle

i) Vecteurs impliquées dans la transmission de ZIKV

En tant qu'arbovirose (maladie virale transmise par les arthropodes), la transmission du Zika est majoritairement due à une transmission vectorielle et nécessite un premier événement qui est la piqûre par un moustique infecté. Les principaux vecteurs de ZIKV sont les moustiques du genre *Aedes*, et principalement les espèces *aegypti* et *albopictus*, bien que d'autres espèces de moustiques aient été identifiées comme pouvant porter le virus (Boyer et al., 2018). Classiquement, le moustique s'infecte lorsqu'il prélève du sang sur un hôte virémique. Le virus ingéré avec le sang transite dans l'estomac ou l'intestin moyen du moustique où il se réplique. Cette étape définit la capacité du vecteur à être infecté et permet une mesure de taux d'infection (Infection rate, IR) propre au vecteur. Ensuite le virus peut se propager dans de nombreux autres organes du moustique, définissant sa capacité à porter le virus (dissemination rate, DR). Enfin, le virus colonise les glandes salivaires. La présence en grandes quantités du virus dans la salive permet un transfert vers un nouvel hôte, lors d'une nouvelle piqûre. Cette dernière étape correspond à la capacité de transmission du virus par le vecteur (transmission rate, TR). L'ensemble caractérise donc 3 barrières à franchir pour le virus et finalement la capacité vectorielle de son hôte invertébré (**figure 3**).

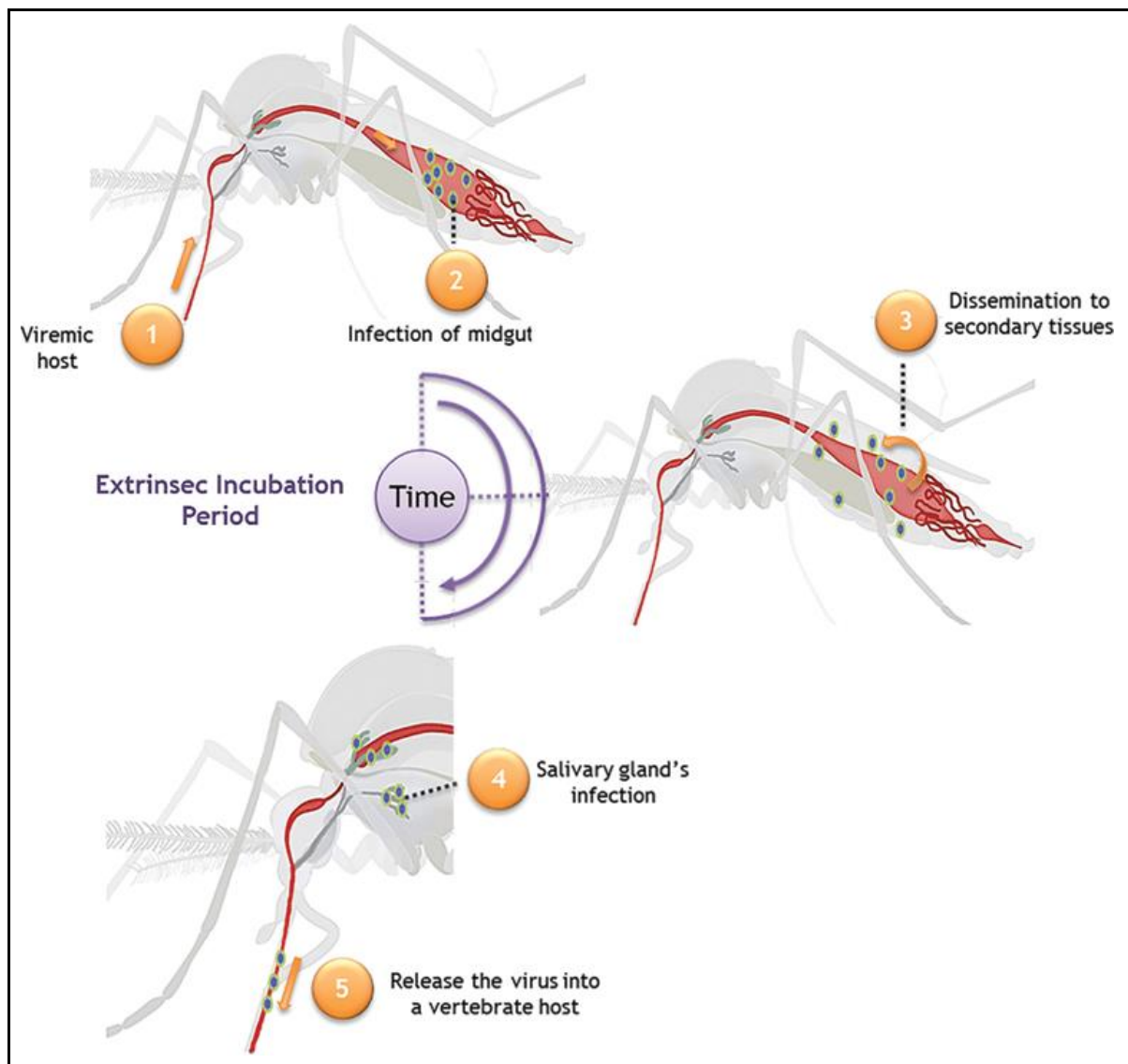


Figure 3. Transmission des arboviroses par les moustiques. 1) Infection du moustique qui prélève du sang sur un hôte virémique. 2) répllication virale dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen du moustique (infection) 3) Passage du virus dans la circulation (hémolymph) et colonisation des tissus secondaires (dissémination) 4) Réplication et production de progénie virale dans les glandes salivaires 5) contamination d'un nouvel hôte (transmission). L'ensemble de ces étapes détermine la capacité vectorielle. (Chouin-Carneiro and Santos, 2017)

De la capacité vectorielle découlent les capacités du virus à émerger et à produire des flambées épidémiques. Dans le cas de ZIKV, le vecteur majoritaire est *Aedes aegypti*.

Auparavant impliqué dans des cycles plutôt sylvatiques, ce moustique est devenu davantage urbain ces dernières décennies, favorisant ainsi la circulation du virus chez l'homme. *Aedes albopictus* a été associé dans une moindre mesure à la transmission dans les zones épidémiques (Chouin-Carneiro and Santos, 2017; Ryckebusch et al., 2017; Chouin-Carneiro et al., 2020). *Ae. albopictus* semblant davantage compétent pour les souches africaines que pour les souches asiatiques, le risque d'introduction des souches épidémiques dans les zones où ce moustique domine, serait limité (McKenzie et al., 2019; Gomard et al., 2020). La colonisation de nouveaux espaces par les *Ae. aegypti* et surtout *Ae. albopictus* dans les zones tempérées démultiplie cependant le risque d'émergence et de propagation d'épidémies dans des zones jusqu'alors épargnées (**figure 4**).

ii) Stratégies de contrôle vectoriel

La meilleure stratégie de prévention des arboviroses reste actuellement la lutte antivectorielle. Les premiers gestes à adopter lors de l'émergence d'une maladie transmise par les moustiques, sont l'utilisation de barrières physiques telles que les moustiquaires et les répulsifs efficaces contre ces insectes (Fradin and Day, 2002). Ensuite les traitements insecticides constituent les mesures les plus rapidement efficaces pour réguler les populations de moustiques et freiner la circulation du pathogène. Néanmoins cette stratégie est limitée à cause des phénomènes de résistance aux insecticides. Même si ces résistances ne sont pas toujours bénéfiques pour le moustique et le pathogène transmis (coût biologique sur la reproduction ou la survie), elles justifient la recherche et le déploiement d'autres mesures de contrôle (Barbosa et al., 2018; Rivero et al., 2010).

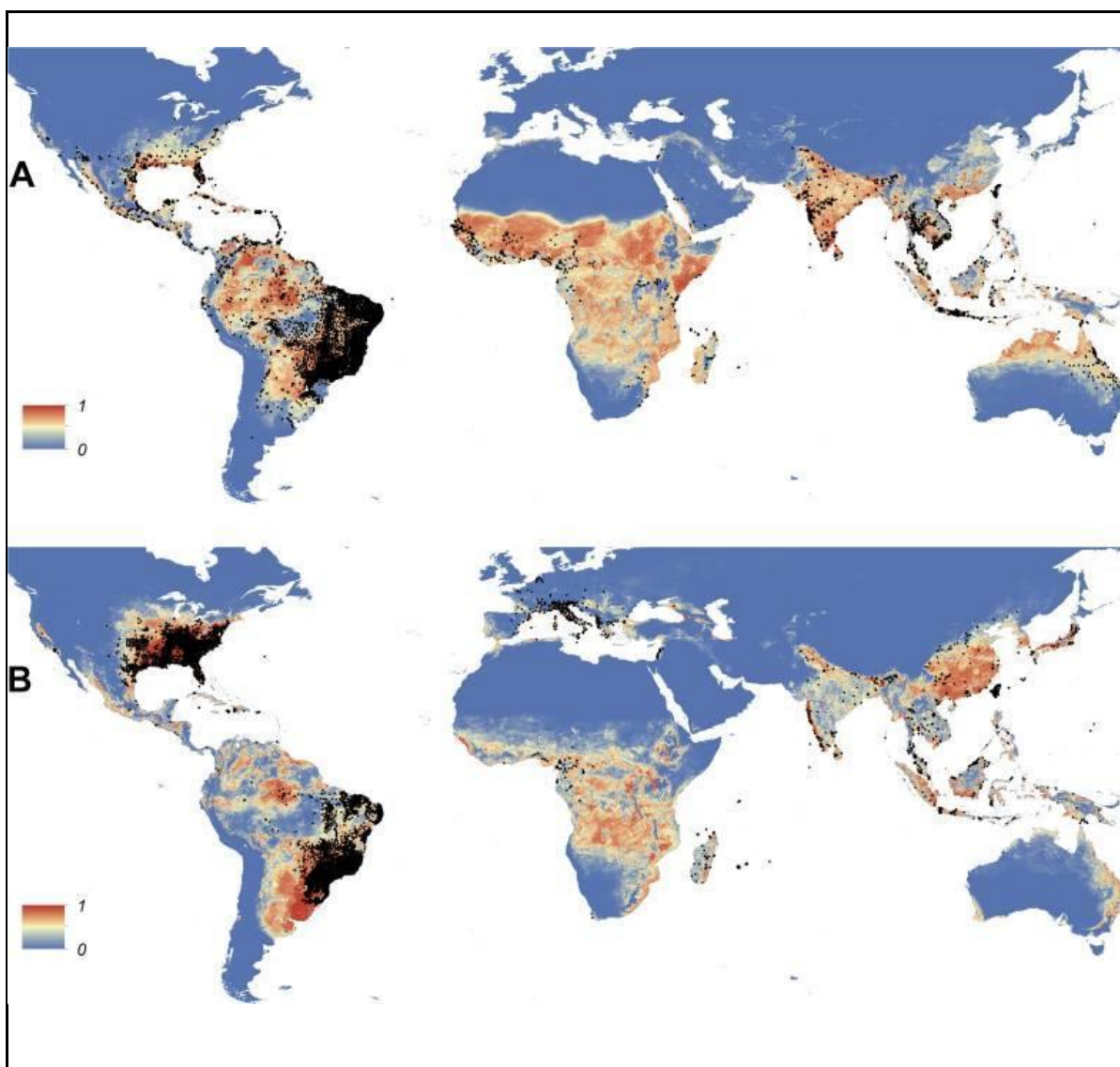


Figure 4. Carte de répartition mondiale actuelle et prédictive des moustiques vecteurs de la famille *Aedes* A) *A. aegypti*. B) *A. albopictus*. La probabilité d'expansion des deux espèces va d'une faible probabilité de colonisation 0 (bleu) à une forte probabilité de colonisation 1 (rouge). Les zones en noir correspondent aux régions déjà occupées par chaque espèce. Extrait de (Kraemer et al., 2015)

Des stratégies de lutte anti-vectorielle alternatives aux insecticides sont régulièrement testées puis mises en place dans de nombreux pays des zones tropicales. Elles ont par exemple pour objectif de contrôler les populations de moustiques par stérilisation. Parmi les techniques de stérilisation, celle de l'incompatibilité cytoplasmique (IC) liée aux bactéries intracellulaires telles que *Wolbachia*, est à l'étude. Elle met à profit la présence de bactéries de souches différentes entre les moustiques mâles et femelles qui conduisent à un défaut de mitose dans les oeufs fécondés et à une descendance non viable (Atyame et al., 2011; Gebiola et al., 2017; Iturbe-Ormaetxe et al., 2011). Des campagnes de 'lâchers' de mâles stérilisés par irradiation ont été menées en Italie, en Chine, au Brésil et sont en cours d'essai à La Réunion. Elles ont conduit à une diminution de la reproduction et montré une certaine efficacité à réduire les populations de moustiques (Bellini et al., 2013; Gouagna et al., 2020; Haramboure et al., 2020; Zheng et al., 2019).

b) Transmission non-vectorielle

i) Autres voies de transmission physique

Des cas de transmissions plus inhabituelles ont été rapportés. Ainsi, des cas de transmissions sexuelles ont conduit le *center for diseases control* américain (CDC) et l'OMS à recommander l'utilisation du préservatif ou d'éviter les relations sexuelles pour une durée d'au moins 3 mois après un épisode aigu de Zika. Cette transmission sexuelle pourrait prendre sa source dans le tropisme observé de ZIKV pour les gonades (cf paragraphe 7. c))(Counotte et al., 2018; Kim et al., 2018; "WHO | Sexual transmission of Zika Virus," n.d.). L'émergence épidémique a aussi mis en évidence une transmission verticale materno-foetale avec des complications associées (Chan et al., 2016). La transmission verticale ne

semble pas spécifique aux souches asiatiques épidémiques selon de récentes études sur des souches africaines contemporaines qui seraient aussi capables d'induire des pathologies neurologiques chez les nouveaux nés, peut être même plus sévères et potentiellement responsables de fausse-couches (Aubry et al., 2021). La transmission par transfusion sanguine existe et des précautions doivent être prises dans les régions endémiques de ZIKV (R. Liu et al., 2019; Musso et al., 2016). Le risque de contamination par allaitement est très faible et ne semble pas apporter de risque supplémentaire aux nouveaux nés (Cavalcanti et al., 2017; Sampieri and Montero, 2019).

ii) Impact des réseaux sociaux sur la transmission du virus Zika et communication autour des mesures de prévention

Lors de la pandémie de ZIKV, la seule mesure efficace pour prévenir l'infection était de se protéger des piqûres de moustique avec l'utilisation de répulsif et de barrières protectrices comme des moustiquaires. L'efficacité des mesures barrières, pour un pathogène quel qu'il soit, dépend avant tout de l'adhésion du grand public aux mesures. Dès lors, la communication des instances de santé publique doit pouvoir avoir une portée la plus large possible et la plus claire possible. Lors de la pandémie à virus Zika, des données ont montré que cette communication a amélioré la perception du risque et *in fine*, a permis une meilleure adhésion des populations aux mesures barrières dans les pays concernés (Chan et al., 2018; Painter et al., 2017). Néanmoins, même si la circulation d'information est très rapide sur les réseaux sociaux et permet ainsi la diffusion des recommandations sur la gestion d'une épidémie, les réseaux sociaux sont aussi le siège de rumeurs et fausses informations pouvant enrayer les efforts dans la lutte contre la circulation d'un pathogène. Une étude comparant la

diffusion des rumeurs et fausses nouvelles lors de l'épidémie de Zika a montré que les rumeurs étaient partagées trois fois plus que les informations vérifiées (Sommariva et al., 2018). De plus, il semblerait qu'apporter des sources vérifiées pour contrer ces fausses nouvelles réduirait la portée de ces rumeurs (Bode and Vraga, 2018). L'information et la connaissance sur ce qu'est un agent infectieux et les risques qui lui sont associés sont importants pour une stratégie de santé publique efficace. Ainsi, la prise en considération des évolutions sociétales avec l'importance accordée aux réseaux sociaux dans la modélisation et la prédiction d'émergence et diffusion de pathogènes semble être devenue indispensable (Sooknanan and Comissiong, 2020).

3. Diagnostic de l'infection

Une personne piquée par un moustique vecteur de ZIKV peut voir apparaître les premiers symptômes 3 à 10 jours après la contamination. La virémie qui est modérée peut être mesurée par RT-PCR jusqu'à 5 à 7 jours après les premiers signes cliniques (J0). Une charge virale peut continuer à être détectée jusqu'à J10 après l'apparition des symptômes, notamment dans les urines (Gourinat et al., 2015). La réponse humorale peut être estimée par sérologie des IgM et IgG, une à deux semaines après apparition des symptômes pour les IgM et IgG respectivement (**figure 5**). Il est à noter que la présence d'IgM dirigées contre ZIKV ne traduit pas forcément une infection récente. Ce type d'anticorps est fréquemment détecté plusieurs mois après les premiers symptômes chez certains patients (Griffin et al., 2019). Le diagnostic sérologique des infections par flavivirus peut être difficile à cause de nombreuses réactions croisées avec d'autres *Flavivirus* dont le virus de la Dengue, ou si le patient a été vacciné contre la fièvre jaune. Ainsi des approches davantage discriminantes sont

privilégiées comme les sérologies multiplex ou des tests diagnostiques (NAAT) basés sur la détection d'acides nucléiques et offrant plus de sensibilité (Peters and Stevenson, 2019).

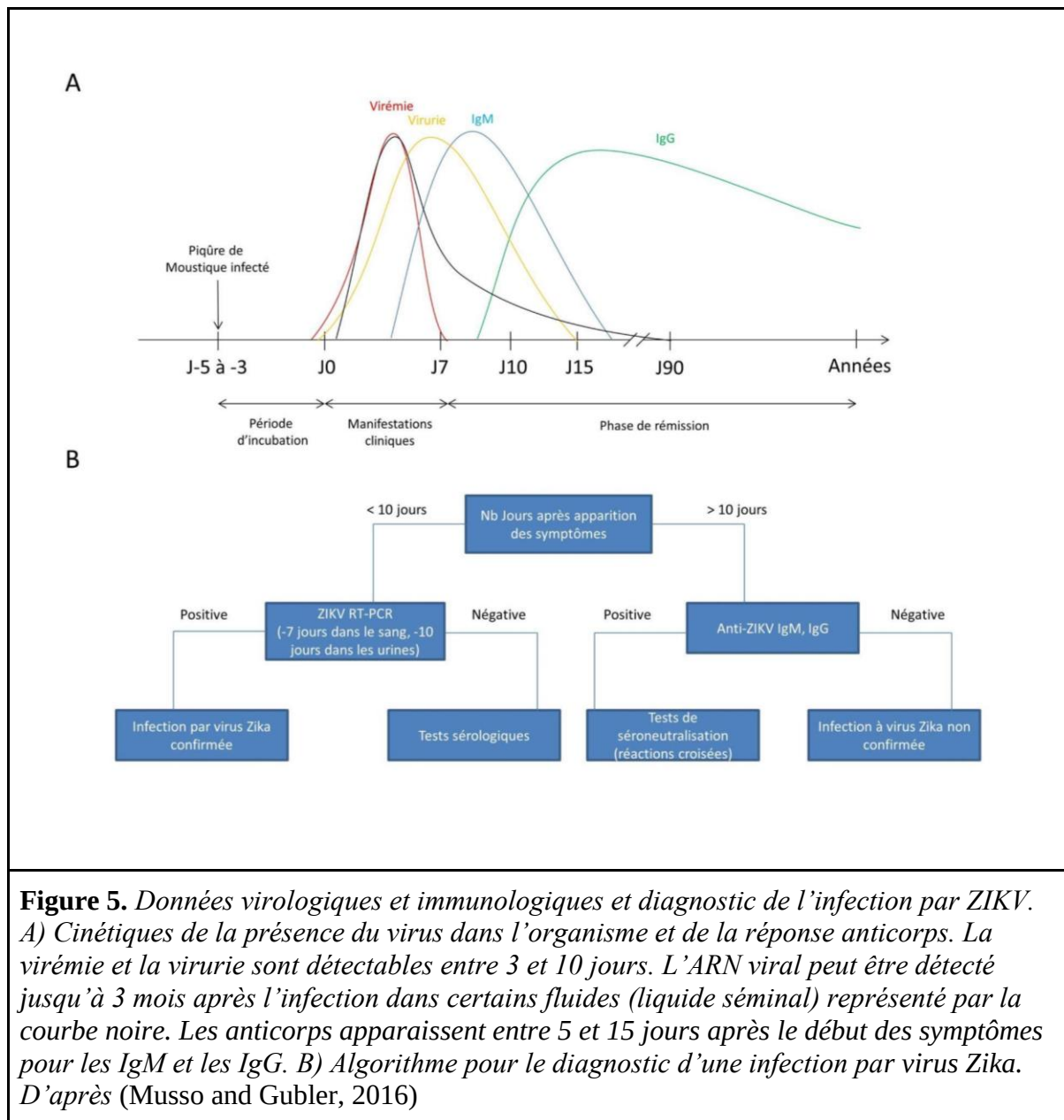


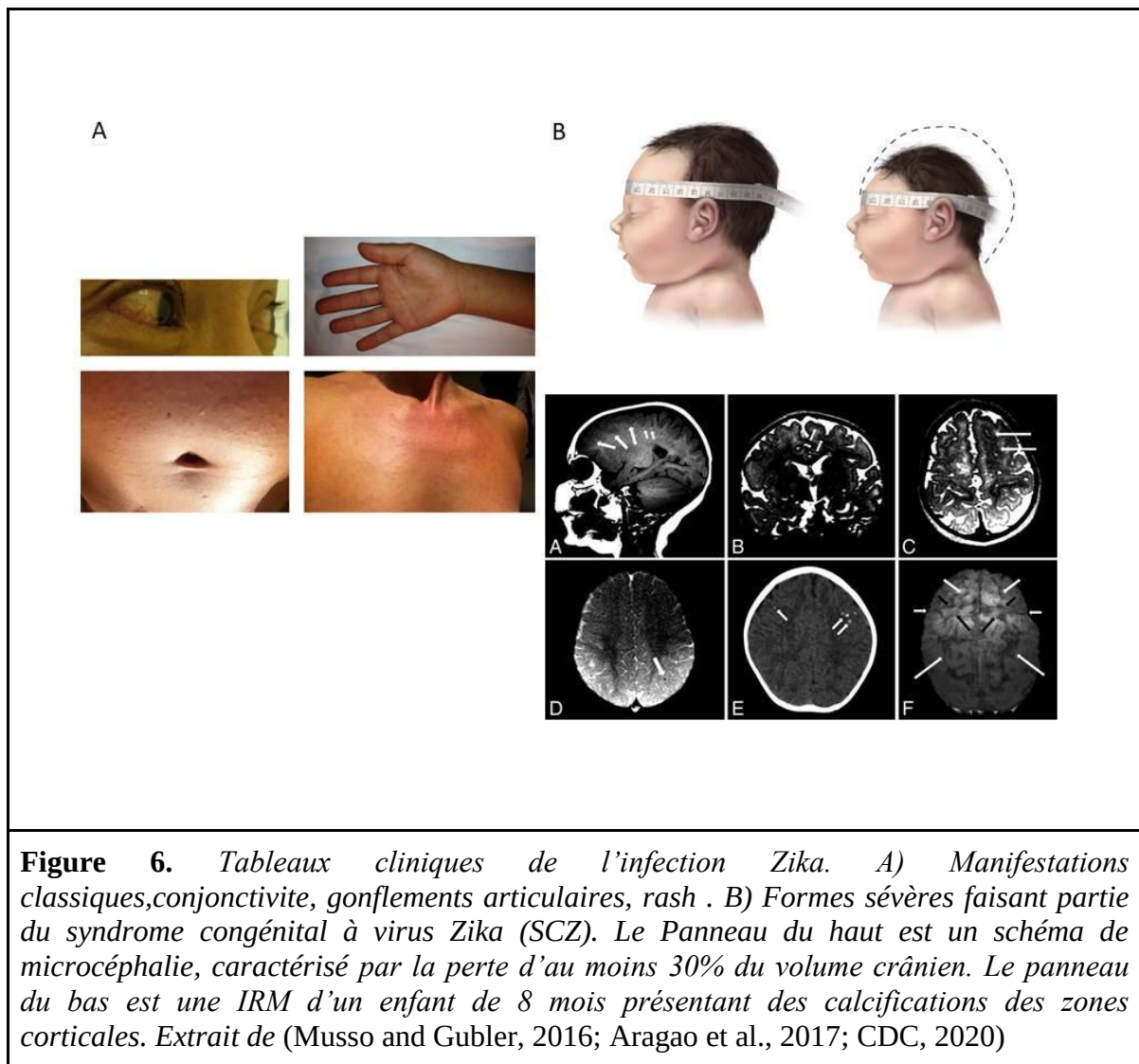
Figure 5. Données virologiques et immunologiques et diagnostic de l'infection par ZIKV. A) Cinétiques de la présence du virus dans l'organisme et de la réponse anticorps. La virémie et la virurie sont détectables entre 3 et 10 jours. L'ARN viral peut être détecté jusqu'à 3 mois après l'infection dans certains fluides (liquide séminal) représenté par la courbe noire. Les anticorps apparaissent entre 5 et 15 jours après le début des symptômes pour les IgM et les IgG. B) Algorithme pour le diagnostic d'une infection par virus Zika. D'après (Musso and Gubler, 2016)

4. Tableaux cliniques et formes graves

Dans environ 80% des cas, l'infection par ZIKV ne produit aucun symptôme (Haby et al., 2018). Le tableau clinique est celui classiquement observé pour beaucoup d'arboviroses, avec comme manifestations principales, de la fièvre, un rash cutané, une arthralgie et parfois une conjonctivite (**figure 6A**) (Paixão and Barreto, 2016). La plupart des manifestations restent bénignes et se résolvent entre 3 à 7 jours. Néanmoins des complications sévères peuvent apparaître après l'infection avec, dans les cas les plus graves, des défaillances multiples d'organes. Parmi les tableaux graves et inattendus, un taux anormalement élevé de syndromes de Guillain-Barré a été relevé dans les populations adultes dans les différentes zones d'épidémie. Ce syndrome qui se manifeste par des atteintes du système nerveux périphérique a concerné 2 à 3 personnes sur 10 000 personnes infectées, l'incidence moyenne annuelle attendue étant de 1 à 2 sur 100 000 (Brent et al., 2016; Mier-y-Teran-Romero et al., 2018; Sarmiento-Ospina et al., 2016). Des études menées sur ces patients infectés par ZIKV et présentant ce syndrome ont montré qu'ils avaient un taux élevé d'anticorps anti-gangliosides, confirmant l'auto-immunité classique provoquée lors de cette manifestation pathologique (Cao-Lormeau et al., 2016; Rivera-Correa et al., 2019).

L'épidémie de Zika a surtout marqué les esprits en raison des cas de syndromes neurologiques graves rapportés chez les nouveaux nés infectés par transmission virale materno-foetale (Mlakar et al., 2016; Ximenes et al., 2019). Dès 2015, la flambée épidémique au Brésil révèle une augmentation du nombre de cas de microcéphalies chez les nouveaux nés de mères infectées pendant la grossesse (Brasil et al., 2016; Rodrigues, 2016).

La microcéphalie est caractérisée par une réduction du périmètre crânien d'au moins 3 déviations standard (DS) (**figure 6B**).



Les études menées sur ces cas de microcéphalies avancent plusieurs hypothèses selon les stades de la grossesse au cours desquels l'infection a eu lieu. Avant 12 semaines d'aménorrhée (SA), l'hypothèse la plus probable reste l'infection directe de l'embryon en formation, pendant les stades précoces de son développement (neurulation) (Adibi JJ et al. 2016). Après 12 SA, les voies de passage du virus ne sont pas clairement identifiées, mais

différents tissus semblent montrer une certaine permissivité au virus notamment les cytotrophoblastes, alors que les trophoblastes issus de placenta à terme, sont assez résistants à l'infection (Bayer et al. 2016, Corry J. et al. 2017). Les cellules de Hofbauer qui sont des macrophages résidant dans le placenta, semblent être permissives au virus et une sur-infiltration de ces macrophages au niveau placentaire pourrait participer à la pathogenèse (Simoni et al. 2016). Il faut ajouter que le spectre du syndrome congénital à virus Zika (SCZ) semblait au départ limité aux microcéphalies et à des calcifications sous corticales. Il s'avère que cela ne représente que 4 à 6% des cas de pathologies consécutives à des infections par ZIKV au cours de la grossesse. Les atteintes neurologiques et motrices observées chez les enfants semblent bien plus larges, allant de troubles oculaires à des arthrogryposes (malformations et raideurs des articulations) congénitales et ces atteintes concernent 10 à 15% des nouveaux nés de mères contaminées (Aragao et al., 2017). Le taux de mortalité parmi les cas de SCZ est estimé à 10% avec des facteurs aggravants comme un faible poids à la naissance ou une prématurité (accouchement entre 34 et 36 semaines de grossesse) (Cunha et al., 2017; N. Costa et al., 2020).

Une inquiétude s'est fait jour sur une possible apparition de pathologies chroniques post Zika. En effet, ZIKV semble pouvoir se maintenir assez longtemps dans l'organisme après la phase aiguë de l'infection. La virémie et l'excrétion d'ARN viral sont plutôt longues pour une arbovirose, avec un maintien dans le sang et les urines qui peut durer plusieurs semaines (Stone et al., 2020). Outre les atteintes oculaires et cérébrales, un maintien au sein de tissus des organes reproducteurs a aussi été mis en évidence, suggérant une persistance virale dans différents tissus immuno-privilégiés (oeil, système nerveux central, système reproducteur) (Paz-Bailey et al., 2018). Plusieurs études de cas de bébés exposés *in utero* et des études en

modèle macaque décrivent des neuropathologies post-natales intervenant plusieurs mois après la naissance et l'infection par ZIKV et corroborent l'hypothèse d'une possible persistance virale (van der Linden et al., 2016; Aragao et al., 2017; Mavigner et al., 2018).

5. Prise en charge des patients, options thérapeutiques, traitements et vaccins

Actuellement, il n'existe aucun traitement de l'infection Zika hormis les traditionnels traitements symptomatiques. Le paracétamol est prescrit pour traiter la phase fébrile et arthralgique en association à une hydratation continue. Des anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent être prescrits en cas de crise aiguë (arthralgie, myalgie, épisode fébrile intense) mais sont à éviter dans les zones où les co-circulations de ZIKV et de DENV sont avérés, en raison des risques hémorragiques associés (Falcao et al., 2016). Devant un arsenal thérapeutique inexistant et face à une pathologie dont l'impact en santé humaine était méconnu, en particulier sur les femmes enceintes avec les risques de SCZ encourus par leurs fœtus, de nombreuses recherches ont été initiées pour mettre au point des médicaments et développer des vaccins.

a) Traitements anti-infectieux

Un des moyens d'enrayer l'infection consiste à lutter précocement contre le virus. Ainsi plusieurs traitements ont été proposés dont certains sont du repositionnement de molécules aux propriétés anti-virales. Des antiviraux ciblent généralement les protéines du virus à activité enzymatique (voir le paragraphe 6 pour la description des protéines virales) telles que la protéase/hélicase NS2B/NS3 ou la MTase/RdRp de la NS5 (Baz and Boivin, 2019). D'autres pistes d'action sur les protéines non enzymatiques codées par le virus ont

également émergé, en particulier ciblant NS4B (Xie et al., 2015). Des molécules ou des extraits de plantes médicinales capables d’agir sur différentes étapes du cycle viral sont à l’étude (**figure 7**).

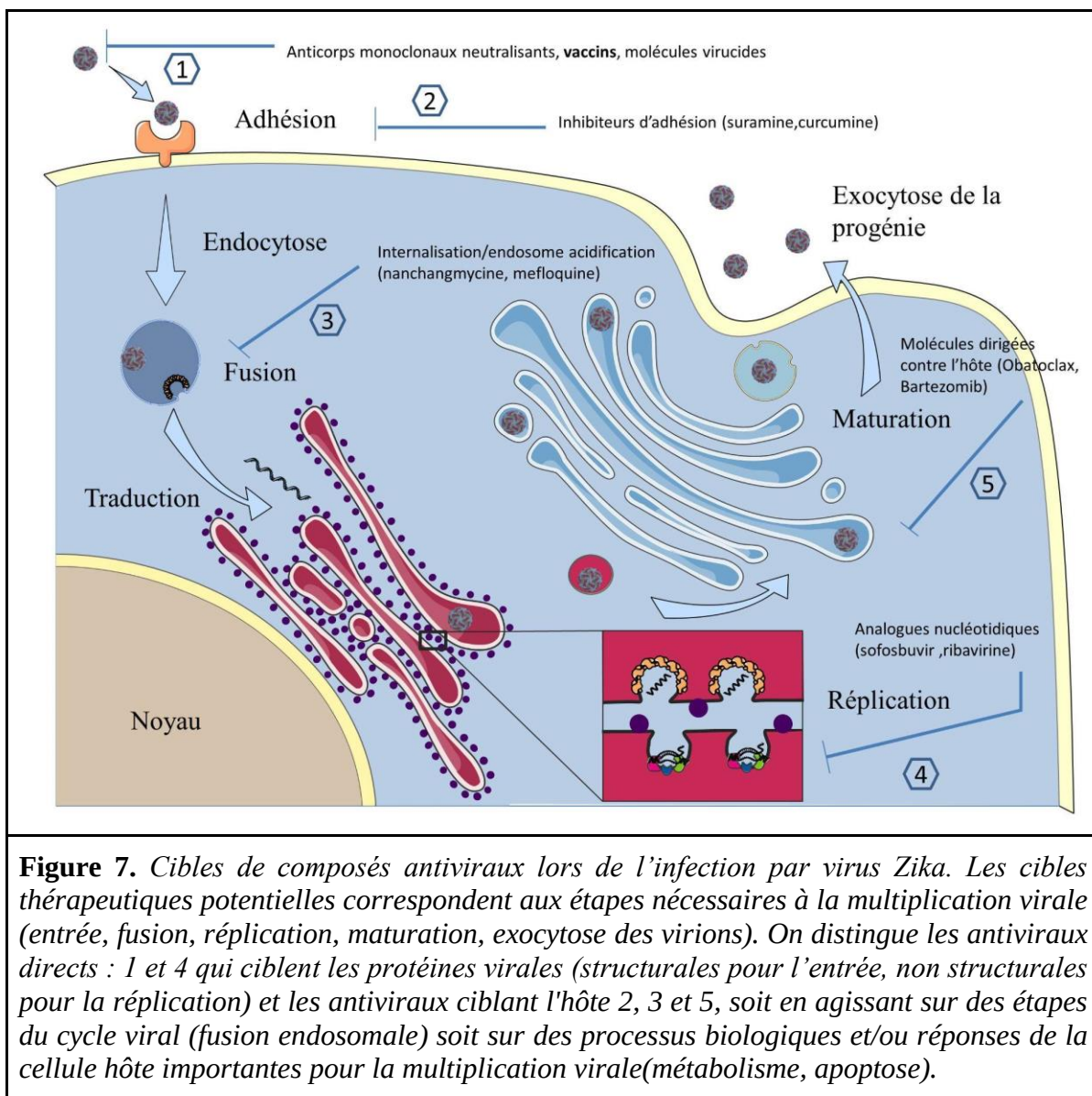


Figure 7. Cibles de composés antiviraux lors de l'infection par virus Zika. Les cibles thérapeutiques potentielles correspondent aux étapes nécessaires à la multiplication virale (entrée, fusion, réplication, maturation, exocytose des virions). On distingue les antiviraux directs : 1 et 4 qui ciblent les protéines virales (structurales pour l'entrée, non structurales pour la réplication) et les antiviraux ciblant l'hôte 2, 3 et 5, soit en agissant sur des étapes du cycle viral (fusion endosomale) soit sur des processus biologiques et/ou réponses de la cellule hôte importantes pour la multiplication virale (métabolisme, apoptose).

Certaines ont montré leur efficacité *in vitro* en bloquant notamment les étapes d’attachement et d’entrée (Clain et al., 2019, 2018; Haddad et al., 2020; Singh et al., 2019).

Le développement de médicaments anti ZIKV doit prendre en considération plusieurs spécificités telles que le passage du virus dans des sites immuno privilégiés (système nerveux central, placenta, gonades) et il doit être adapté pour la cible particulièrement fragile que sont les femmes enceintes ou en projet de grossesse.

Il existe dans la littérature des essais menés *in vivo* sur primates non humains, visant à administrer des anticorps monoclonaux isolés de patients infectés par ZIKV pour prévenir d'une infection et notamment la transmission materno-foetale (Magnani et al., 2017). Les stratégies préventives ou curatives utilisant des anticorps monoclonaux sont déjà utilisées en cancérologie et pour les pathologies inflammatoires et autoimmunes, mais rarement pour les maladies infectieuses même si de nombreuses études montrent des effets encourageants notamment pour le SARS-CoV 2 (Ali et al., 2020; Qu et al., 2020; Chen et al., 2021). Plusieurs stratégies cherchant à davantage cibler les réponses de la cellule hôte en réorientant des molécules thérapeutiques actives déjà connues, comme celle utilisant le barteptomib, un inhibiteur du protéasome, ont démontré une activité antivirale dans des modèles *in vivo* et ont apporté certains espoirs (Bernatchez et al., 2020; Han and Mesplède, 2018). Les avantages à cibler les réponses de l'hôte sont de limiter le risque d'apparition de variants viraux résistants aux traitements, comme ce qui a été observé avec les analogues nucléotidiques (Kumar et al., 2020; Saiz et al., 2018). Malheureusement, beaucoup de composés ayant montré une efficacité antivirale *in vitro* ou chez l'animal ont échoué aux tests cliniques, et aucun traitement n'a pour le moment montré suffisamment d'efficacité chez l'homme.

b) Vaccins

Plusieurs stratégies ont été envisagées jusqu'à récemment, optant soit, pour les virus inactivés, soit pour des protéines d'enveloppe recombinantes associées à de l'ARN double brin comme stimulant de l'immunité (Amaral et al., 2020; Garg et al., 2020) ou encore via l'injection de protéines NS1 recombinantes (Bailey et al., 2019; A. Li et al., 2018). Des vaccins à ARN ont aussi été développés et testés sur des modèles murins (Pardi et al., 2017; Richner et al., 2017). Cette technologie n'avait pas fait preuve de son innocuité ni de son efficacité, jusqu'à la récente utilisation à très large échelle des vaccins à ARN contre le SARS-CoV 2, tournant une nouvelle page dans l'histoire de la vaccination (Dagan et al., 2021; Pardi et al., 2018). Le but est surtout de protéger les personnes les plus à risque, comme les femmes enceintes ou projetant de l'être, afin de protéger les nouveau-nés des complications neurologiques dues à l'infection Zika (Rompay et al., 2019). Plusieurs stratégies et options vaccinales ont déjà été examinées en phase clinique I comme des vaccins à ADN, des vaccins chimériques avec une base de VSV, ou des virus vivants atténués (Abbink et al., 2018; Garg et al., 2018; Poland et al., 2019).

Les traitements et les vaccinations visent généralement à traiter ou à prévenir les complications graves si elles n'induisent pas une immunité stérilisante. Étant donné le nombre potentiellement important de formes asymptomatiques, ces essais thérapeutiques n'auront un impact que si ils sont efficaces, mais surtout, ils doivent être tolérables et sûrs pour les sujets sensibles (Schwartz, 2018).

6. Organisation et structure du virus Zika

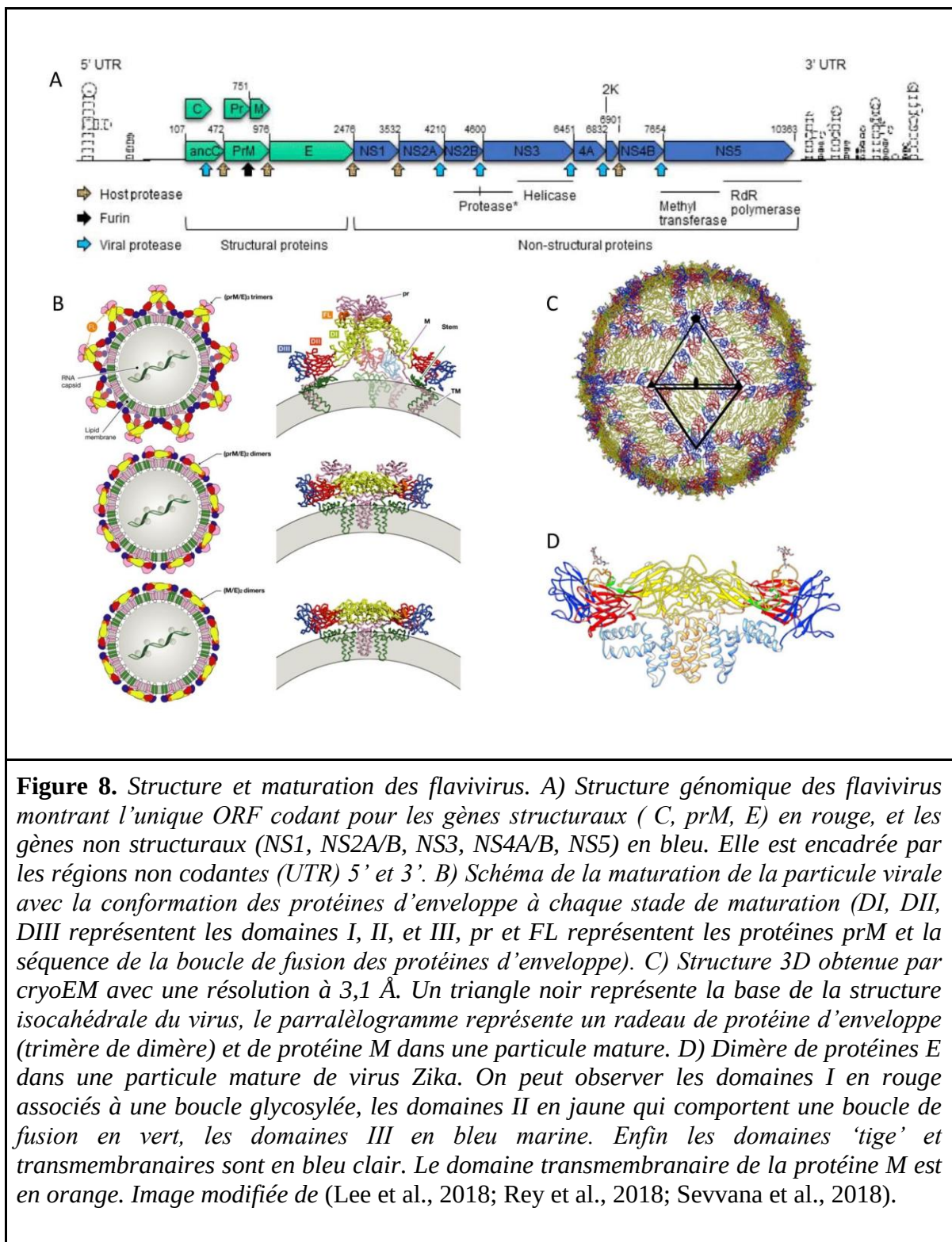
a) Structure génomique

Le génome du ZIKV est composé d'un ARN simple brin de sens positif de près de 11 kb qui code pour une polyprotéine maturée en 10 protéines, dont 3 structurales (Capsid: C, Membranaire: prM, Enveloppe: E) et 7 non structurales (Non Structural: NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5) (Cunha et al., 2016). La séquence codante est composée d'une unique ORF et est encadrée par deux régions non traduites (UTR) (**figure 8A**). La polyprotéine synthétisée sera maturée au cours du cycle viral pour donner les différentes protéines codées par le génome. Chaque protéine possède des fonctions spécifiques plus ou moins bien caractérisées. La protéine C compose la nucléocapside enfermant le génome viral. La protéine prM sert à la protection de la protéine d'enveloppe et joue le rôle de charnière dans la particule virale. La protéine E est un composant de l'enveloppe extérieure du virus en contact avec les facteurs de liaisons cellulaires. Les protéines non structurales interviennent pour le cycle de multiplication du virus en formant des complexes de réplication avec des fonctions spécifiques, comme par exemple la protéine NS5 qui possède l'activité répllicative avec un domaine de capping possédant une activité *méthyltransférase* (MTase) et une fonction ARN polymérase ARN dépendante (*RNA dependant RNA polymerase* ou RdRp) ainsi que les protéines NS2B/3 qui sont des protéases/hélicases.

La séquence non codante en 5' est capable de former des structures secondaires et de s'apparier avec des séquences codantes du virus, ce qui pourrait jouer un rôle dans le déroulement du cycle viral et dans la capacité infectieuse (P. Li et al., 2018). Cette région 5'UTR permettra la reconnaissance par la NS5, la cyclisation de l'ARN viral et l'initiation de

la traduction par la machinerie cellulaire (Ng et al., 2017). Chez les flavivirus, la mise en place de la ‘coiffe’ (ou capping) de l’ARN viral se fait via la méthylation d’une guanosine triphosphate en N-7 et du ribose en 2’OH via la NS5 et semble dépendante de la séquence de l’ARN viral (Dong et al., 2007).

La région 3’UTR quant à elle, est une suite de structures secondaires de type ‘tige-boucle’ qui constituent une caractéristique du génome des flavivirus. Elle se décompose en 3 sous-régions distinctes, une hypervariable, une modérément variable et une région très conservée (Ng et al., 2017). La région 3’UTR est responsable d’une accumulation dans les cellules infectées de sous populations d’ARN viral, les ‘subgenomic flavivirus RNA’ (sfRNA). Les sfRNA sont produits par l’activité des exonucléases XRN1 et 2 de la cellule hôte. Ces exonucléases sont impliquées dans la dégradation des ARNm en conditions physiologiques. Leur activité sur l’ARN viral depuis l’extrémité 5’ se heurte aux structures secondaires des régions 3’UTR, ce qui inhibe leur progression. Le produit de la dégradation incomplète des génomes viraux génère d’importantes quantités de sfRNA subgénomiques. Leur rôle est semble-t-il important au cours du processus infectieux. Ils participent ainsi à la manipulation de diverses réponses cellulaires antivirales, chez les insectes comme dans les cellules de mammifères. Ils constituent entre autres des leurres pour les systèmes de défense contre l’intrusion de génomes étrangers tels que le système DICER d’interférence ARN (Chapman et al., 2014; Schnettler et al., 2012; Slonchak et al., 2020a).



b) Structure de la particule virale

La particule mature du virus Zika mesure environ 40 à 60 nm de diamètre. Sa structure est composée d'une capsid interne adoptant une structure icosahédrale, composée de protéines C qui sont capables de lier et enfermer le génome viral (T. Y. Tan et al., 2020). Cette capsid est elle-même entourée d'une enveloppe, composée de 180 protéines d'enveloppe (E) et membranaires (M) qui s'associent au sein d'une bicouche lipidique. Cette enveloppe provient, pour sa partie lipidique, du réseau endomembranaire de la cellule hôte infectée. La protéine d'enveloppe (E) contient 4 domaines, un transmembranaire (TM) associés à un domaine 'stem' et 3 autres domaines appelés ectodomaines I, II et III (**Figure 8B**). Le domaine I participe au maintien de la structure de la protéine E, le domaine II est impliqué dans la fusion et le domaine III est le domaine privilégié de liaison aux récepteurs cellulaires impliqués dans l'entrée virale. Il contient de plus les principaux épitopes reconnus par les anticorps. Ensemble ces trois ectodomaines représentent la partie exposée de la protéine d'enveloppe en surface de la particule virale. Les protéines E s'associent en dimères antiparallèles, puis en trimères parallèles de dimères, appelés radeaux (**figure 8CD**). La particule est donc composée de 30 radeaux qui forment une structure mature dont la surface est relativement lisse et comparable à une balle de golf (Zhang et al., 2017). Les protéines virales membranaires ont une forme immature, prM, qui protège le peptide de fusion situé dans la protéine d'enveloppe (E). Cette protéine prM évite une fusion précoce des particules virales aux membranes cellulaires lorsqu'elles empruntent les voies de sécrétion cellulaire pour être exocytées (**figure 8**). Le peptide pr est clivé par les furines cellulaires lors de la maturation de la particule (Yoshii et al., 2012). Celle-ci intervient au cours des toutes dernières étapes du cycle viral (voir ci-dessous), au moment de la sortie des virions et le

peptide clivé est libéré dans le milieu extracellulaire en même temps que la particule virale mature.

7. Cycle viral

a) Attachement et entrée

L'entrée des flavivirus dans la cellule hôte passe par une reconnaissance entre la particule virale et des facteurs d'adhésion présents sur la surface des cellules cibles (**Figure 9**). Ces derniers conditionnent le tropisme du virus. La reconnaissance et l'adhésion font intervenir les composés lipidiques de l'enveloppe virale et la protéine d'enveloppe E, plus précisément le domaine III de celle-ci (Zhang et al., 2017). Avant tout, pour comprendre comment le virus peut interagir avec la cellule cible, il est nécessaire d'avoir une vision dynamique de la particule virale qui n'est pas figée ni rigide. En effet, la variation de la structure même de la particule, notamment en fonction de la température, permet une sorte d'adaptation 'morphologique' en fonction des contextes. Les spécialistes parlent de 'respiration' permettant au virus d'adopter une forme davantage compacte et lisse chez les invertébrés, à une température relativement basse (29°C) et une structure moins compacte avec des reliefs dans un milieu à 37°C, comme chez les mammifères. Cette dernière permet une meilleure exposition de la protéine d'enveloppe et un accès aux lipides de la particule, parmi lesquels des phosphatidyl-sérine (Fibriansah et al., 2013; Labeau, 2019).

Les facteurs protéiques présents en surface des cellules humaines et impliqués dans la liaison et l'attachement de ZIKV à ses cellules cibles seraient principalement de la famille des récepteurs TAM (AXL et TYRO1) qui opèrent justement une reconnaissance des phosphatidyl-sérines (PtdSer) en surface virale, via Gas6 et les récepteurs de la famille TIM

qui reconnaissent directement les PtdSer. Les récepteurs de type C-lectines (DC-SIGN, mosGCTL-1) et des protéines de type 'heat shock protein' (HSP70, GRP78/BiP) seraient aussi des récepteurs potentiels du virus, aussi bien dans les cellules de mammifères que dans les cellules de moustique et ils reconnaîtraient la glycoprotéine d'enveloppe E (Hamel et al., 2015; Perera-Lecoin et al., 2013; Sirohi and Kuhn, 2017). Les glycosaminoglycanes de surface cellulaire, comme le sulfate d'héparane, sont des facteurs d'adhésion moins spécifiques mais ils participent à un tropisme relativement large des flavivirus et de ZIKV en particulier (Kim et al., 2017).

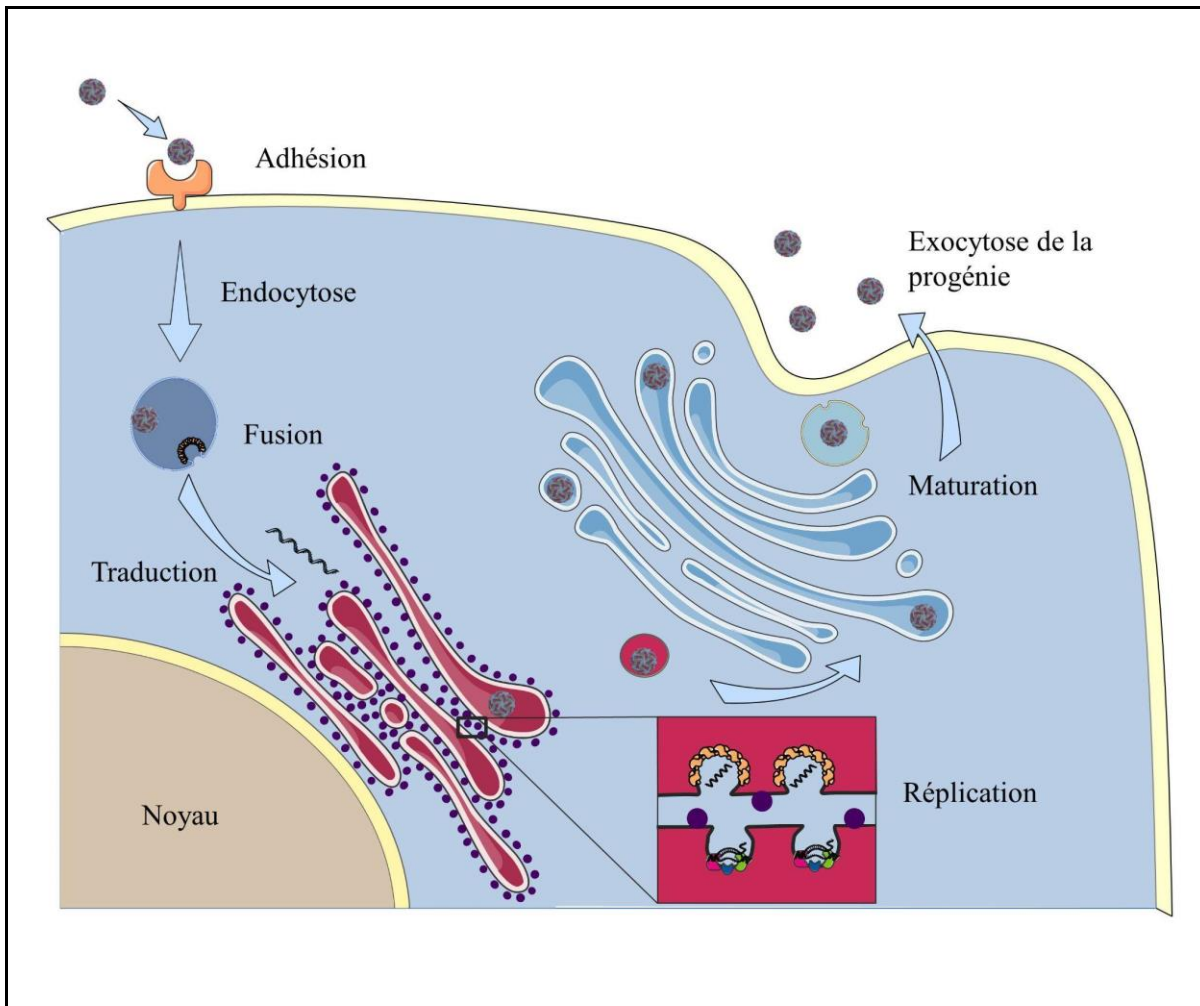


Figure 9. Cycle viral chez les flavivirus. L'entrée des Flavivirus se fait après attachement du virus sur la membrane plasmique suivie d'une endocytose. La particule virale change de conformation suite à l'acidification de l'endosome permettant l'exposition des séquences de fusion et la libération du génome viral dans le cytoplasme. Le génome viral est ensuite traduit par les ribosomes en une polyprotéine au niveau du réticulum endoplasmique. Celle-ci est clivée par des protéases virales et cellulaires pour donner les différentes protéines structurales et non structurales. La réplication du génome se met alors en place au niveau d'invaginations de la membrane du RE où l'encapsidation des ARN viraux néosynthétisés intervient. L'enveloppe virale mature ensuite dans l'axe réticulum-golgi, où le peptide pr de la protéine prM, qui protège la boucle de fusion est clivé, permettant la formation d'un virion mature. La particule est ensuite sécrétée par exocytose avec les peptides pr. Certaines particules sont néanmoins immatures ou non infectieuses.

Après l'étape d'attachement, le virus se fait internaliser suite à son endocytose par des voies dépendantes ou indépendantes de la clathrine (Hackett and Cherry, 2018; M. Li et al., 2020). Le transport vésiculaire centripète lui permet ensuite de gagner les endosomes dans lesquels la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale intervient, à la faveur d'un pH endosomal acide et grâce à une séquence de fusion présente dans le domaine II de la E qui est conservée chez tous les flavivirus.

Les protéines d'enveloppe des souches contemporaines de ZIKV comportent un site de glycosylation sur l'asparagine 154 (N154) du domaine III. Cette glycosylation est fondamentale pour une entrée efficace du virus, à la fois chez son hôte vertébré et chez son vecteur invertébré (Fontes-Garfias et al., 2017). Dans le cas de DENV, l'absence de glycosylation de l'enveloppe ne semble pas impacter la cinétique de multiplication du virus dans les cellules de moustiques, mais elle réduirait fortement l'infection des cellules mammifères (Mondotte et al., 2007). Enfin, la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale, entraîne la libération de la capside et du génome viral dans le cytoplasme de la cellule (Lappala et al., 2018; Van Vlack and Seeliger, 2018).

b) Réplication et progénie

L'ARN viral libéré dans le cytoplasme est de polarité positive donc directement traduit par des ribosomes. Ces derniers, associés au réticulum endoplasmique granulaire, permettent l'insertion de la polyprotéine virale dans la membrane du réticulum. La polyprotéine subit une maturation par l'action de protéases, d'origine virale (NS3) ou cellulaires (furines) (Roby et al., 2015). Une fois les complexes de réplication formés par les protéines non structurales maturées, l'ARN viral se circularise grâce à une complémentarité entre les régions 5' et 3'

non traduites, ce qui lui permet d'être pris en charge pour être activement répliqué. Dans les complexes de réplication, la protéine NS5 orchestre la synthèse d'un ARN de sens négatif, complémentaire au sens positif et permet la formation transitoire d'un ARN double brin. Le brin de polarité négative sert de matrice pour une production en grande quantité d'ARN viral de sens positif (Khromykh et al., 2001). Les nouveaux ARNs viraux servent aussi bien d'ARN messager que de matériel génétique à incorporer dans les nouveaux virions.

La réplication des flavivirus et du ZIKV en particulier est conditionnée par la formation d'invaginations membranaires au sein du réticulum endoplasmique (Cortese et al., 2017). L'expansion membranaire produite est la conséquence de modifications ultra structurales du RE, induites et maintenues par le virus pour former des 'plateformes' de production de nouveaux virions (Evans et al., 2020; D. L. Lin et al., 2019). Les ARNs néosynthétisés au niveau de ces plateformes sont empaquetés par les protéines de capsid. Un bourgeonnement intervient pour enfermer les nucléocapsides dans la membrane du RE qui a incorporé les protéines membranaires prM et d'enveloppe E (T. Y. Tan et al., 2020). Les nouvelles particules émises dans la lumière du RE transitent ensuite dans Golgi puis dans des vésicules de sécrétion jusqu'à leur exocytose dans le milieu extracellulaire où elles forment la progénie virale (**figure 9**).

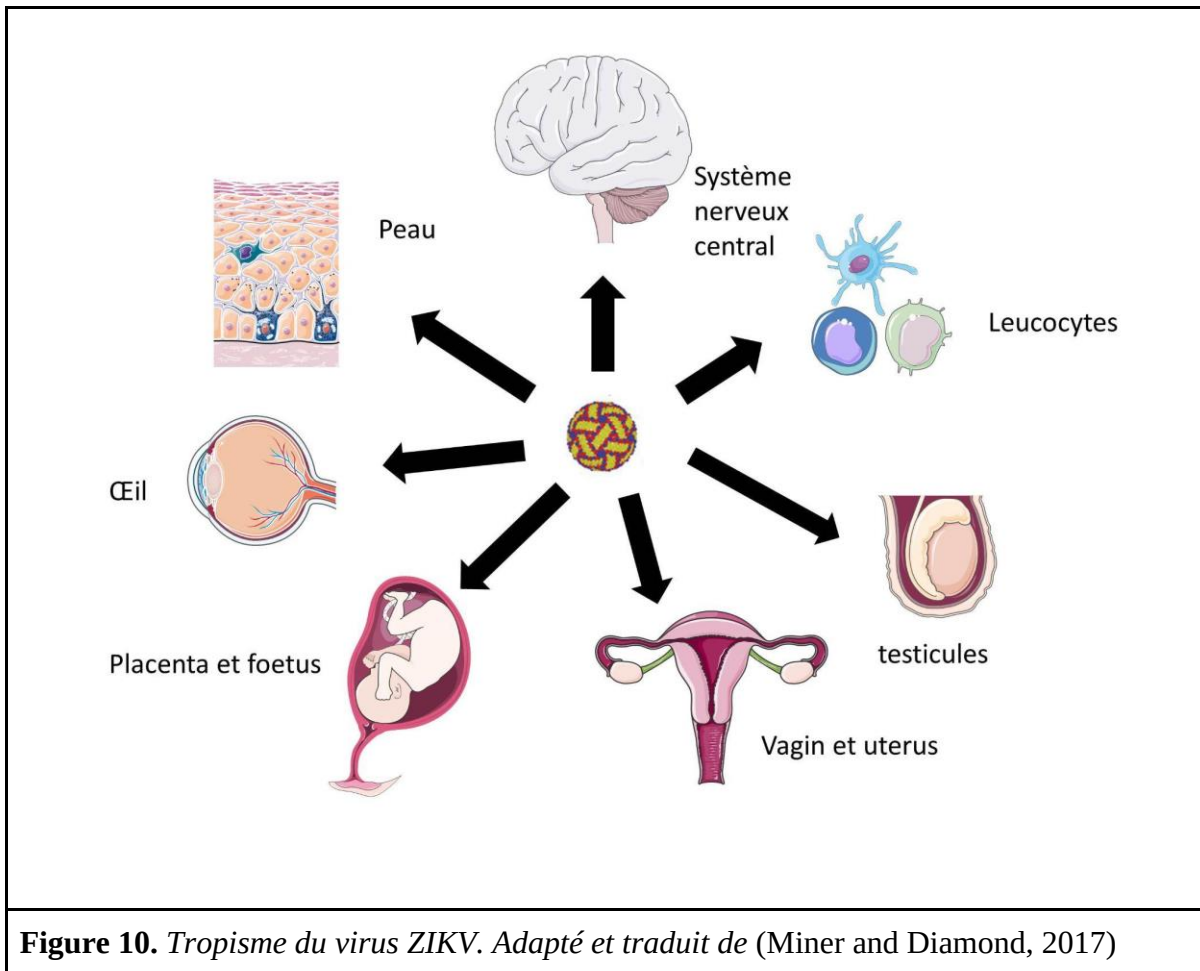
La littérature semble montrer une différence de cinétique d'infection, de réplication et de production de particules virales infectieuses entre les souches africaines et asiatiques de ZIKV. Les souches africaines présenteraient une plus grande capacité infectieuse en comparaison des souches asiatiques épidémiques. Ce constat peut sembler contre intuitif puisque les souches africaines ne sont pas connues pour être responsables d'épidémies

(Anfasa et al., 2017; Österlund et al., 2019; Sheridan et al., 2018; Simonin et al., 2017). Les différences entre les différentes souches virales, en termes de cinétique d'infection et de réplication, pourraient être liées à des capacités d'entrée différentes car il ne semble pas y avoir de différences majeures dans l'activité intrinsèque des RdRp de chaque souche (Zhao et al., 2017; Bos et al., 2018).

c) Tropisme et cycle de multiplication dans l'organisme humain

Les différentes manifestations cliniques résultent d'un tropisme cellulaire assez large de la part de ZIKV lorsqu'il se multiplie dans l'organisme humain infecté (**figure 10**). Le premier site de multiplication du virus, après piqure par un moustique contaminant, se situe au niveau de la peau. Les cellules épithéliales, les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules dendritiques résidentes semblent être toutes susceptibles et permissives au ZIKV (Hamel et al., 2015; J.-A. Kim et al., 2019). Plusieurs cellules immunitaires circulantes ou résidentes semblent elles aussi permissives, participant à la dissémination virale dans l'organisme (Michlmayr et al., 2017). ZIKV est surtout connu pour ses complications neurologiques chez les nouveaux nés. Les données disponibles montrent que ZIKV infecte préférentiellement les cellules neurales progénitrices et les astrocytes impliqués dans l'entretien du système nerveux central. Ce tropisme explique en partie les retards de développement cérébral des fœtus et nouveaux nés infectés (Ferraris et al., 2019; Limonta et al., 2018). Une particularité du ZIKV réside également dans sa capacité à persister dans le système reproducteur, en raison d'un tropisme pour les cellules de Sertoli et les spermatozoïdes (Mansuy et al., 2016; Bagasra et al., 2017). De nombreuses lignées cellulaires issues de tissus variés sont permissives et largement utilisées pour les infections *in vitro*. C'est le cas des cellules

épithéliales pulmonaires (A549), ou des cellules hépatiques (HuH7, HepG2), ou encore rénales (Alcendor, 2017; Shaily and Upadhya, 2019).



- d) Spécificités du genre flavivirus lors de leurs interactions avec leurs hôtes et pour la pathogenèse

On connaît une cinquantaine d'espèces du genre Flavivirus. La plupart ont pour hôte des mammifères, sont transmis par des arthropodes et sont donc des arbovirus (Simmonds et al., 2017). Plusieurs aspects de l'infection par les flavivirus sont remarquables.

(i) Les sfRNA

Une particularité déjà évoquée est la production, au cours du cycle viral, de petits ARN subgénomiques appelés sfRNA, correspondant à la région 3' non codante du génome viral. Ces ARNs non codants semblent jouer un rôle très important dans les processus infectieux et lors de l'adaptation virale à ses différents hôtes. Les sfRNA sont en effet connus pour moduler les réponses antivirales comme la réponse Toll chez les arthropodes ou la réponse interféron chez les mammifères (Schnettler et al., 2012).

(ii) “quasi espèces” et variabilité des génomes.

Comme pour de nombreux virus, la réplication des flavivirus aboutit à une production et une libération de virus présentant des variabilités dans leurs génomes. On parle de quasi-espèces. Cette diversité des quasi-espèces permet par exemple au DENV d'optimiser ses interactions avec son hôte en favorisant la sélection de mutations dans la région 3'UTR qui lui sont favorables chez l'insecte, puis d'en sélectionner d'autres plus optimales lors de son passage chez les mammifères (Villordo et al., 2015).

(iii) La protéine NS1

Une autre particularité des flavivirus est la production d'une protéine qui est sécrétée par les cellules infectées, la protéine non-structurale 1 (NS1). Cette glycoprotéine virale est retrouvée sous forme dimérique dans le réticulum endoplasmique et elle y est associée au complexe de réplication viral. Elle est aussi retrouvée sous forme hexamérique comme protéine extracellulaire soluble et circulante dans le sang (Muller and Young, 2013, p. 1). La glycosylation de cette protéine semble indispensable pour sa stabilité et sa présence

extracellulaire, puisqu'une suppression de la glycosylation conduit à une réduction de sa sécrétion (Annamalai et al., 2019; Macdonald et al., 2005). La forme hexamérique de la NS1 sécrétée (sNS1), très décrite pour la dengue, s'apparente à une lipoprotéine, car elle serait capable de fixer et transporter des lipides (Gutsche et al., 2011, p. 1).

L'identification de la sNS1 a permis l'élaboration d'une stratégie diagnostique spécifique pour les flavivirus (L. K. Tan et al., 2020), mais aussi de mettre au point des stratégies antivirales. Cette protéine est en effet largement impliquée dans la pathogénèse, en inhibant les facteurs du complément pour le WNV, ou en participant à la perméabilité vasculaire pour le DENV (Chen et al., 2018; Chung et al., 2006). La sNS1 aurait également un rôle dans la compétence vectorielle, en promouvant l'infection chez le moustique (J. Liu et al., 2016).

B. Interactions Hôte-Pathogène et manipulation des réponses de l'Hôte par le virus Zika

La résolution de l'infection virale dépend d'un ensemble de réponses cellulaires et moléculaires, mises en place précocement dans le but d'éliminer rapidement le virus pathogène. Lors de l'infection et quel que soit l'hôte, le virus révèle d'étonnantes capacités à établir des contre-mesures pour limiter, voire bloquer, certaines des réponses antivirales et pour optimiser sa dissémination en échappant aux systèmes visant à le contrer. Les interactions hôte-virus ressemblent à une véritable course à "l'armement" et aux stratégies de manipulations mutuelles, lesquelles semblent s'être mises en place et avoir évolué depuis leurs premières rencontres. Cette course parallèle a contribué à voir émerger le concept métaphorique de 'red queen effect' qui suggère que les interactions entre les pathogènes et leurs hôtes entraînent des évolutions permanentes pour le maintien d'une sorte de "*statu quo*".

L'organisme a plusieurs niveaux de surveillance et de mise en œuvre de défenses vis à vis de l'agent infectieux. Les barrières contre les infections sont d'abord physiques, avec les différents tissus épithéliaux (peau, épithélium intestinal, épithélium pulmonaire) et les cellules sentinelles du système immunitaire. Puis la lutte contre l'agent infectieux est cellulaire et moléculaire. Un ensemble de réponses composent l'immunité innée ou acquise et la réponse immunitaire adaptative. Elles conduisent à la mise en place de programmes et d'outils moléculaires visant à neutraliser le virus. La multiplication intracellulaire d'un virus,

le détournement des ressources et des activités cellulaires que cela occasionne vont également engendrer divers stress (métabolique, oxydant, stress du réticulum endoplasmique (RE),...). Ces stress seront autant de signaux de danger que la cellule analysera pour décider de se maintenir ou pas en vie. Les réponses cellulaires à ces différents stress telles que l'autophagie, l'UPR ou l'apoptose font partie de l'arsenal de réponses en principe antivirales avec lesquelles le virus va composer. Les différentes réponses déployées par l'hôte lors de l'infection et leurs manipulations éventuelles par ZIKV seront abordées dans les prochains paragraphes.

1. Les réponses immunes lors de l'infection par virus Zika

a) La réponse cellulaire innée

La réponse cellulaire innée repose sur des cellules qui s'activent de manière non spécifique et peuvent répondre à tous les types de signaux de danger. C'est une première ligne de défense de l'organisme qui doit par exemple faire face à l'élément exogène qui se multiplie à ses dépens. Toutes les cellules qui détectent un intrus potentiellement dangereux sont capables d'actionner individuellement des réponses innées. Des cellules spécialisées comme les cellules dendritiques (DCs), les neutrophiles, les monocytes et les cellules tueuses naturelles (NK) constitueront les sentinelles pour la détection de l'intrus. Lors d'une infection par un arbovirus, les premières interactions virus-cellule interviennent dans le tissu épidermique (Garcia et al., 2017; Glatz et al., 2017; Vogt et al., 2018). Les cellules dendritiques du derme ou les cellules de Langerhans, et les monocytes circulants rapidement recrutés deviennent les premières cibles (après les cellules de la peau) pour les arbovirus, car ces cellules mobiles permettent aux pathogènes de gagner l'ensemble des tissus (Johnston et al., 2000; Lei et al.,

2020). Lors de l'infection par ZIKV, on observe une infiltration et une activation de monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques et cellules Natural Killer (NK) (Hirsch et al., 2017; Silveira et al., 2017). Les monocytes intermédiaires (CD14⁺ CD16⁺) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes activées semblent retourner à un état basal pré-infectieux très rapidement lors de la phase de rémission (Lai et al., 2018; Tonnerre et al., 2020). En rejoignant les ganglions lymphatiques primaires et secondaires, pour activer les cellules immunitaires adaptatives, ces cellules permissives au virus et présentatrices d'antigènes (CPA) participent à la dissémination virale dans l'organisme (Michlmayr et al., 2017; O'Connor et al., 2018). Certains types de macrophages spécialisés comme les cellules de Hofbauer qui résident dans le tissu syncytiotrophoblastique semblent permissives au ZIKV. Leur capacité à franchir les barrières expliquerait en partie la transmission materno-foetale de ZIKV (Rabelo et al., 2020; Simoni et al., 2017; Zulu et al., 2019). ZIKV a pu acquérir la capacité d'utiliser l'immunité cellulaire innée, en infectant les monocytes/macrophages pour accéder à des tissus normalement immuno-privilegiés. Cela expliquerait également sa capacité à atteindre les tubes séminifères par l'intermédiaire d'une infection des macrophages S100A4⁺ et la production d'interféron gamma contribuerait à la perméabilisation de la barrière sang-testicule (Yang et al., 2020).

b) La réponse immune adaptative

La migration des CPA au sein des ganglions lymphatiques conduit à une maturation et à une plus grande spécificité de l'immunité à travers la mise en place de l'immunité adaptative (Gaudino and Kumar, 2019). Les CPA présentent les antigènes viraux après protéolyse et association aux complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) I et II. La réponse adaptative

passer par l'activation des Lymphocytes cytotoxiques (CD8+) T Helper (CD4+) qu'on peut diviser en deux groupes majoritaires, ceux de la réponse Th1 qui participent à l'activation de la réponse cytotoxique, et ceux de la réponse Th2, qui participent à l'activation des lymphocytes B, producteurs d'anticorps (Berger, 2000). D'autres sous-types de lymphocytes contribuent à la régulation des réponses Th1 et Th2. Parmi les réponses, la Th17 est caractérisée par la production d'IL-17 et est pro-inflammatoire et la Treg (régulatrice de l'inflammation), caractérisée par la production d'IL-10, est anti-inflammatoire (**figure 11**) (Eisenstein and Williams, 2009; Rouse and Sehrawat, 2010). Dans le cas d'une infection virale, les lymphocytes B et T (CD4 et CD8) sont activés s'ils reçoivent plusieurs signaux, dont l'antigène viral présenté par le CMH, mais aussi des signaux de costimulation comme la liaison de CD40 - CD40L et CD28 - CD80/CD86 (Chen and Flies, 2013). Dans le cas de l'infection par ZIKV on observe une réponse lymphocytaire T, CD4 (helper) et CD8 (cytotoxique) classique (Pardy and Richer, 2019). L'immunogénicité chez l'homme est associée à une activation forte des CD4 via les protéines E, NS1, NS3 et NS5, alors que la réponse CD8 semble plutôt activée par les protéines E, NS3 et NS5 (El Sahly et al., 2018). Ces données montrent l'importance des protéines non structurales du virus pour la mise en place d'une réponse immunitaire robuste. Cette implication doit être considérée dans le développement des stratégies vaccinales qui focalisent généralement sur l'immunogénicité des protéines d'enveloppe. Enfin la réponse lymphocytaire B semble fortement induite lors de l'infection par ZIKV, avec pour preuve la présence, dans les modèles de primates non-humains, de centres germinatifs où prolifèrent les lymphocytes B activés qui donneront les lymphocytes B mémoires et les cellules productrices d'anticorps (antibody producing cell APC), associés à une réponse humorale neutralisante (O'Connor et al., 2018).

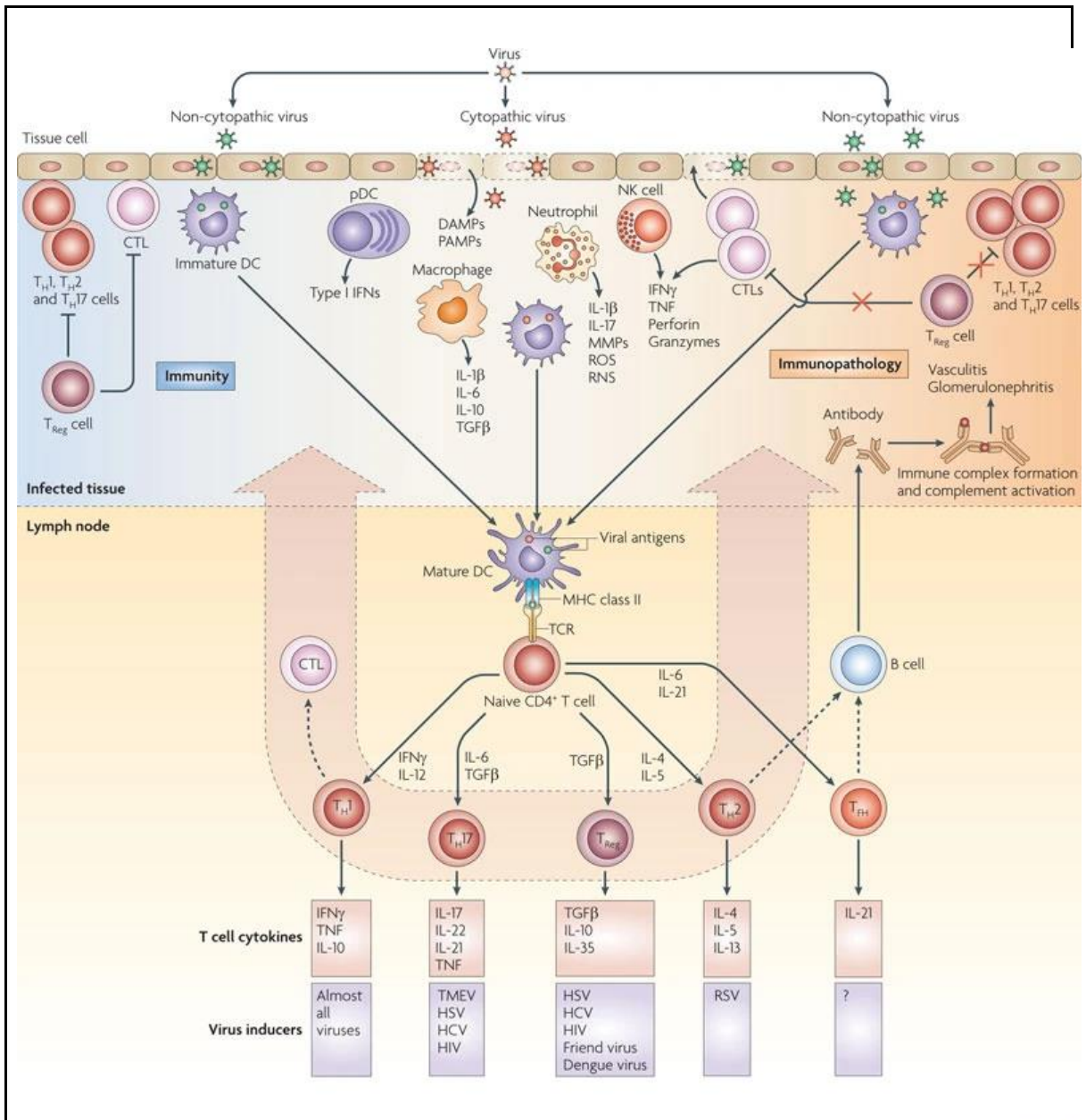


Figure 11. Réponse cellulaire innée et réponses cellulaire adaptative lors d'une infection virale. Lors de l'infection virale, les cellules présentatrices d'antigène et notamment les cellules dendritiques et les monocytes s'activent et stimulent l'activation des cellules de l'immunité adaptative. Les cellules CD4⁺ activées s'orientent différemment selon le contexte cytokinique. Les réponses Th1 et Th17 sont des réponses à des signaux pro-inflammatoires associées à une réponse cytotoxique. Les réponses Th2 et Treg sont des réponses plutôt anti-inflammatoires favorisant la réponse anticorps par les LB et inhibant la réponse Th1. Extrait de (Rouse and Sehrawat, 2010).

2. La réponse humorale lors de l'infection par virus Zika

a) Le complément

Les facteurs du complément sont des protéines solubles du plasma impliquées dans le contrôle des maladies infectieuses. Il existe 3 voies pour l'activation du complément, une voie classique, activée par les anticorps, une voie Mannose binding lectin (MBL) et une voie alternative. Ces trois voies conduisent à la reconnaissance du pathogène (opsonisation) et à la destruction de ces micro-organismes ainsi que des cellules infectées via le complexe d'attaque membranaire (MAC) (**figure 12**) (Serna et al., 2016). Lors de l'infection par ZIKV, le complément semble jouer un rôle non négligeable dans la réponse anti-virale. En effet, la littérature met en évidence que la formation de MAC par la voie classique a un effet virucide et conduit à réduction du titre viral (Schiela et al., 2018). Néanmoins, certaines données montrent que dans le même temps, la protéine E de ZIKV inhibe la formation de MAC, limitant son effet virucide (Malekshahi et al., 2020).

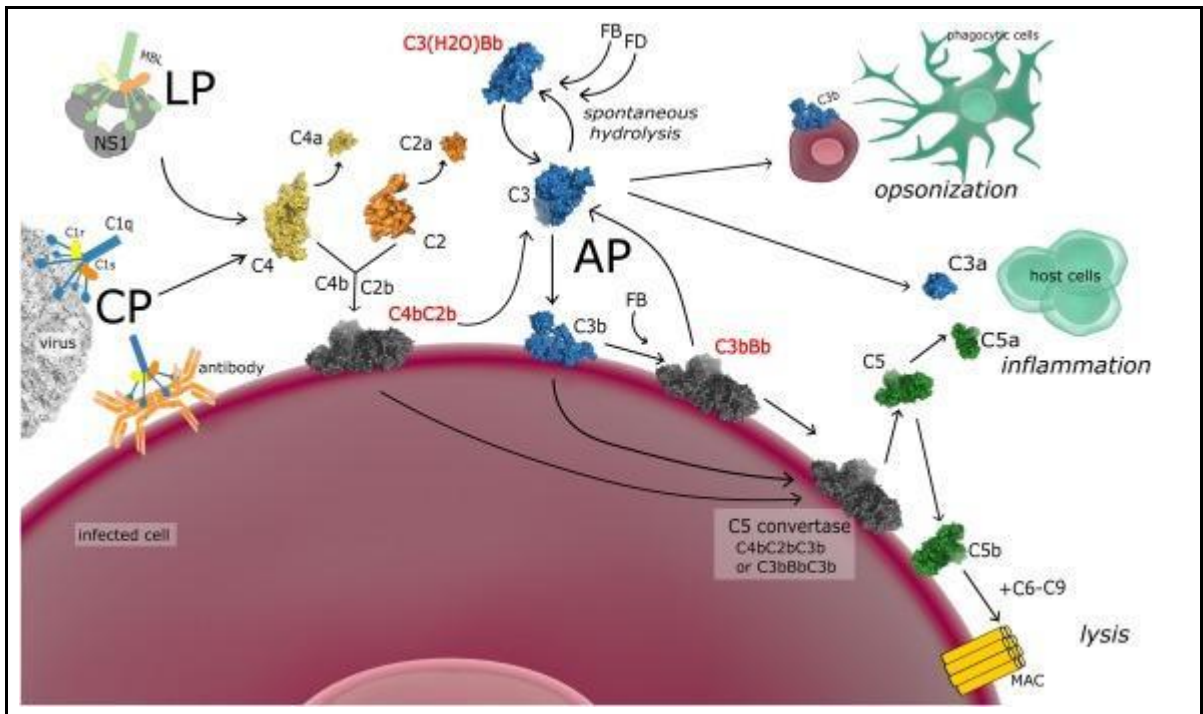


Figure 12. *Système du complément lors de l'infection par un flavivirus. Les voies classiques (CP) et lectine (LP) conduisent à la formation de la C3 convertase classique, alors que la voie alternative (AP) conduit à une C3 convertase alternative. Les trois voies conduisent ensuite à une C5 convertase et à la formation de complexes d'attaque membranaire (MAC). La voie LP est plutôt décrite pour interagir avec des protéines virales solubles (NS1), alors que la voie CP aurait une interaction directe sur la particule virale. Les produits de clivage des protéines du complément qui n'entrent pas dans la composition des convertases peuvent servir d'opsonine (C4b, C3b) ou de chemoattractants/anaphylatoxines (C3a, C5a) Extrait de (Byrne and Talarico, 2021)*

b) La réponse humorale adaptative

Lors d'une infection virale, la réponse humorale et lymphocytaire B, conduit à une production d'anticorps neutralisants pour éliminer efficacement les virus circulants. Cette réponse doit pouvoir induire une immunité mémoire pérenne pour être protectrice vis-à-vis d'une infection secondaire. (Dörner and Radbruch, 2007). La réponse humorale semble, tout comme pour d'autres Flavivirus tels que la Dengue, être dirigée contre les protéines prM, E

et NS1 mais aussi NS2B (Ravichandran et al., 2019; Stettler et al., 2016). La mise en place de cette réponse humorale perdure au moins 2 ans et semble diminuer au-delà (Collins et al., 2017). Il est à noter que les sérologies croisées entre ZIKV et d'autres Flavivirus comme la Dengue (Zaidi et al., 2020) rendent le diagnostic différentiel difficile. De plus, les phénomènes de facilitation de l'infection par des anticorps préexistants avec l'exemple des infections secondaires par les différents sérotypes de Dengue (Guzman et al., 2013), posent la question des risques liés à une immunité croisée. Il est connu que des infections successives par différents sérotypes de Dengue conduisent à des formes sévères plus fréquentes. Le mécanisme de facilitation dépend d'une formation de complexes immuns entre les virus infectieux et des anticorps devenus sub-neutralisants (antibody dependent enhancement ADE) (**figure 13**) (Guzman et al., 2013). Ces complexes immuns modifient le tropisme cellulaire viral et diminuent la réponse inflammatoire ce qui pourrait rendre compte des formes plus sévères de Dengue. Des co-infections ou surinfections DENV/ZIKV ont été observées en particulier au Brésil devenu endémique pour ces flavivirus (Carrillo-Hernández et al., 2018), mais les manifestations cliniques dues à Zika n'ont pas été significativement différentes chez les sujets qui avaient été pré exposés au virus de la Dengue (Masel et al., 2019). En revanche, il est possible qu'une pré-exposition au ZIKV puisse conduire à des formes sévères de Dengue (Katzelnick et al., 2020). Des modèles expérimentaux montrent une augmentation de la progénie virale lors de l'infection par ZIKV en conditions de pré-exposition à la Dengue, soulevant des questions sur la modulation des transmissions respectives de ces virus dans les régions de co-circulation (Tang et al., 2020). Finalement, les données sur le rôle de l'ADE entre ZIKV et d'autres flavivirus comme celui de la Dengue

restent trop parcellaires pour clairement démontrer un risque clinique accru lors d'une réinfection.

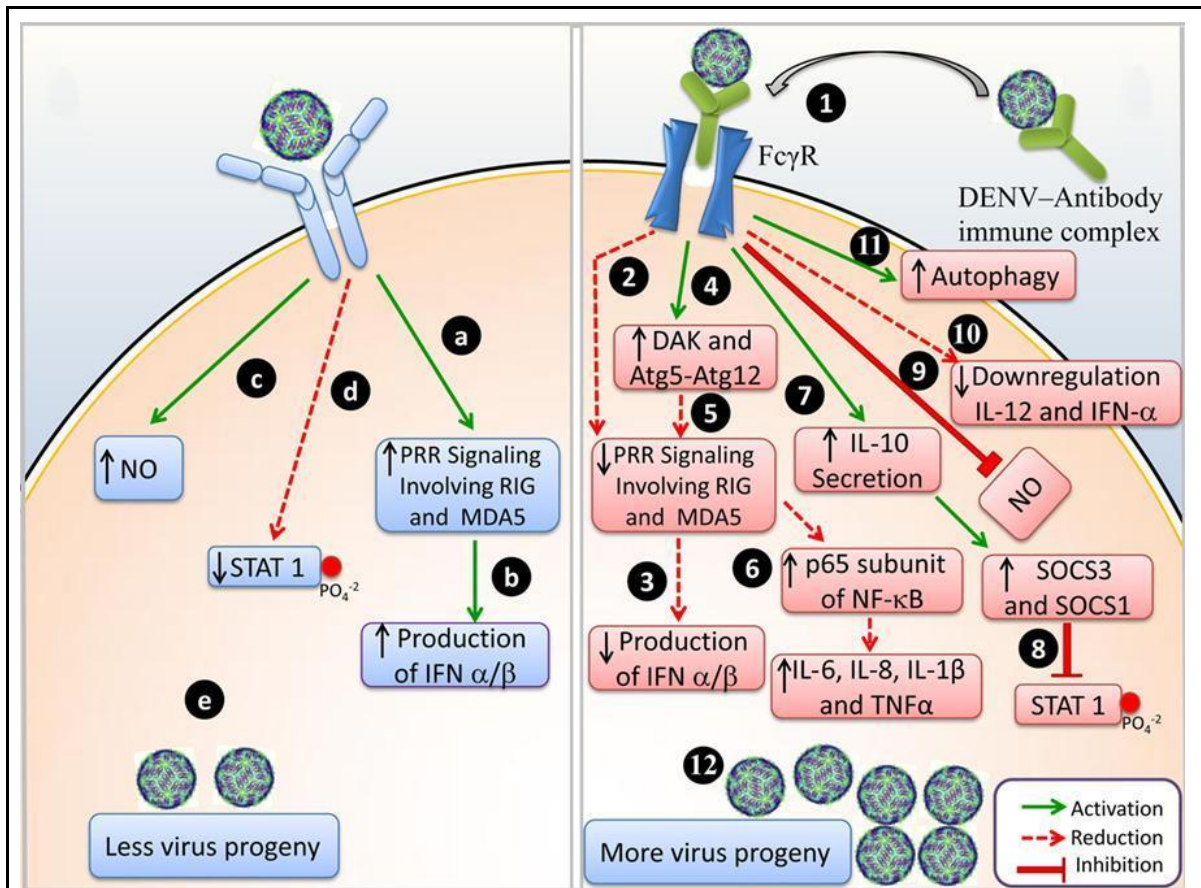


Figure 13. Mécanisme d'aggravation de l'infection médié par les anticorps. La partie gauche montre une infection classique avec l'activation de plusieurs voies de l'immunité innée, notamment a)b)c)d) aboutissant à une infection contrôlée. La partie droite montre une internalisation du virus médiée par les anticorps et leurs récepteurs (Fc γ R), conduisant à une diminution de la réponse interféron 2)3)4)8)9) associée à une perturbation de la réponse cytokinique 6)7)10) conduisant à une progénie virale bien plus importante que lors d'une primo infection 12). Extrait de (Khandia et al., 2018).

3. Réponses moléculaires innées antivirales

a) L'activation de PRRs lors de l'infection virale

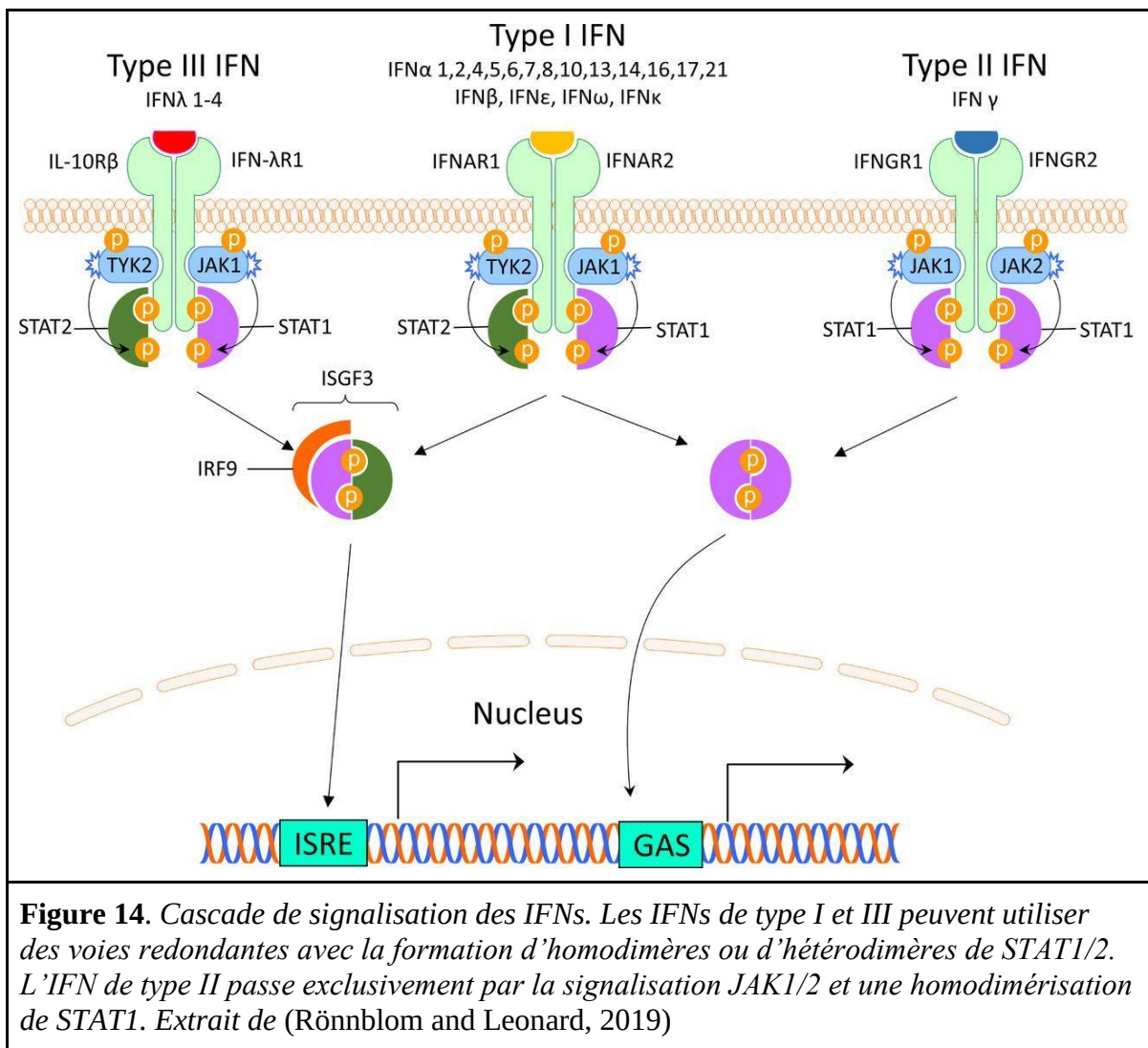
La reconnaissance des éléments étrangers et notamment des pathogènes est possible grâce à la présence en surface cellulaire et au niveau intracellulaire de plusieurs 'senseurs' de motifs pathogéniques exogènes (PAMPs, pour "pathogens associated molecular patterns") ou dangereuses (DAMPs, pour "danger associated molecular patterns"). On distingue dans cette grande famille de récepteurs, les Toll like receptors (TLRs), les RIG-I like receptors (RLRs), les NOD-like receptors (NLRs) et les AIM2-like receptors (ALRs). Ces PRRs reconnaissent une très grande variété de motifs conservés chez des agents étrangers, ou reflétant une physiologie cellulaire aberrante (Takeuchi and Akira, 2010). Les TLRs 1, 2, 4, 5, 6 sont exprimés à la surface cellulaire et sont principalement engagés dans la reconnaissance de motifs lipidiques et glucidiques (Lipopolysaccharides, flagellines, glycoprotéines) provenant de micro-organismes tels que les bactéries ou les champignons mais aussi certains virus. Les TLRs 3, 7, 8, 9 RLRs et NLRs se retrouvent surtout aux niveaux intracellulaires et reconnaissent principalement des acides nucléiques (ARN simple brin, double brin, ADN CpG), des constituants des parois bactériennes ainsi que des composants intracellulaires bactériens (Chow et al., 2015). L'activation des PRRs par ces motifs exogènes conduit à des voies de signalisations intracellulaires conservées, souvent redondantes, mais très contrôlées, comme la voie NF- κ B qui est un facteur de transcription lié à la production de cytokines pro inflammatoires, telles que les interleukines 1 beta, 6, 8 (IL-1beta, -6, -8). Les virus à ARN simple brin, tels que ZIKV, induisent majoritairement une réponse liée à la reconnaissance de leur matériel génétique sous sa forme simple et double brin (qui est spécifique de la réplication virale). Cette reconnaissance implique les TLR3 et TLR7, ainsi que les RLRs,

RIG-I et MDA5 (Jensen and Thomsen, 2012) et conduit à la production d'interféron mais aussi de cytokines pro-inflammatoires par activation de la voie NF- κ B.

b) La réponse interféron

Une infection virale détectée par les récepteurs de l'immunité innée déclenche la mise en place d'un programme cellulaire antiviral. En 1957 Alick Isaacs et J. Lindenmann isolent une molécule cellulaire interférant avec les virus animaux, et la nomme interféron (Henle, 1950; Isaacs and Lindenmann, 1957). Cette réponse interféron est induite par les PRRs intracellulaires notamment TLR3/7 et les RLRs (RIG-I et MDA-5). Pour TLR3 une protéine adaptatrice TRIF permet le recrutement et l'activation par phosphorylation d'IRF-3, un facteur de transcription qui s'associe en homodimère ou hétérodimère avec IRF-7, un autre facteur de transcription (Yamamoto et al., 2003). Les RLRs, RIG-I et MDA-5 sont des senseurs cytosoliques reconnaissant l'ARN double brin produit par la réplication d'un virus à ARN. Leur activation conduit à leur association avec la protéines MAVS (ou IPS1, VISA), puis au recrutement des protéines TBK1 et IKKe, qui conduiront tout comme la voie TLR3 à la phosphorylation d'IRF3 et/ou IRF7, lesquels activent la transcription du gène codant pour l'interféron (Au et al., 1995; Rehwinkel and Gack, 2020). Toutes les cellules sont capables de produire de l'IFN α/β , mais ces cytokines sont majoritairement produites par des cellules spécialisées que sont les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Siegal et al., 1999). L'interféron de type I ainsi sécrété pourra agir de manière autocrine ou paracrine en se fixant sur les récepteurs de l'interféron α/β (IFNAR 1 et 2) dont la distribution est très ubiquitaire. Deux autres types d'IFN existent, l'IFN de type II (IFN γ) dont les récepteurs sont les IFNGR1 et 2, et les types III (IFN λ) dont les récepteurs sont les l'IL10R2 et

l'IFNLR1(IL28R) (**figure 14**). La fixation de l'IFN conduit à la dimérisation des récepteurs et à la transphosphorylation des protéines TYK1 et JAK2 (Janus Kinase 2) pour les IFNs de type I et III qui utilisent les mêmes voies de signalisation, alors que les IFN de type II passent par l'activation de JAK1 et 2 (Darnell et al., 1994). La transduction conduit à la phosphorylation des protéines STAT (signal transducer and activator of transcription proteins) et à leur association 1) en homodimère pour STAT1 en réponse aux IFN de type II et 2) en hétérodimère STAT1-STAT2 et IRF9 pour les IFN I et III. Les dimères de STATs pourront ainsi gagner le noyau et jouer leur rôle de facteurs activateurs de transcription des gènes stimulés par l'interféron (interferon stimulated genes, ISG) (Schneider et al., 2014).



c) Les gènes stimulés par l'interféron (ISGs)

Les dimères de STATs phosphorylés, jouent leur rôle de facteurs de transcription au niveau de promoteurs particuliers qui répondent à l'interféron (Interferon stimulated response element, ISRE). Ces régions promotrices caractérisent les gènes ISGs, stimulés par l'interféron pour la mise en place d'un programme antiviral (Au-Yeung et al., 2013). Les ISGs rassemblent plus d'une centaine de gènes aux fonctions diverses allant des PRRs aux

facteurs de transcription, en passant par les molécules directement antivirales (**figure 15**). Parmi les PRRs, on retrouve notamment les RLRs, et les TLRs, notamment RIG-I et TLR3, dont la surexpression en conditions infectieuses potentialise la détection du virus et la réponse cellulaire antivirale. Les IRFs sont aussi sensibles à l'IFN comme IRF7. Parmi les ISGs à action antivirale, les plus étudiés sont les OAS, qui synthétisent des 2'-5' oligoadenylates sur les ARNs viraux et permettent leur reconnaissance et leur dégradation par la RNaseL (Drappier and Michiels, 2015). Parallèlement à l'induction de leur dégradation, les ARNs viraux constituent des PAMPs reconnus par la protéine Protein Kinase R (PKR). PKR activée diminue la traduction par la phosphorylation de eIF2 α et limite ainsi la synthèse de protéines virales (Rojas et al., 2010; Taylor et al., 2005). PKR est aussi impliquée dans l'induction de l'inflammation et de l'apoptose lors de l'infection virale (Gal-Ben-Ari et al., 2019). Certaines ISGs ont pour rôle de réguler la réponse IFN. C'est notamment le cas des protéines Suppressor of cytokines signaling (SOCS) et ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 18 (USP18) qui inhibent la voie JAK/STAT (Ivashkiv and Donlin, 2014). Les données de la littérature indiquent que l'infection par ZIKV produit une réponse IFN fonctionnelle (Frumence et al., 2016), mais modulée à plusieurs niveaux, qui seront détaillés plus loin dans ce manuscrit.

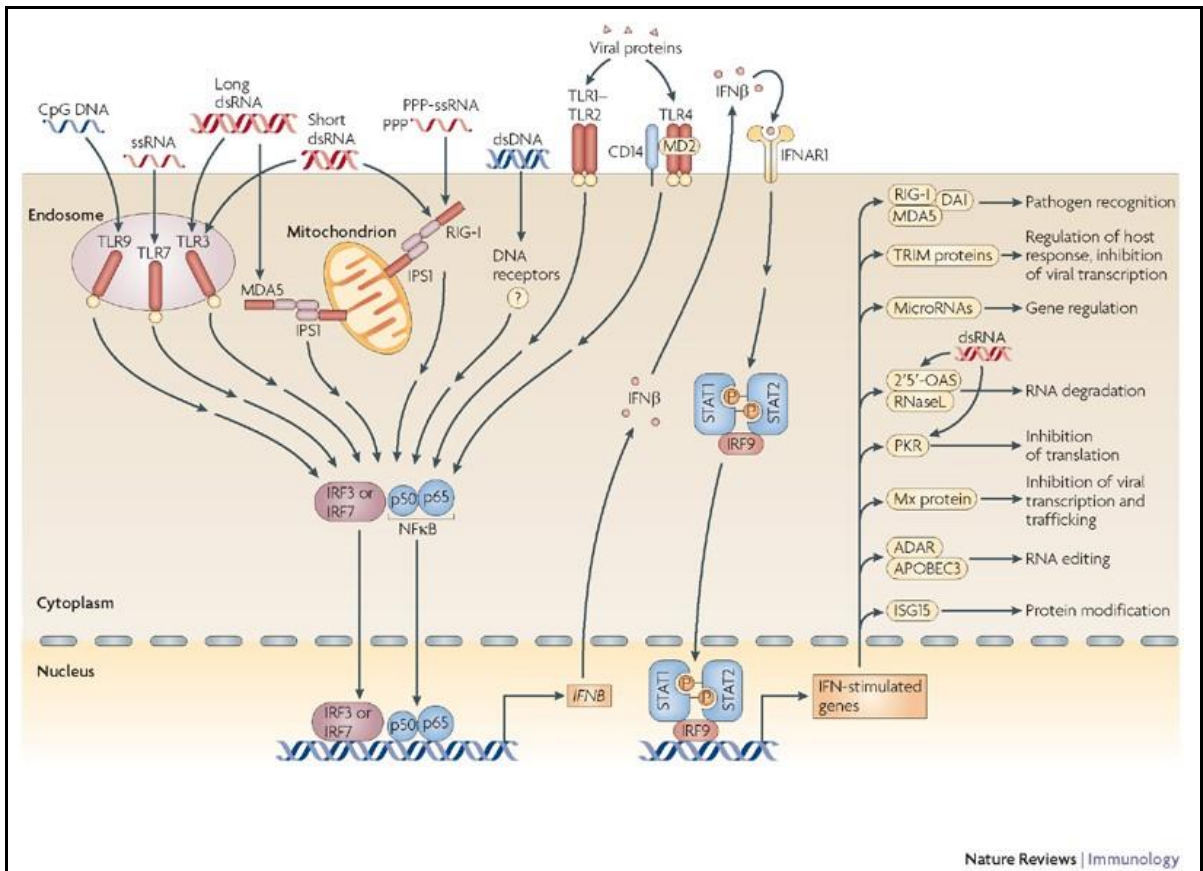


Figure 15. Expression des gènes stimulés par l'interféron. La reconnaissance des motifs moléculaires étrangers, tels que de l'ARN simple brin (ssRNA) ou double brin (dsRNA) peut conduire à l'activation de la voie NFκB, mais surtout à l'expression d'interféron et aux gènes antiviraux associés que sont les IFN-stimulated genes (ISGs). Parmi eux on distingue des PRRs (RIG-I, MDA5), des enzymes de dégradation des ARNs viraux (OAS, RNaseL), des inhibiteurs de traduction (PKR), ou des protéines modifiant des protéines virales et celles de l'hôte comme des ubiquitine-ligases (TRIMs, ISG15). Extrait de (Bowie and Unterholzner, 2008).

d) L'inflammation viro-induite

L'afflux de cellules immunitaires conduit à une inflammation du tissu infecté. Si le processus inflammatoire est une réponse innée et normalement protectrice quand elle est résolue, elle peut devenir pathologique si elle est perturbée ou entretenue dans le temps

(Furman et al., 2019). L'infiltration tissulaire et notamment dermique conduit à une inflammation localisée avec une production de cytokines et chimiokines souvent pro-inflammatoires et pyrogènes comme l'interleukine 1 β (IL-1 β), l'interleukine 6 (IL-6) ou l'interleukine 8 (IL-8) caractérisant la phase aiguë de l'infection (Iani et al., 2016; Tappe et al., 2016). Ces réponses inflammatoires sont souvent dues à la production de ces cytokines par des cellules de l'immunité innée et adaptative, mais aussi par les cellules non-immunitaires. Elles permettent le recrutement efficace d'autres cellules immunitaires, jusqu'à la résolution de l'infection. Les voies de signalisation conduisant à la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires sont nombreuses et souvent redondantes lors des infections virales (Mogensen and Paludan, 2001). Parmi toutes ces voies conduisant à la production de cytokines, une est particulièrement étudiée, c'est la voie impliquant le facteur de transcription NF κ B (Nuclear Factor kappa B). La voie NF κ B est une réponse moléculaire rapide et non dépendante d'une synthèse protéique. En effet, il existe dans un état basal un complexe formé de protéines inhibitrices de NF κ B, notamment I κ B α . I κ B α pourra être phosphorylé par différentes voies de signalisation, via l'activation de PRRs. Parmi les voies de signalisation conduisant à l'activation de NF κ B, hormis les récepteurs de cytokines pro-inflammatoires (TNFR, IL1R), on retrouve les TLRs. La reconnaissance des ARNs viraux par TLR3 peut conduire, via la protéine RIP1, à l'activation de la protéine NEMO puis à la dégradation des inhibiteurs de NF κ B (I κ B). Une fois phosphorylé, I κ B sera ubiquitinylé et adressé au protéasome pour dégradation, libérant ainsi les deux sous unités p50 et p65 formant le facteur de transcription NF κ B (Liu et al., 2017). L'activation de NF κ B conduit à l'expression de nombreux gènes dont plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-6. L'activation de NF κ B peut aussi conduire à la transcription de NLRP3 ou

NALP3, protéine support de l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe protéique composé de NLRP3, la protéine adaptatrice ASC, et de la Caspase 1. Ce complexe permet entre autres la maturation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-18.

4. Manipulation des réponses immunes par le virus Zika

a) Manipulation des voies de l'interféron

Comme énoncé dans le paragraphe précédent, la réponse interféron est une des réponses de défense antivirale les plus immédiates auxquelles un agent infectieux pathogène intracellulaire doit faire face. Il n'est donc pas rare de voir que les virus ont acquis au cours de leur coévolution avec leur hôte, une certaine protection vis à vis de cette réponse innée qui leur est défavorable (Katze et al., 2002). ZIKV ne déroge pas à la règle et une abondante littérature décrit les facteurs qui chez les flavivirus interfèrent avec la réponse interféron. Premièrement, un des facteurs propres aux flavivirus et propices à “interférer” avec les réponses innées, est fourni par les ARN viraux subgénomiques, les sfRNA (Göertz et al., 2018). Ces sous-produits de la dégradation des ARNs viraux par la XRNase (voir plus haut) avec leurs structures secondaires caractéristiques sont abondamment produits au cours du cycle viral. Ils ont la capacité de leurrer la voie ARN interférant (RNAi), aussi bien chez le moustique vecteur que chez les mammifères (Schnettler et al., 2012). Ils permettent aux génomes viraux complets d'échapper aux systèmes de défense de l'hôte qui passent par la dégradation des ARNs. Les sfRNA peuvent aussi perturber la réponse immune innée par la voie RIG-I, via la déubiquitinylation de TRIM25 (Manokaran et al., 2015). Parmi les facteurs viraux, la protéine NS5 est largement décrite comme inhibitrice de la translocation nucléaire de STAT2, de la réponse via RIG-I ou encore des facteurs intermédiaires de la voie

interféron comme TBK1 (Grant et al., 2016; A. Li et al., 2020, p. 5; S. Lin et al., 2019). De plus, la protéine NS5 du ZIKV formerait des structures particulières, associées aux corps nucléaires composé de Promyelocytic Leukemia Protein (PML) dans le noyau, voire diminuerait leur nombre, ce qui limiterait d'autant plus la réponse à l'interféron (Conde et al., 2020; García et al., 2020; Tan et al., 2019). D'autres facteurs viraux ont été décrits comme acteurs possibles d'une modulation de la réponse interféron, notamment la protéine NS1 de la souche épidémique qui semble avoir acquis une mutation (A188V) qui améliore sa capacité à inhiber la réponse IFN α , en comparaison de la NS1 de la souche historique MR766 (Xia et al., 2018). D'autres protéines virales sont impliquées dans la manipulation de la réponse interféron comme la NS2B3 et NS4B qui retarderait même possiblement la mort cellulaire induite par la reconnaissance de double brin d'ARN (Wu et al., 2017).

b) Manipulation des voies de l'inflammation et de l'inflammasome

La réponse inflammatoire est cruciale pour la résolution d'une infection virale. En effet, elle conditionne, entre autres, le recrutement des cellules immunitaires et les réponses innées et adaptatives. Les cytokines pro-inflammatoires produites permettent aussi d'activer de nombreuses réponses anti-virales et même d'induire la mort cellulaire des cellules infectées. Lors d'une infection par un flavivirus, de nombreuses voies de signalisation inflammatoire sont activées (Garcia et al., 2017; Maximova et al., 2009). Dans le cas spécifique de ZIKV, les cellules périphériques mononucléées (PBMC), les macrophages, les cellules astrocytaires ou les cellules rénales humaines induisent une réponse inflammatoire avec une production d'IL-1 β mature via l'inflammasome (He et al., 2018; T. Liu et al., 2019; Tricarico et al., 2017; Wang et al., 2018). Des données sur l'activation de la caspase 1 et l'inflammasome,

semblent montrer que la protéine NS1 serait capable de recruter une ubiquitine ligase pour prévenir la dégradation de la caspase 1, ce qui permet d'entretenir la production de cytokines pro-inflammatoires mais permet aussi de limiter la réponse IFN en clivant la protéine cGAS (Zheng et al., 2018). Certaines données suggèrent néanmoins que des facteurs viraux, comme la NS3, seraient capables de réduire l'activité de l'inflammasome pour limiter la réponse immunitaire (Gim et al., 2019)

5. Le stress du réticulum et la réponse UPR, réponses cellulaires lors de l'infection virale

a) Le stress du réticulum

Le réticulum endoplasmique (RE) est un compartiment essentiel de la physiologie cellulaire. C'est le lieu de la synthèse et du renouvellement des composantes lipidique, protéique et glucidique des membranes, le point de départ pour les voies de sécrétion et le site cellulaire majeur pour le stockage des ions calcium libres Ca^{2+} . Les protéines transloquées dans le RE acquièrent la plupart du temps leur conformation native, au travers de la formation d'interactions hydrogènes, d'interactions de faible énergie (Interactions de Van der Waal), de la formation de ponts disulfures et en subissant des modifications post-traductionnelles importantes, comme des glycosylations, des phosphorylations ou des oligomérisations. Le repliement correct et le contrôle très strict de celui-ci est très organisé au sein du RE (Braakman and Hebert, 2013). Néanmoins, suite à un événement perturbateur tel qu'un afflux et une accumulation de protéines, un mauvais repliement protéique, une dysfonction des échanges ioniques et très fréquemment au cours d'une infection virale, le réticulum peut être sujet à un encombrement temporaire ou persistant, conduisant à un stress (ER stress)

(Oakes and Papa, 2015). Physiologiquement, ce stress existe dans certaines conditions qui exigent une sécrétion rapide et très active de protéines. C'est le cas lors de la différenciation des lymphocytes B en APC, où le RE doit accroître de manière importante sa capacité de production d'immunoglobulines (Gass et al., 2004). C'est aussi le cas lorsque les cellules β pancréatiques répondent à une élévation de la concentration en glucose, et augmentent le niveau de la production de l'insuline (Kim et al., 2012). Le repliement et le contrôle des configurations tridimensionnelles des protéines est assuré par de nombreuses protéines chaperonnes, dont la Glucose Related Protein de 78kDa (GRP78/BiP) ou la GRP94. Cette protéine GRP78 ou BiP joue un rôle important dans la détection du stress du RE, puisqu'elle sert au titrage des protéines mal repliées (Hendershot, 2004) et transduit le signal d'un encombrement du RE. Le stress du RE est un dénominateur commun dans plusieurs pathologies, comme le diabète, les maladies neurodégénératives ou les cancers. Le mauvais repliement de protéines et leur accumulation conduit au stress qui induit ensuite une réponse cellulaire à ces protéines mal repliées, appelée the '*unfold protein response*' (UPR) initiée pour résoudre le stress.

b) La réponse UPR (Unfold Protein Response)

Suite à un stress du RE, la réponse UPR se met en place. Cette réponse biologique, dont l'objectif est la restauration de l'homéostasie, permet dans un premier temps de limiter l'afflux et l'encombrement du réticulum en protéines. Pour se faire, trois branches de l'UPR sont activées (**figure 16**).

La première voie est celle de la Protéine kinase R-like (PKR-like) Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK). PERK est un récepteur transmembranaire situé dans la lumière du réticulum

qui, dans des conditions normales et physiologiques, est lié à la protéine chaperonne BiP/GRP78. Le recrutement de la chaperonne BiP par des protéines mal repliées en quantités croissantes libère PERK qui peut alors oligomériser et s'autophosphoryler (Cui et al., 2011). Cette activation de PERK conduit à la phosphorylation du facteur de traduction eIF2-alpha (eIF2 α). La forme eIF2 α phosphorylée inhibe la traduction protéique et en conséquence, limite l'afflux de protéines néosynthétisées dans le RE. Dans un même temps, PERK induit sélectivement, via eIF2 α phosphorylé, la traduction du gène codant pour le facteur ATF4 grâce à une régulation spécifique de l'expression de ce gène qui repose sur la présence de petits cadres ouverts de lecture (uORF) en amont de l'ORF principale de ATF4 (Vattem and Wek, 2004). L'activation d'ATF4 qui est un facteur activateur de la transcription conduit à l'expression augmentée d'autres facteurs de transcription, comme certains ATFs et GADD153/CHOP.

La seconde branche transduite de l'UPR conduit à la relocalisation du facteur ATF6, depuis le RE vers l'appareil de Golgi. Son clivage par les protéases Site-1 protease (S1P) et S2P, lui permet de gagner le noyau où il régule à la hausse l'expression de plusieurs protéines chaperonnes, dont GRP78 et GRP94. L'activation d'ATF6 conduit aussi à celle de XBP1, un facteur de transcription nécessaire à l'expression de gènes impliqués dans la dégradation protéique via le protéasome. ATF6 permet ainsi d'augmenter les capacités de traitement des protéines devant être repliées et dans le même temps d'accentuer l'élimination des quantités protéiques accumulées.

La troisième voie passe par l'Inositol requiring enzyme 1 (IRE1). Sa dissociation de Bip/Grp78 conduit à l'autophosphorylation de IRE1 qui peut à son tour phosphoryler

d'autres protéines telles que TRAF2, ASK1, ou JNK. Ces cibles jouent un rôle dans la mort et la survie cellulaire. De plus, IRE1 possède un domaine endonucléase qui permet un épissage alternatif, dans le cytoplasme, du transcrit du gène codant pour le facteur de transcription XBP1. Le transcrit alternatif permet la production du facteur de transcription XBP1s. Ce dernier est responsable de l'expression accrue de gènes liés à l'ERAD (ER stress Associated Degradation) (Bouchecareilh and Chevet, 2009). Il contribue ainsi à réduire la charge en protéines dans le RE en favorisant leur élimination. XBP1s est aussi impliqué dans la transcription du gène codant pour le facteur de transcription pro-apoptotique GADD153/CHOP (Yang et al., 2017). Les trois branches activées de l'UPR doivent restaurer l'homéostasie du RE et permettre la survie cellulaire. Si la réponse UPR ne suffit pas à résoudre le stress du RE, cela peut conduire à la mort cellulaire par apoptose par des voies décrites plus bas dans ce manuscrit.

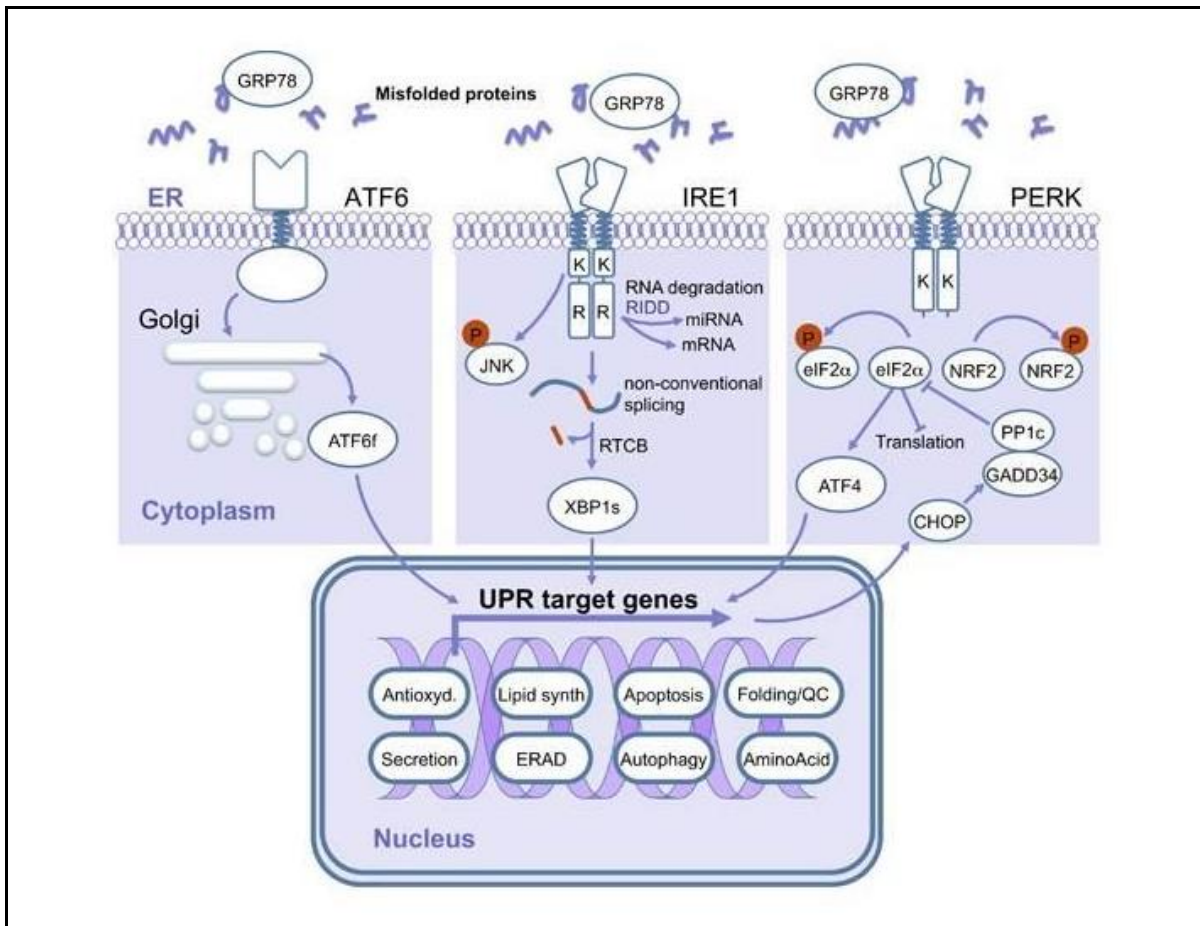


Figure 16. Voies de signalisation de l'UPR. L'activation de l'UPR est dépendante du recrutement de la protéine chaperonne GRP78/BiP lors du stress du RE. Il existe actuellement 3 voies de signalisation de la réponse UPR. La voie ATF6, qui une fois clivée dans le golgi conduit à l'expression de protéine chaperonne mais aussi de XBP1. La voie IRE1 conduit, par son domaine exonucléase, à l'activation de XBP1 par épissage non conventionnel et à l'expression de gènes impliqués dans la dégradation protéique mais aussi dans la synthèse lipidique. Enfin la voie PERK conduit à la réduction de la traduction via *eIF2α*, à une réponse anti-oxydante via NRF2 et à l'apoptose via l'expression du facteur de transcription CHOP. Extrait de (Avril et al., 2017)

6. L'autophagie, réponse cellulaire lors de l'infection virale

a) Rôle physiologique de l'autophagie

L'autophagie est une réponse cellulaire physiologique indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire et tissulaire. Cette réponse cellulaire est impliquée dans l'élimination de contenu cellulaire indésirable mais sert aussi au recyclage et au maintien de ressources énergétiques et nutritives (Dikic and Elazar, 2018). Classiquement la privation de nutriment ou un désordre énergétique conduit à l'initiation de l'autophagie, par l'activation des autophagy related genes ou protein (Atg ou ATG) et de la formation d'autophagosomes permettant le recyclage de composés cellulaires et d'organelles (Mizushima and Komatsu, 2011). Un des médiateurs centraux de cette réponse est la protéine Beclin-1, qui avec d'autres protéines comme UVRAG, Vps34 (PI3KC3) et Vps15 (dans un complexe PI3Kinase) initie la formation des autophagosomes. La maturation de l'autophagosome s'effectue ensuite via les conjugaisons des Atg5 et Atg12 complexés avec Atg16 puis la conjugaison de la protéine LC3-I avec les phosphatidylethanolamine (PE) pour former le LC3-II (He and Levine, 2010; Romanov et al., 2012, p. 5; Tanida et al., 2008, p. 3). La protéine Beclin-1 est, en temps normal (si les ressources cellulaires sont suffisantes et en absence de stress), liée à la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui inhibe l'autophagie (Decuypere et al., 2012). Il est montré qu'il existe un lien très fort entre l'induction de l'autophagie et la survie cellulaire (Kang et al., 2011). En cas de stress divers, Bcl-2 est notamment phosphorylé par la kinase JNK1 sur la tyrosine T69, et les sérines S70, and S87 et cette phosphorylation conduit à la dissociation de Bcl-2 et de Beclin-1 (Wei et al., 2008). La survie cellulaire lors de la dissociation de Bcl-2 et Beclin est potentiellement due à l'inhibition des protéines Bax et Bak par Bcl-2, limitant l'initiation de l'apoptose (Lindqvist

et al., 2014). Néanmoins une autophagie trop importante conduisant à la neutralisation des activités des organites intracellulaires, en particulier dans le cas d'une mitophagie importante, peuvent conduire au contraire la mort cellulaire (Bialik et al., 2018).

b) L'autophagie lors de l'infection virale

La mise place d'une réponse autophagique, en principe antivirale, semble à double tranchant au cours de l'interaction d'un virus et de sa cellule hôte. Si l'autophagie conduit à la dégradation de nombreux composés cellulaires et donc à la dégradation de pathogènes intracellulaires piégés dans ces phagophores puis digérés dans les autophagolysosomes, certains pathogènes, dont des virus, ont évolué en contrant ces mesures de dégradation spécifique de 'virophagie' (Choi et al., 2018). Certains virus, comme les alphavirus et le virus du Chikungunya en particulier, ont ainsi acquis la capacité de se développer dans les replis membranaires autophagiques en les transformant en plateformes de réplication (Echavarria-Consuegra et al., 2019; Judith et al., 2013; Krejbich-Trotot et al., 2011b). Dans le cas de la Dengue, l'autophagie semble indispensable pour la maturation des particules virales et de la protéine membranaire prM en particulier, au profit d'une pathogénicité accrue de DENV dans le modèle murin (Mateo et al., 2013). L'infection par ZIKV des cellules de mammifères, s'accompagne d'un réarrangement drastique du RE (Cortese et al., 2017). Ce réarrangement est accompagné d'une activation de l'autophagie, avec une augmentation des marqueurs spécifiques tels que LC3-II (Hamel et al., 2015). La littérature montre que l'autophagie est à la fois bénéfique pour le virus en lui offrant des sites de réplication privilégiés et antivirale par réticulophagie (ER-phagie) (Chiramel and Best, 2018). Des modèles cellulaires de trophoblastes humain infectés et des modèles *in vivo* murin montrent

que l'autophagie aggraverait l'infection et la pathogénicité (Gratton et al., 2019). Cependant l'autophagie semble aussi agir au détriment du virus par une action promotrice de la réponse interféron (Huang et al., 2020). ZIKV induit le clivage de FAM134B via NS2B3, montrant sa capacité à interférer avec une forme de l'autophagie (ER-phagie) qui lui serait néfaste (Lennemann and Coyne, 2017). Ces diverses observations montrent que ZIKV multiplie les stratégies pour contrecarrer des réactions de défense mises en place par les cellules infectées.

2. L'apoptose, réponse cellulaire lors de l'infection virale

Lors de l'interaction entre un pathogène et son hôte et parmi les réponses qu'une cellule engage pour se défendre contre un virus qui a détourné son fonctionnement à son unique profit, il y a l'apoptose. Cette autodestruction programmée est en quelque sorte un sacrifice engagé en dernier recours pour permettre de court-circuiter la multiplication du virus et sa propagation. Au cours du processus infectieux, la cellule est soumise à une accumulation de plusieurs stress décrits dans les paragraphes précédents et chacun peut être déclencheur d'une signalisation qui aboutit à son suicide. Des dommages divers, tels que la surcharge protéique du réticulum lors de la réplication virale et la réponse UPR, l'autophagie, les interférences entre le cycle viral et le cycle cellulaire ou encore la production d'espèces réactive de l'oxygène (ROS), la reconnaissance du génome viral par les PRRs et l'immunité innée, sont autant de signaux pouvant conduire à la mort cellulaire par apoptose (Simon et al., 2000; Thyrell et al., 2002; Tabas and Ron, 2011). Les protéines virales elles-mêmes sont capables d'induire individuellement la réponse apoptotique, démontrant la relation ambiguë que le pathogène établit avec cette réponse qui lui est en principe défavorable (Teng et al., 2017; Bhagat et al., 2018). L'induction de l'apoptose est une stratégie antivirale coûteuse

pour l'organisme, car elle peut contribuer à la pathogenèse lors de l'élimination massive de cellules dans certains tissus, en particulier lorsque cette autodestruction concerne des cellules ne se renouvelant pas. Inversement, elle semble nécessaire pour permettre une résolution de l'infection et l'élimination du virus dans le temps de la phase aiguë de l'infection. Un défaut ou un retard de ce mécanisme est impliqué dans les phénomènes de persistance virale et d'évolution des pathologies infectieuses vers des formes chroniques. Le prochain chapitre sera consacré à un état de l'art sur la mort cellulaire apoptotique et son impact dans les conditions d'infection virale et comment ces données m'ont conduit à la problématique de recherche que je présente, sur la manipulation de cette réponse par ZIKV .

C. Mort cellulaire par apoptose

1. L'apoptose dans l'homéostasie tissulaire

a) Equilibre cellulaire dans les tissus

L'apoptose est une mort cellulaire génétiquement programmée permettant de réguler l'homéostasie tissulaire et ainsi d'éliminer les cellules non-viables, délétères, endommagées, infectées ou non-nécessaires (Meier et al., 2000). Un déséquilibre entre croissance et mort cellulaire peut conduire à plusieurs pathologies associées, entre autres, à des cancers ou des maladies neurodégénératives (Mattson, 2000). La mort cellulaire par apoptose répond à des critères morphologiques et biologiques spécifiques. Cette terminologie a été proposée en 1976 par Kerr et ses collaborateurs pour décrire une mort cellulaire par étapes bien identifiées, qu'il nomme 'apoptose' en référence à une locution grecque utilisée par Hippocrate pour décrire une destruction tissulaire lui faisant penser à la chute des feuilles en Automne (Kerr et al., 1972). La morphologie de la cellule apoptotique se modifie avec une

condensation de son noyau (pyknosis), sa fragmentation (karyorrhexis) suivies d'un stade de bourgeonnement de la membrane plasmique (blebbing) et de production de 'blebs' et de corps apoptotiques qui seront internalisés par des cellules avoisinantes ou des phagocytes professionnels (efferocytose). On parle souvent de 'mort propre' pour caractériser l'apoptose. En effet, cette mort programmée permet aux cellules d'exposer des signaux membranaires, les phosphatidyl-sérines/PtdSer qui, en face extracellulaire constituent les signaux 'Eat-me' et d'émettre des molécules de localisation 'Find-me', 'come and get-me' (nucléotides ATP et UTP) qui entraînent le recrutement et la reconnaissance par des cellules immunitaires, dont des macrophages qui vont assurer une élimination rapide des cellules mourantes (Depraetere, 2000). Dans ces conditions, l'apoptose n'entraîne aucune réponse inflammatoire, contrairement à ce qui est observé dans un tissu nécrotique (Rock and Kono, 2008). L'entrée d'une cellule en apoptose est dépendante de signaux internes et/ou externes, conduisant à l'activation de protéases spécialisées, les caspases, et à la dégradation du contenu cellulaire (Fink and Cookson, 2005). Les caspases sont des enzymes exprimées de manière constitutive, présentes sous forme inactive et qui s'activent via une association à des complexes protéiques de signalisation spécifiques (le DISC pour la caspase 8; l'Apoptosome pour la caspase 9) ou suite à une activation par d'autres caspases.

b) Suractivation de l'apoptose dans un tissu

Si l'apoptose permet un contrôle quantitatif et qualitatif pour l'homéostasie cellulaire et tissulaire, une suractivation de cette voie de mort peut devenir pathologique. Une activation trop importante de l'apoptose peut conduire à des situations inextricables lorsqu'elle concerne certaines populations de cellules qui ne se renouvellent pas ou dont la perte peut

affecter le fonctionnement d'un organe ou d'un système, comme par exemple dans le cas du système immunitaire. Un excès d'apoptose est en cause dans les pathologies neuro dégénératives telles que Alzheimer, Parkinson ou Huntington. L'apoptose faisant partie des systèmes de défenses cellulaires rapidement mises en place pour faire face à un agent infectieux, l'autodestruction excessive de cellules infectées participe aux processus pathologiques lors d'une infection. Par exemple, la mort cellulaire induite des lymphocytes T4 lors d'une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), participe à la lymphopénie sévère et à la pathologie SIDA (Février et al., 2011, p. 4). Dans les arboviroses, l'apoptose des cellules infectées participerait à l'évolution de la pathologie et aux manifestations cliniques, notamment arthralgiques pour le chikungunya (Long and Heise, 2015), et/ou neurologiques pour plusieurs flavivirus, tels que ZIKV ou le virus du Nil occidentale (WNV) (de Sousa et al., 2019; Peng and Wang, 2019).

c) Défaut d'apoptose dans un tissu

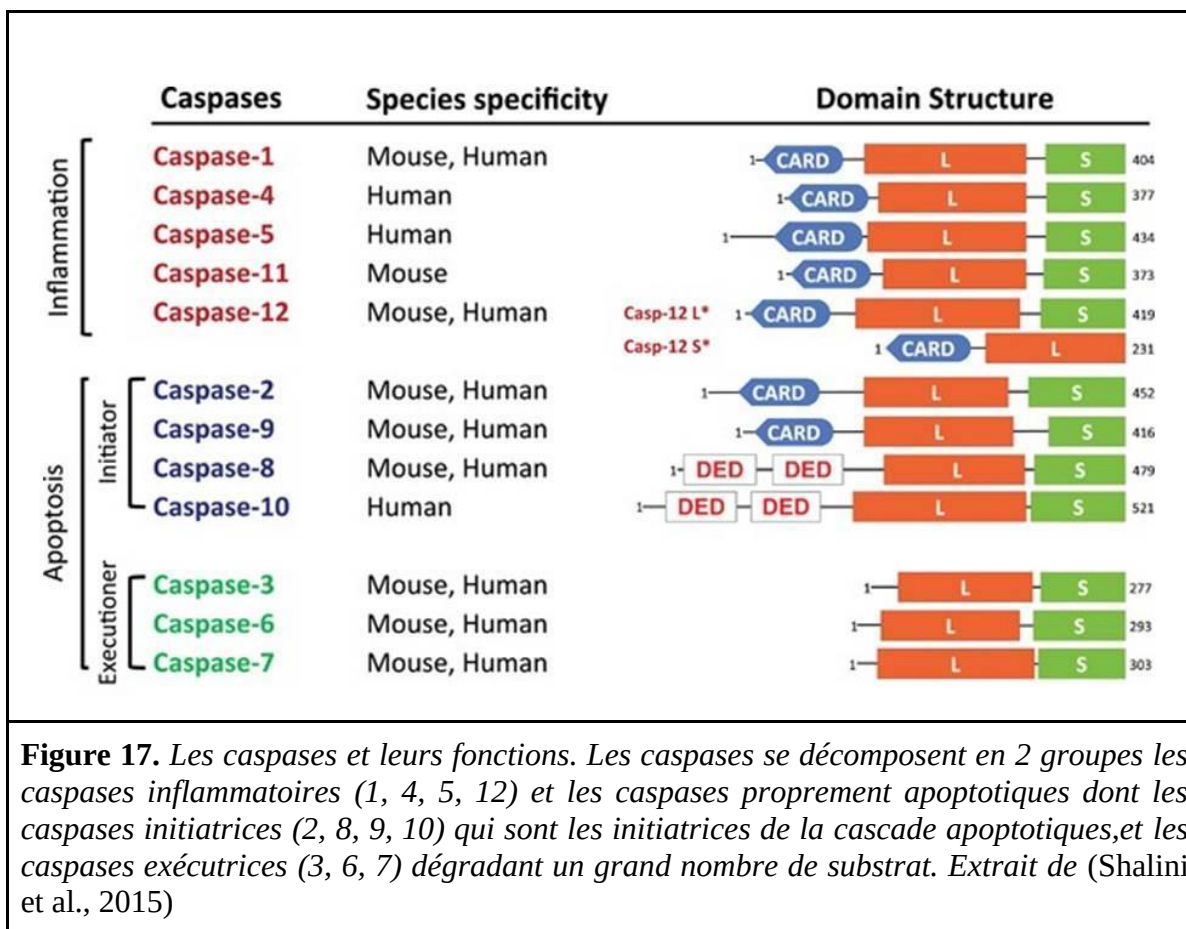
Un défaut d'induction de l'apoptose s'avère souvent tout aussi délétère que l'excès pour le maintien de l'homéostasie. En effet, une mise en place partielle de la mort cellulaire programmée lors du développement embryonnaire, peut conduire à diverses dysfonctions ou anomalies, telles qu'une syndactylie, impliquant la surexpression du facteur de croissance FGF, ou un défaut de production d'acide rétinoïque et d'expression de gènes pro apoptotiques, tels que Bax ou Bak (Al-Qattan, 2019). Lors de la mise place des répertoires lymphocytaires, la différenciation des LB et LT s'accompagne d'une importante élimination de toutes les cellules qui peuvent réagir contre le "soi" et qui sont potentiellement dangereuses pour l'organisme. Un défaut d'apoptose de ces cellules autoréactives est en

cause dans le développement de pathologies auto-immunes (Eguchi, 2001). Un défaut d'apoptose particulièrement délétère concerne quantités de cancers au cours desquels les cellules tumorales perdent leurs capacités d'autodestruction et de réponse à la signalisation de cette injonction. Une prolifération cellulaire anormale est souvent gouvernée par des gènes spécifiques appelés oncogènes dont font partie les gènes codant les facteurs de croissance (FGF, EGF, VEGF) ou leurs récepteurs (FGFR, EGFR, VEGFR). Des mutations dans ces gènes conduisent à une multiplication cellulaire aberrante, tout comme des mutations de gènes suppresseurs de tumeur (p53) qui conduisent à la perte des mécanismes de contrôle de la division cellulaire (Shortt and Johnstone, 2012). Certains pathogènes produisent des protéines capables de moduler voir d'inhiber les voies pro-apoptotiques, comme les papillomavirus humain (HPV) qui induisent la dégradation de p53 et participent ainsi à une prolifération cellulaire incontrôlée (Mesplède et al., 2012).

d) Les caspases piliers de l'apoptose

L'apoptose et l'autodestruction organisée par dégradation méthodique des constituants cellulaires dépend des protéines spécifiques appelées caspases. On dénombre 11 caspases décrites comme liées à l'inflammation et à l'apoptose (Caspase 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12), la caspase 11 n'étant identifiée que chez la souris (Earnshaw et al., 1999). On distingue les caspases impliquées dans l'inflammation (Caspases 1, 4, 5, 12) et celles directement impliquées dans l'apoptose (Caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10). On distingue ensuite 2 groupes dans les caspases proprement apoptotiques. Les caspases initiatrices (2, 8, 9,10), qui répondent à différents stimuli et les caspases exécutrices (3, 6, 7), qui sont les effecteurs de l'apoptose en clivant de très nombreux substrats (**figure 17**). Les caspases ne sont pas

exclusivement liées à la mort cellulaire, mais participent aussi à la différenciation de nombreux tissus (Fernando et al., 2002; Mogi and Togari, 2003).



2. La voie intrinsèque de l'Apoptose

a) Signalisation et activation internes de l'apoptose

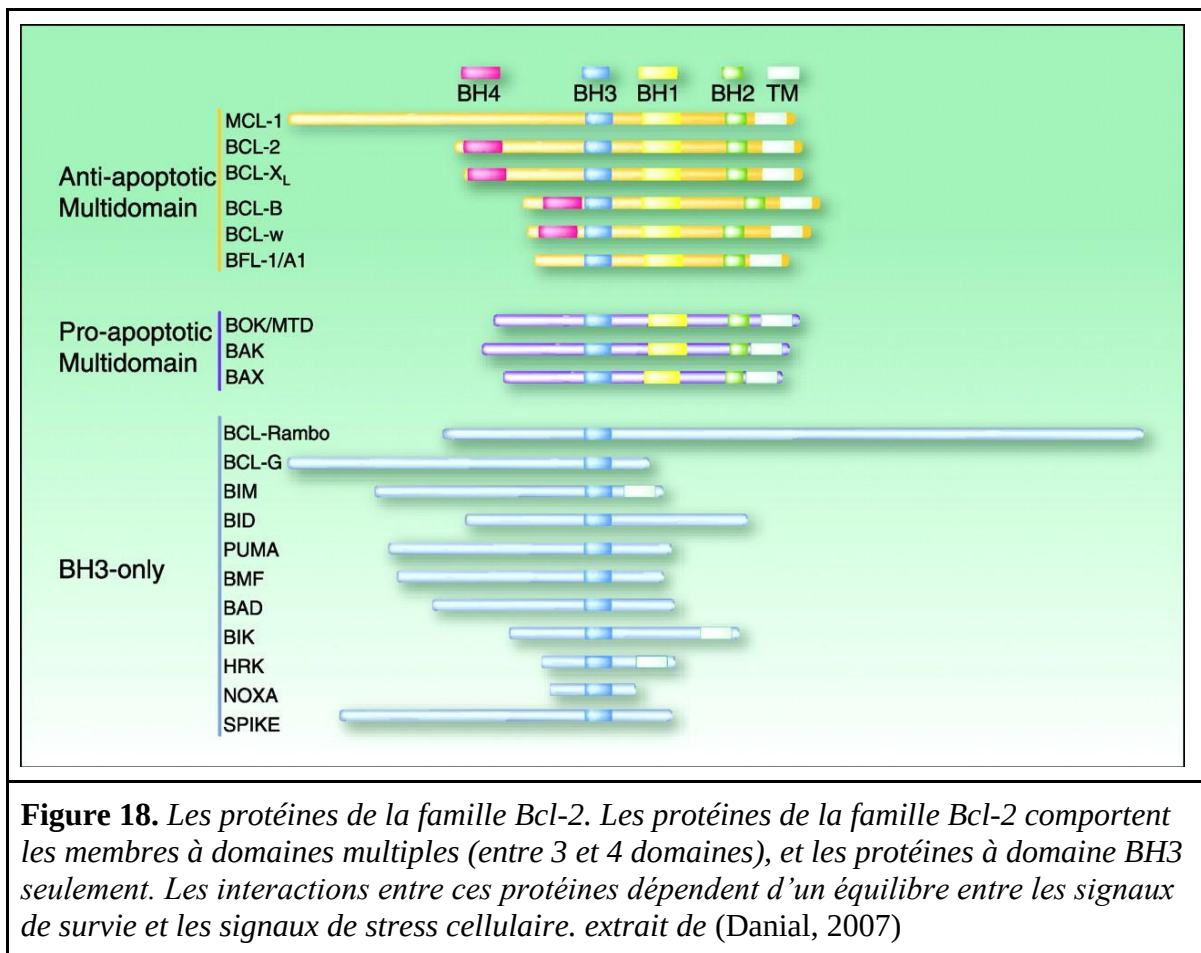
Le destin cellulaire dépend d'une balance finement régulée entre des facteurs protéiques pro-apoptotiques et des facteurs anti-apoptotiques, capables de former ensemble des homo- ou des hétéro-dimères et dont les activités seront décrites dans le prochain paragraphe. L'engagement d'une cellule dans l'apoptose dépend d'une modification de l'équilibre entre

pro et anti-apoptotiques et intervient après une longue phase ‘décisionnelle’ au cours de laquelle le ‘poids’ de chaque facteur a son importance pour faire pencher la balance. L’initiation intrinsèque de l’apoptose est la conséquence de divers stimuli intracellulaires capables d’agir sur l’équilibre entre pro et anti-apoptotiques. Parmi les signaux d’une dysfonction, stress, dommage que la cellule ne saura pas résoudre ou réparer, la conduisant à prendre cette option d’une autodestruction salubre, on retrouve les dommages à l’ADN, le stress oxydant, ou une infection virale. La signalisation intrinsèque, dans le cadre de dommages à l’ADN notamment, peut conduire à une surexpression des gènes des facteurs pro-apoptotiques PUMA et NOXA, suite à l’activation du facteur suppresseur de tumeur p53. La voie intrinsèque de l’apoptose implique les facteurs pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 capables d’agir au niveau de la membrane mitochondriale externe pour en contrôler la perméabilisation. La mitochondrie constitue ainsi l’organe central du déroulement du programme de mort par voie intrinsèque.

b) Les facteurs pro- et anti-apoptotiques, la famille Bcl-2

Parmi les protéines jouant un rôle central dans la mort cellulaire, on trouve les protéines de la famille Bcl-2. Cette famille comporte des protéines pro- et anti-apoptotiques, et partage entre ses différents membres, un ou plusieurs domaines communs, appelés les Bcl-2 Homology domains (BH) (**Figure 18**). Parmi les protéines à multiples domaines, certaines sont anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w. Elles préviennent l’activation de l’apoptose en se liant via leur domaine BH1-3 (qui forme des poches d’interaction hydrophobe) avec les protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak. D’autres protéines pro-apoptotiques de cette famille sont caractérisées par la présence d’un unique domaine

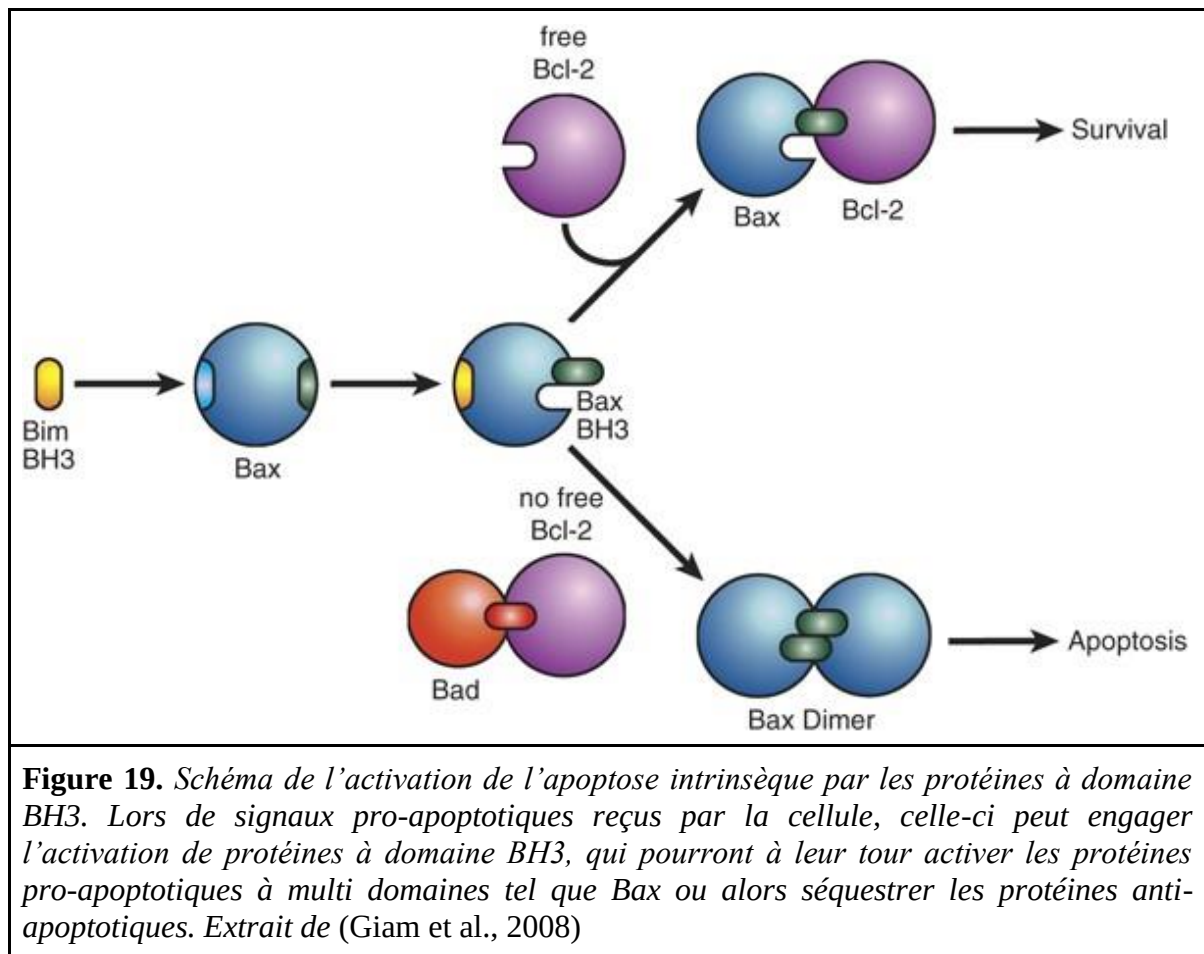
BH3, parmi lesquelles on retrouve Bim, Bid, PUMA, NOXA. Nombre de protéines de la famille possèdent un domaine transmembranaire (TM) permettant leur localisation dans le réseau endomembranaire, en particulier le RE et surtout une localisation à la membrane mitochondriale. Finalement, des interactions complexes, un équilibre finement ajusté et des sensibilisateurs tels que les protéines à domaine BH3 régulent avec précision la phase 'décisionnelle' conduisant à la mort cellulaire par apoptose.



c) Transduction du signal apoptotique dans la voie intrinsèque

La mitochondrie tient un rôle prépondérant dans l'initiation de cette voie avec la perméabilisation de sa membrane externe (MOMP) (Tait and Green, 2013). Les protéines de la famille Bcl-2 sont les acteurs principaux de cette perméabilisation. Parmi ces protéines on retrouve les protéines à domaine BH3 uniquement, véritables activateurs de cette perméabilisation comme Bim et Bid (**figure 19**) (Giam et al., 2008). Ces protéines permettent aux facteurs pro-apoptotiques multi-domaines tels que Bax et Bak d'intégrer la membrane mitochondriale sous forme d'(homo/hétéro)oligomères, mais aussi d'inhiber l'action des protéines anti-apoptotiques comme les protéines Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1 (Gross et al., 1999). Ces dernières sont directement impliquées dans la MOMP, puisque les protéines Bax et Bak vont pouvoir s'homo-hétéro-dimériser, formant ainsi des pores au sein de la membrane externe mitochondriale (Westphal et al., 2011). La perméabilisation de la membrane externe conduit à une sortie du cytochrome-c et diverses molécules de la mitochondrie. Le cytochrome-c cytoplasmique active le 'protein Apoptosis protease activating factor-1' (APAF-1) qui s'oligomériser et s'associe à la procaspase 9 pour former un complexe macromoléculaire appelé apoptosome. L'apoptosome active la caspase-9 qui active à son tour la caspase 3 et engage la cellule dans la phase d'exécution. Cette phase est marquée par l'activité des caspases effectrices qui s'occuperont de dégrader de nombreux substrats tels que la Poly ADP-ribose polymérase (PARP) (Malladi et al., 2009). Des dommages à l'ADN d'origine physico-chimique (UV, agents génotoxiques, espèces réactives de l'oxygène) peuvent conduire à une activation intrinsèque de l'apoptose via p53. L'augmentation quantitative des facteurs pro-apoptotiques Bax, PUMA, NOXA permet une modification de

l'équilibre anti/pro apoptose et favorise la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et l'activation de l'apoptose (Aubrey et al., 2018).



3. Apoptose extrinsèque

a) Récepteurs et signaux apoptotiques externes

La mort cellulaire par apoptose peut provenir d'une signalisation extrinsèque, dans laquelle des récepteurs de mort situés en surface cellulaire, tels que les récepteurs aux TNF (TNFR), les récepteurs Fas (CD95) ou les récepteurs de mort (death receptors (DR)) sont activés par leurs ligands respectif (TNF, FasL, TRAIL). Les récepteurs de morts s'associent sous formes

de trimères avant d'interagir avec leurs ligands respectifs, puis forment souvent des associations de trimères et des clusters membranaires qui favorisent la transduction du signal (Chan et al., 2000; Fu et al., 2016). La transduction du signal de mort suite à la réception d'un ligand de mort conduit à l'activation d'une caspase initiateur qui est la caspase 8 puis à l'activation des caspases exécutrices (Tummers and Green, 2017, p. 8).

b) Transduction du signal apoptotique au cours d'une la voie extrinsèque

Lors de la fixation du ligand (TNF, FasL, TRAIL) sur le récepteur de mort (TNFR, CD95, DR4/5), la transduction du signal se fait via le domaine de mort du récepteur (death domain (DD) qui lie des protéines adaptatrices telles que Fas-associated protein with death domain (FADD) où Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain (TRADD). La liaison de ces protéines adaptatives permet le recrutement et la liaison d'autres facteurs apoptotiques ainsi que de procaspase 8 par le death effector domain (DED) (Park et al., 2007). Cette association génère une plateforme protéique sous membranaire appelée le Death induced signaling complex (DISC). A partir de ce complexe DISC, un recrutement de la protéine RIP1 peut favoriser la survie cellulaire via l'activation du facteur de transcription NF kB, ou conduire à la nécrose. La caspase 8 activée par le DISC limite cette voie de survie en dégradant RIP1 (Lin et al., 1999). Une fois le prodomaine clivé, la caspase 8 peut activer à son tour directement la caspase 3, conduisant à une mort rapide de la cellule. La caspase 8 activée peut aussi activer une protéine à domaine BH3 seulement, le facteur BH3 interacting-domain death agonist (Bid). La protéine Bid clivée par la caspase 8 ou tBid (pour truncated Bid), permettra aux protéines pro-apoptotiques, telles que Bax ou Bak de perméabiliser la

membrane externe mitochondriale, mais titrera aussi les protéines Bcl-2 like pour limiter leur action anti-apoptotique, par exemple pour Bcl-2, Bcl-xL et MCL-1 (Billen et al., 2008).

4. Apoptose induite par le stress du réticulum

a) Apoptose induite par la voie PERK-ATF4-CHOP

La voie PERK de l'UPR mise en place lors du stress du RE, conduit dans un premier temps à une limitation de la synthèse protéique en inhibant la traduction via la phosphorylation de eIF2 α . Cet état phosphorylé de eIF2 α permet au contraire de favoriser la traduction de quelques gènes soumis à un contrôle très particulier. Ainsi l'ARN messager du facteur de transcription ATF4 possède un micro cadre ouvert de lecture (microORF) chevauchant du cadre principal en 5' (Somers et al., 2013). Sa traduction a pour effet d'inhiber celle de ATF4, sauf en condition de stress. Les quantités de eIF2 α phosphorylées lors d'une UPR conduisent à un bypass de la microORF et à l'expression de ATF4. Le facteur de transcription rejoint ainsi le noyau et active la transcription, entre autres des gènes relatifs à l'autophagie, mais aussi de certains régulateurs négatifs comme GADD34. Ce dernier, associé à la Protein Phosphatase 1 (PP1a), déphosphoryle eIF2 α pour restaurer la traduction protéique, notamment de gènes pro-apoptotiques (Brush et al., 2003). L'activité transcriptionnelle de ATF4 va aussi permettre d'exprimer un gène central dans le contrôle de la mort cellulaire, le facteur de transcription CHOP/GADD153. CHOP tout comme ATF4 possède une séquence régulatrice uORF, qui permet sa traduction spécifiquement lorsque eIF2 α est phosphorylé (Palam et al., 2011). CHOP va ainsi pouvoir à son tour activer l'expression de plusieurs gènes, dont des acteurs pro-apoptotiques, tels que Bim ou Trb3, qui seront exprimés grâce à la restauration de la traduction médiée par GADD34. Il a été montré

que CHOP inhibe l'expression de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2 mais le mécanisme n'est pas totalement identifié (McCullough et al., 2001, p. 153). Un stress du RE mal résolu ou persistant conduisent donc à une perte d'équilibre dans la balance des facteurs pro et anti-apoptotiques, favorisant la mort cellulaire.

b) Apoptose induite par la voie IRE1

Une autre voie de l'UPR met en jeu IRE1 qui possède un domaine à activité enzymatique dans le cytoplasme et un domaine de liaison à la protéine chaperonne GRP78/BiP dans la lumière du RE. La dissociation de GRP78 de IRE1, en situation de stress, permet la dimérisation du récepteur, la phosphorylation des domaines enzymatiques (kinases) et l'activation de la fonction RNase. Cette fonction RNase est à l'origine de l'épissage non conventionnel 'alternatif' de l'ARNm codant pour le facteur de transcription XBP1. Elle aboutit à une version plus courte du polypeptide, appelée XBP1s. XBP1s est un facteur de transcription impliqué dans "l'endoplasmic reticulum associated protein degradation" (ERAD). L'ERAD permet d'ajuster la quantité de protéines en en dégradant une partie, via le protéasome. Cette branche qui permet de 'soulager' le RE de sa charge en protéines, associe l'activation d'IRE1 à une voie cytoprotectrice plutôt que apoptotique. Néanmoins lors d'un stress du réticulum persistant, des études ont montré que XBP1s induit lui aussi une augmentation de l'expression de CHOP suivie d'une entrée en apoptose. L'activité kinase de IRE1 conduit parallèlement à la phosphorylation de la c-Jun N-terminal Kinase (JNK) qui en activant le facteur de transcription c-Jun active l'expression des gènes pro apoptotiques.

c) Apoptose induite par la modification des flux de calcium dans le réticulum endoplasmique

La concentration et surtout le flux d'ions calcium entre les différents organites, notamment entre le réticulum endoplasmique (réserve de calcium libre Ca^{2+}) et la mitochondrie participent aux activités physiologiques fondamentales d'une cellule. Lors d'un stress du RE, on peut observer une fuite du calcium intra réticulaire vers le cytoplasme, et une accumulation de ce Ca^{2+} au sein de la mitochondrie. La fuite de Ca^{2+} depuis le RE est notamment médiée par l'inositol-1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) un canal calcique permettant la mobilisation intracellulaire de l'ion Ca^{2+} depuis les citernes où il est stocké. Dans la mitochondrie, le canal voltage dépendant VDAC (voltage dependant anion channel) permet les flux de Ca^{2+} . Une accumulation trop importante de Ca^{2+} au sein de la mitochondrie est promotrice de la perméabilisation membranaire de la mitochondrie et de la mort cellulaire par apoptose (Pinton et al., 2008). Un changement de la concentration calcique dans le cytoplasme conduit aussi à l'activation de la calpaïne (protéase calcium dépendante) qui à son tour active la caspase 12 et l'apoptose. Hormis son rôle important dans l'inhibition de la formation des pores membranaires dans la membrane mitochondriale, Bcl-2 permet aussi un contrôle de l'activité de l'IP3R en régulant son ouverture (Rong et al., 2008), limitant les niveaux de Ca^{2+} cytosolique et mitochondriale et *in fine* de l'apoptose.

Toutes ces voies mettent en évidence la nécessité pour les cellules de pouvoir détecter et analyser des signaux ou des situations les mettant en danger afin d'induire, si nécessaire, le processus de leur autodestruction (**figure 20**).

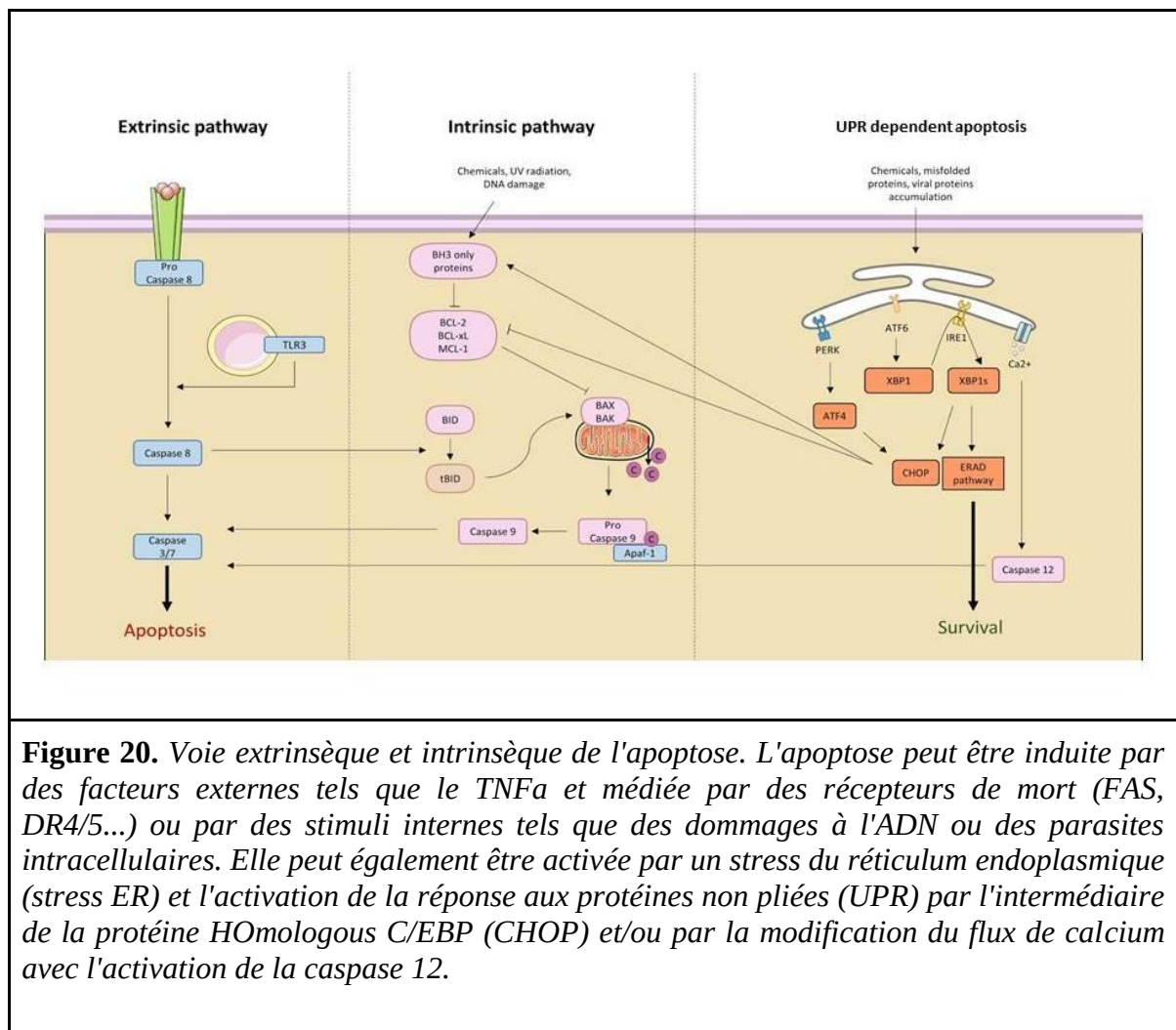


Figure 20. Voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. L'apoptose peut être induite par des facteurs externes tels que le TNF α et médiée par des récepteurs de mort (FAS, DR4/5...) ou par des stimuli internes tels que des dommages à l'ADN ou des parasites intracellulaires. Elle peut également être activée par un stress du réticulum endoplasmique (stress ER) et l'activation de la réponse aux protéines non pliées (UPR) par l'intermédiaire de la protéine HOmologous C/EBP (CHOP) et/ou par la modification du flux de calcium avec l'activation de la caspase 12.

5. Protéines régulatrices de l'apoptose

a) Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs)

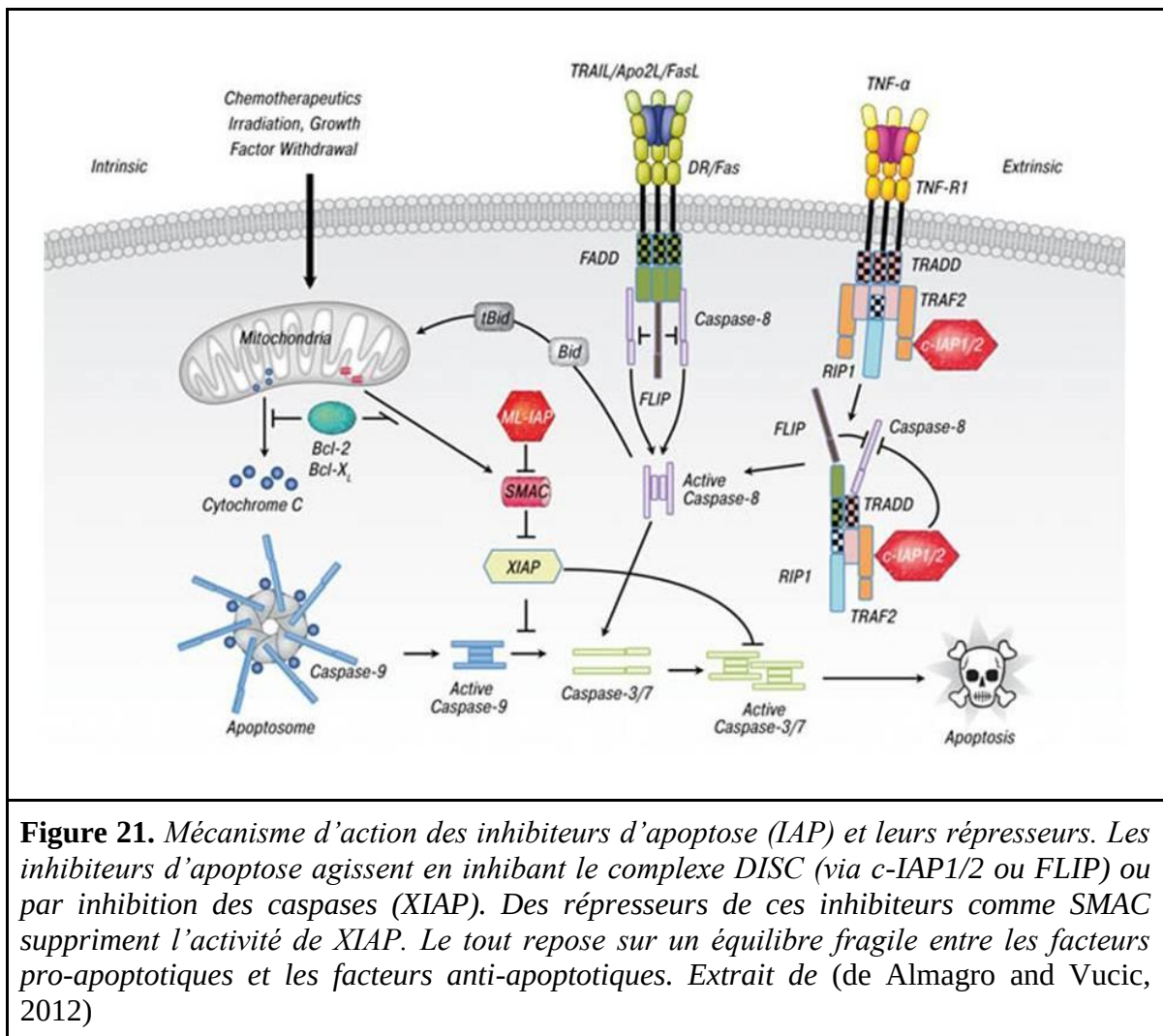
L'apoptose est une réponse physiologique qui permet, quand la situation l'exige, de mettre fin à l'activité d'une cellule. Cette réponse se met en place de manière séquentielle et elle est orchestrée par divers acteurs moléculaires, avec des points de contrôle et des protéines régulatrices permettant dans certaines conditions de retarder ou arrêter le processus avant l'entrée en phase d'exécution. Des protéines telles que les Inhibitory Apoptosis Proteins

(IAPs) notamment c-IAP1/2, XIAP, et SURVIVIN régulent directement l'activation de l'apoptose en inhibant les caspases. Certaines d'entre elles possèdent des domaines CARD de liaison aux caspases, expliquant leur effet inhibiteur par interaction directe. D'autres protéines de la famille des IAPs ne possèdent pas ce domaine de liaison aux caspases mais possèdent des domaines appelés Baculovirus IAP repeat domain (BIR). Le domaine BIR3 de XIAP conduit par exemple à l'inhibition de la caspase 9, en se liant à son site catalytique, alors que son domaine BIR2 inhibe les caspases 3 et 7. D'autres médiateurs modulent ou inhibent l'apoptose comme cFLIP (cellular FLICE Inhibitory Protein) qui empêche la formation du complexe DISC. En effet, possédant les mêmes domaines DED que la caspase 8, cFLIP entre en compétition avec la pro-caspase 8 et il interfère avec la formation du complexe pro-apoptotique. Néanmoins cFLIP possédant plusieurs isoformes, il est décrit que cette protéine peut aussi conduire à la nécrose via RIP1 (Tsuchiya et al., 2015)

b) Les protéines répresseurs de protéines IAPs

Confirmant l'existence d'un jeu complexe de séquestrations mutuelles et de multiples interactions entre facteurs pro et anti-apoptotiques se neutralisant en situation normale mais pouvant à tout moment faire basculer le destin cellulaire, des protéines inhibitrices de protéines inhibitrices de l'apoptose ont été identifiées. Parmi ces protéines on retrouve les protéines Smac/Diablo. Ces protéines sont localisées dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Une activation de l'apoptose par voie mitochondriale aboutit à leur libération en même temps que le cytochrome c et permet de lever l'inhibition exercée par les IAPs sur les caspases, par liaison aux domaines BIR (**figure 21**) (Du et al., 2000). Omi/HtrA2 est un

autre répresseur qui neutralise l'activité anti caspase des IAPs en les clivant directement (Yang et al., 2003).



6. Autres types de mort cellulaire

a) Nécrose et nécroptose

Si la mort par apoptose est qualifiée de mort propre, prévue et rapidement gérée par les cellules phagocytaires, certaines circonstances comme des dommages physiques, la rupture de la membrane plasmique, ou une inhibition de la mort par apoptose, peuvent conduire à

d'autres modes de mort cellulaire comme la nécrose. Une cellule peut en définitive mourir de bien des manières. La mort cellulaire nécrotique est souvent décrite comme violente et accidentelle. Elle se caractérise alors par une perte non contrôlée du contenu cellulaire et une dégradation irrégulière de l'ADN. Ce mode de mort cellulaire est souvent associé à une réponse pro-inflammatoire, car le contenu cytoplasmique de la cellule mourante active les PRRs des cellules immunitaires. La nécrose qui peut intervenir brutalement peut tout de même être contrôlée et activée biochimiquement. Le facteur central de cette initiation moléculaire est la receptor interacting kinase 1 RIP1 (ou RIPK1) et RIP3 (ou RIPK3). RIP1 est clivée par la caspase 8 active lors de l'apoptose afin d'inhiber la nécrose, mais si la caspase 8 n'est pas activée par les récepteurs de mort, une nécrose contrôlée, appelée aussi nécroptose, est mise en place. La rupture de la membrane cellulaire est médiée par des oligomères de Mixed lineage kinase domain-like (MLKL) qui sont activés via RIP3. La membrane est aussi fragilisée par des chaînes d'acides gras saturés à plus de 20 carbones synthétisées par l'enzyme Elongation of very long chain fatty acids protein 7 (ELOVL7) (Parisi et al., 2019; Samson et al., 2020).

b) Pyroptose

Une autre voie de mort cellulaire est la mort cellulaire induite par l'inflammation. La pyroptose, traduisible par 'mort par le feu' est un type de mort cellulaire programmée lié à l'apoptose, impliquant notamment la caspase de l'inflammation, la Caspase 1. Lors de la mise en place de la pyroptose, on observe la formation d'un complexe particulier appelé inflammasome. Cet inflammasome est constitué la protéine NLRP3 ou NALP3, de la protéine adaptatrice ASC et de la Caspase 1 activée. La reconnaissance de divers signaux de

dangers exogènes (ARN viraux, agrégats de protéines, lipopolysaccharides (LPS) bactérien) conduit à l'expression de NLRP3 et à la formation de l'inflammasome. Cet inflammasome permet la maturation de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1b et IL-18, mais aussi de la gasdermin D directement impliquée dans la rupture de la membrane cellulaire (X. Liu et al., 2016). Cette voie de mort cellulaire a surtout été décrite en réponse à des pathogènes bactériens intracellulaires, notamment en réponse aux LPS, mais aussi en réponse à la détection des pathogènes viraux. Ainsi, la littérature rapporte ce mode de mort cellulaire pour un modèle de cellules neuronales infectées par ZIKV (He et al., 2020), avec une capacité de ZIKV à cliver directement la gasdermine D (Yamaoka et al., 2021).

c) Paraptose et mort par autophagie

Une forme encore différente de mort cellulaire est quelquefois répertoriée dans la littérature, c'est la paraptose. Cette mort cellulaire possède un profil phénotypique intermédiaire entre l'apoptose et la nécrose. Tout comme l'apoptose, il semble que la paraptose soit dépendante de l'expression de gènes et contrôlée par des voies de signalisation particulières, notamment par la famille des 'mitogen activated protein kinases' (MAPK) (Sperandio et al., 2004). Néanmoins, de nombreuses caractéristiques de l'apoptose sont absentes de la paraptose, principalement l'activation des caspases. Physiologiquement, cette mort cellulaire se traduit par une vacuolisation massive de la cellule, qui peut faire penser à une activation aberrante de l'autophagie et aboutissant à une perte de l'intégrité cellulaire. La mort cellulaire peut souvent accompagner l'autophagie, ce qui rend complexe la qualification de mort cellulaire par autophagie. Néanmoins, l'inhibition de l'autophagie n'abroge pas l'hyper vacuolisation et la mort cellulaire par paraptose. Ce genre d'effet cytopathique a également été décrit dans

certaines modèles cellulaires d'infection par ZIKV (Legros et al., 2020; Monel et al., 2017). Cette paraptose semble intervenir lorsqu'une réponse apoptotique classique ne peut pas être activée lors de l'infection.

7. Apoptose viro-induite chez le vecteur

Les insectes vecteurs d'arboviroses, dont font partie les moustiques, ne développent généralement pas de pathologie particulière et sont souvent infectés à vie. Néanmoins plusieurs études montrent des changements comportementaux des moustiques lorsqu'ils sont infectés, avec une régulation de certains neurotransmetteurs comme la sérotonine (Yang et al., 2019), ou une modification des aires de déplacements pouvant favoriser les risques de transmission (Tallon et al., 2020). Cette tolérance à l'infection s'explique partiellement par la coévolution de ces pathogènes et de leurs vecteurs. On sait que les moustiques ont la capacité de produire des ARNs interférents à partir de séquences intégrées à leur génome. Celles-ci sont principalement dues à la présence d'éléments de virus à ARN non rétroviraux (NIRVS) qui limitent la réplication virale (Houé et al., 2019; Palatini et al., 2017). Dans les cellules de moustiques, les infections par arbovirus ne provoquent que rarement des effets cytopathiques et l'apoptose massive de cellules. Chez les *Aedes*, la cascade d'activation de l'apoptose repose sur l'activation d'antagonistes des protéines inhibitrices (AeIAP1). Contrairement aux IAPs des mammifères qui sont modulatrices de l'apoptose, les IAPs des invertébrés sont indispensables pour la signalisation apoptotique et surtout dans le développement. Chez les invertébrés, l'induction de l'apoptose repose ainsi exclusivement sur l'expression de suppresseurs des IAPs (Vasudevan and Ryoo, 2015). Cet antagonisme permet ensuite l'activation d'AeDronc, une protéine homologue de la Caspase 9. AeDronc

finir ensuite par activer la Caspase 16. Concernant l'activation extrinsèque, il existe un complexe homologue du complexe DISC humain, composé des protéines IMD, AeFADD et AeDredd (Liu and Clem, 2011; Ocampo et al., 2013). Le peu de données actuellement disponibles qui évaluent le rôle de l'apoptose dans la compétence vectorielle, semble indiquer que l'apoptose nuirait à la multiplication du virus. Ainsi, virus et vecteur semblent avoir évolué au cours de leurs interactions pour limiter l'apoptose (Clem, 2016). Des études menées sur un virus Sindbis (SINV) génétiquement modifié pour exprimer un gène pro-apoptotique (*reaper*), ont montré que les virus modifiés avec le gène *reaper* conduisent à une réplication et une dissémination moins importante chez le moustique (O'Neill et al., 2015). Dans les modèles cellulaires d'invertébrés, infectés *in vitro* par ZIKV, on observe très peu, voir aucun effet cytopathique, même si l'activation de caspase est observée, la fragmentation nucléaire et l'apoptose sont plus rares (Offerdahl et al., 2017). Un frein maîtrisé de l'apoptose conduit sûrement à une dissémination et une transmission plus efficace de ZIKV chez le vecteur (Slonchak et al., 2020b). Il a notamment été montré que l'infection par ZIKV conduit à une reprogrammation du métabolisme cellulaire qui finit par conduire à l'apoptose dans un modèle de cellules humaines, mais conduit, à l'inverse, à la survie des cellules de moustique (Thaker et al., 2019). Récemment, une équipe a mis en évidence la mise en place rapide de foyers de cellules apoptotiques au sein des intestins de moustiques lors de l'infection par les flavivirus de la dengue ou du Zika. Cette apoptose lorsqu'elle est inhibée conduit à une production virale et un taux d'infection significativement supérieur chez le vecteur *Aedes Aegypti* (**figure 22**) (Ayers et al., 2021).

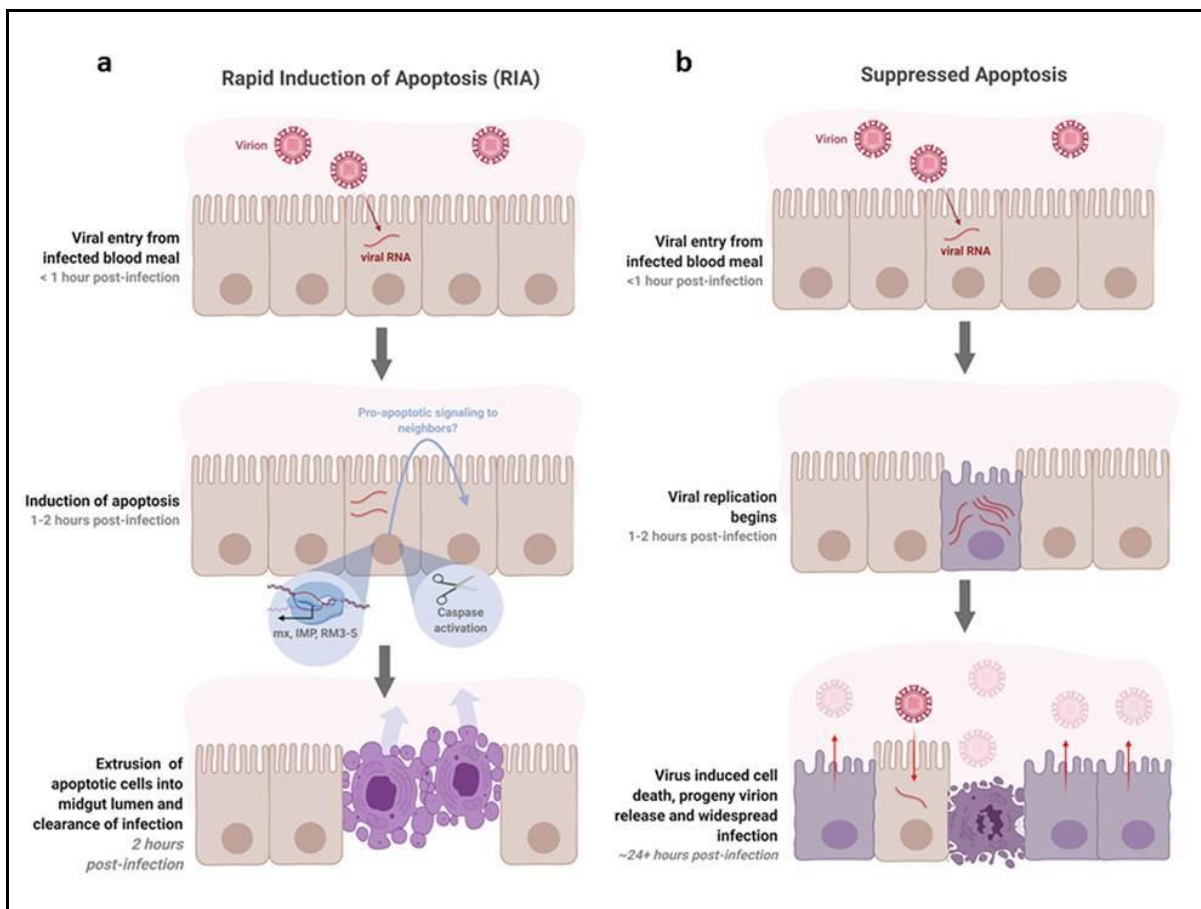


Figure 22. Mécanisme antiviral des foyers apoptotiques dans les épithéliums de moustique. a) La rapidité d'induction de l'apoptose dans l'épithélium des estomacs de moustique permet une élimination rapide du pathogène. Ainsi des foyers de cellules entreraient en apoptose, ces cellules seraient infectées mais aussi tuées par effet 'bystander', en réponse à des signaux pro-apoptotique de cellules voisines. b) l'installation de l'infection dans des moustiques n'ayant pas pu mettre en place ce genre d'apoptose précoce conduirait à une progénie virale plus importante. Extrait de (Ayers et al., 2021)

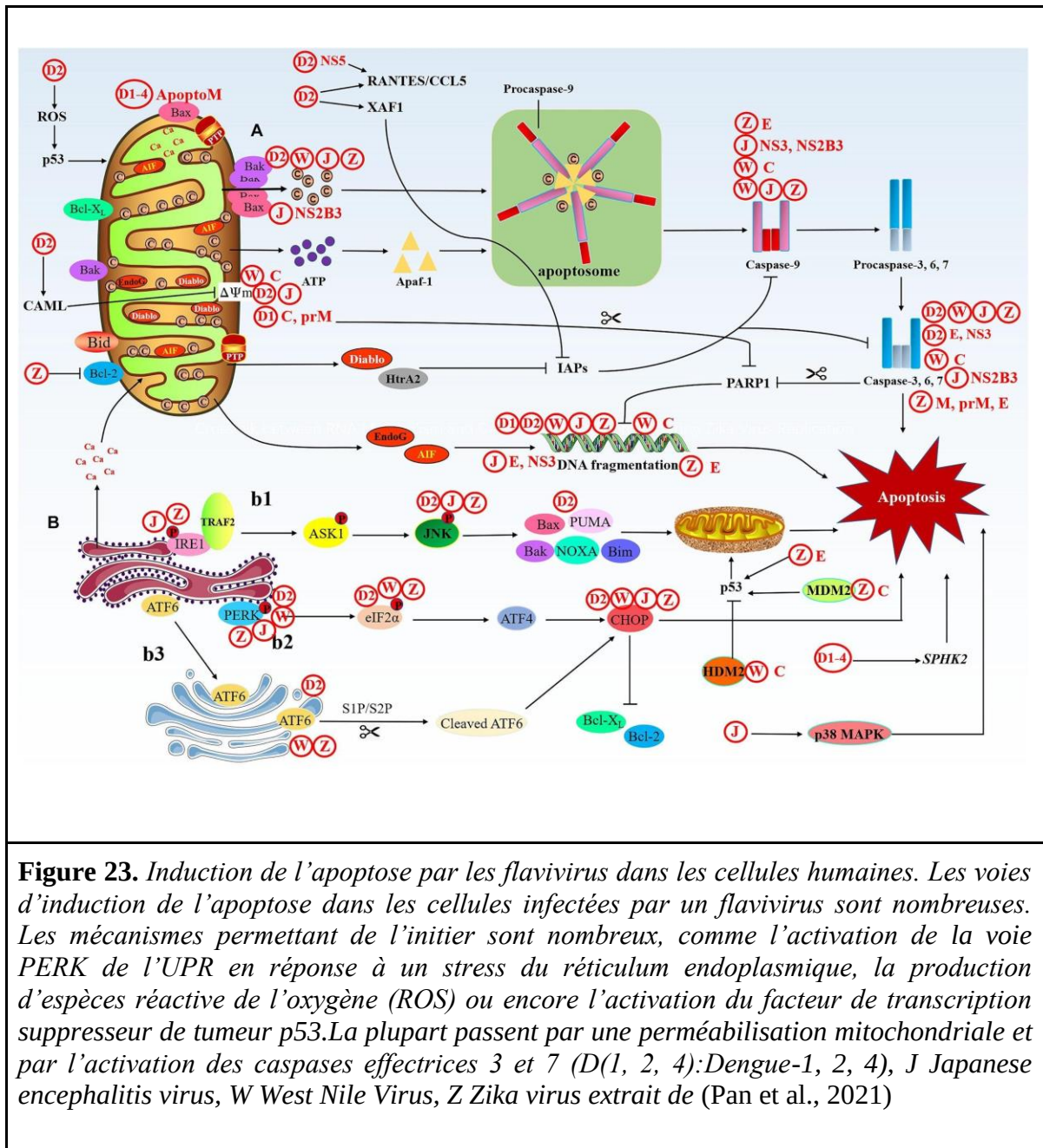
8. Apoptose viro-induite chez l'Hôte humain et manipulations par les virus

Lorsqu'on suit l'infection de cellules de mammifères par les flavivirus *in vitro*, on observe que celle-ci s'accompagne d'effets cytopathiques dus à une apoptose viro-induite dans les cellules qui répliquent le virus. Ces effets cytopathiques dépendent de la multiplicité d'infection utilisée (MOI) et de la durée de l'infection. Comme détaillé plus haut, l'apoptose est une des réponses de défense cellulaire parmi les plus 'primitives', en réaction à l'intrusion d'un agent infectieux. Une apoptose qui est une véritable implosion avec dégradation méthodique des constituants cellulaires est évidemment dommageable pour le virus puisqu'elle met fin à toute production de nouveaux virions. Un délai dans l'apoptose est donc un gain précieux pour le virus dans sa course à une production efficace et infectieuse d'une progénie. En co-évoluant avec leurs hôtes, les virus ont adapté leur comportement pour contourner ou utiliser cette réponse à leur avantage. Dans la littérature, les exemples de virus manipulant l'apoptose ne manquent pas. La manipulation est de plusieurs ordres. Soit elle vise à inhiber et retarder cette mort cellulaire qui pourrait nuire à la multiplication virale, soit elle la met à profit pour favoriser la dissémination ou le contrôle des réponses antivirales. Les exemples les plus connus de stratégies virales d'inhibition de l'apoptose sont observées avec l'Epstein Barr Virus (EBV) et le Vaccinia Virus (VV) dont les génomes codent pour des protéines capables d'imiter, par homologie de séquence, les protéines anti-apoptotiques humaines (Polster et al., 2004). Un phénomène bien connu d'utilisation de l'apoptose par les virus est la mise à profit de l'exposition de phosphatidylsérines/PtdSer en surface de la particule virale. Cela s'appelle le mimétisme de l'apoptose. Cet 'apoptotic mimicry' cher à Mercer et Helenius (Mercer and Helenius, 2008) est partagé par beaucoup de virus qui incorporent les PtdSer dans leur enveloppe

membranaire, se ‘déguisant’ ainsi en ‘produits dérivés’ d’une apoptose physiologique pour davantage passer inaperçus et atténuer les réponses pro-inflammatoires (Amara and Mercer, 2015). Ce mécanisme est poussé à l’extrême lorsque les corps apoptotiques de cellules infectées, chargés de particules virales, servent de ‘cheval de Troie’ pour infecter différents tissus. C’est ce qui a été observé avec CHIKV qui diversifie son tropisme et infecte les cellules phagocytaires de manière non phlogistique, à la faveur de la phagocytose des corps apoptotiques de cellules infectées. Les blebs et corps apoptotiques semblent servir au virus de moyens pour atteindre et se faire internaliser par des cellules non permissives autrement. Dans le cas de CHIKV, il a été montré qu’une inhibition de l’apoptose, ou de la phagocytose ou un masquage des signaux ‘eat-me’, à savoir les PtdSer exposées sur les corps apoptotiques, par de l’annexine V, supprimait l’infection et nuisait au virus (Krejbich-Trotot et al., 2011a). Ce phénomène explique aussi l’affinité de nombreux virus enveloppés, dont les flavivirus, pour les récepteurs de la PtdSer, et notamment les récepteurs de la famille des TIM et TAM, mais aussi pour le facteur de liaison aux récepteurs TAM, GAS6. (Meertens et al., 2012; Moller-Tank and Maury, 2014). Les virus ont donc évolué en profitant de l’apoptose et en y trouvant un moyen d’enrichir leur membrane en PtdSer, pour ceux, en particulier, qui bourgeonnent à partir de la membrane plasmique.

L’apoptose viro-induite est la conséquence également logique d’un effet de la multiplication virale sur le métabolisme cellulaire car pour assurer son cycle de multiplication, le virus spolie la cellule de ses ressources pour son propre profit. Ce braquage des ressources cellulaires a été décrit comme à même de perturber l’homéostasie mitochondriale et de conduire à la mort de la cellule (El-Bacha et al., 2007; Jordan and Randall, 2016; Thaker et

al., 2019). Outre la reprogrammation métabolique, l'infection par *Flavivirus* semble conduire, de diverses façons, une réponse apoptotique (**figure 23**).



Le virus DENV2 est capable d'induire l'apoptose via l'expression de XIAP associated factor 1 (XAF1), un gène dépendant de la réponse à l'interféron et qui inhibe l'activité anti-caspase de la protéine XIAP (Long et al., 2013). Le WNV semble induire l'apoptose via une augmentation de la transcription du facteur pro-apoptotique Bax (Parquet et al., 2001).

Le JEV semble activer la mort cellulaire via le stress du réticulum et l'expression du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (Wang et al., 2019). Toutes ces voies de mort viro-induites ne sont pas réellement le résultat d'une activation directe par le virus, mais plutôt la conséquence d'une rupture dans l'équilibre entre facteurs pro et anti-apoptotiques en association avec les stress engendrés par la multiplication virale au sein de la cellule.

II. Problématique et contexte de recherche:

La littérature sur les interactions entre les flavivirus pathogènes et l'homme décrit quasiment depuis toujours la mort cellulaire par apoptose comme induite directement par les virus en liant de ce fait, la mortalité cellulaire à la pathogénèse. Si effectivement, *in vitro*, les cellules 'finissent par mourir' suite à une infection par ZIKV et que la collecte d'une progénie virale s'effectue dès l'apparition des effets cytopathiques dans une culture cellulaire, aucun travail antérieur à ma thèse n'avait évalué le rôle primordial antiviral que l'apoptose exerce sur ZIKV et les stratégies que le virus met en place pour en limiter les effets.

Dans un premier temps, les objectifs de mes travaux de thèse étaient de caractériser la mort cellulaire apoptotique dans le cas de l'infection par ZIKV afin de comprendre les raisons de l'émergence des souches épidémiques. Nous souhaitions de plus évaluer si la mort cellulaire viro-induite était impliquée dans la pathogénicité spécifique de ces souches par rapport aux souches historiques africaines.

Les premiers résultats obtenus par le laboratoire dans le but de caractériser l'infection *in vitro* de cellules épithéliales 'modèles', les A549, avec l'isolat clinique de Polynésie (isolé en 2013) avaient révélé que la mort cellulaire induite par ZIKV était relativement tardive et intervenait près de 48h après infection, alors que la production de la progénie virale atteignait un plateau vers 40h post infection (Frumence et al., 2016).

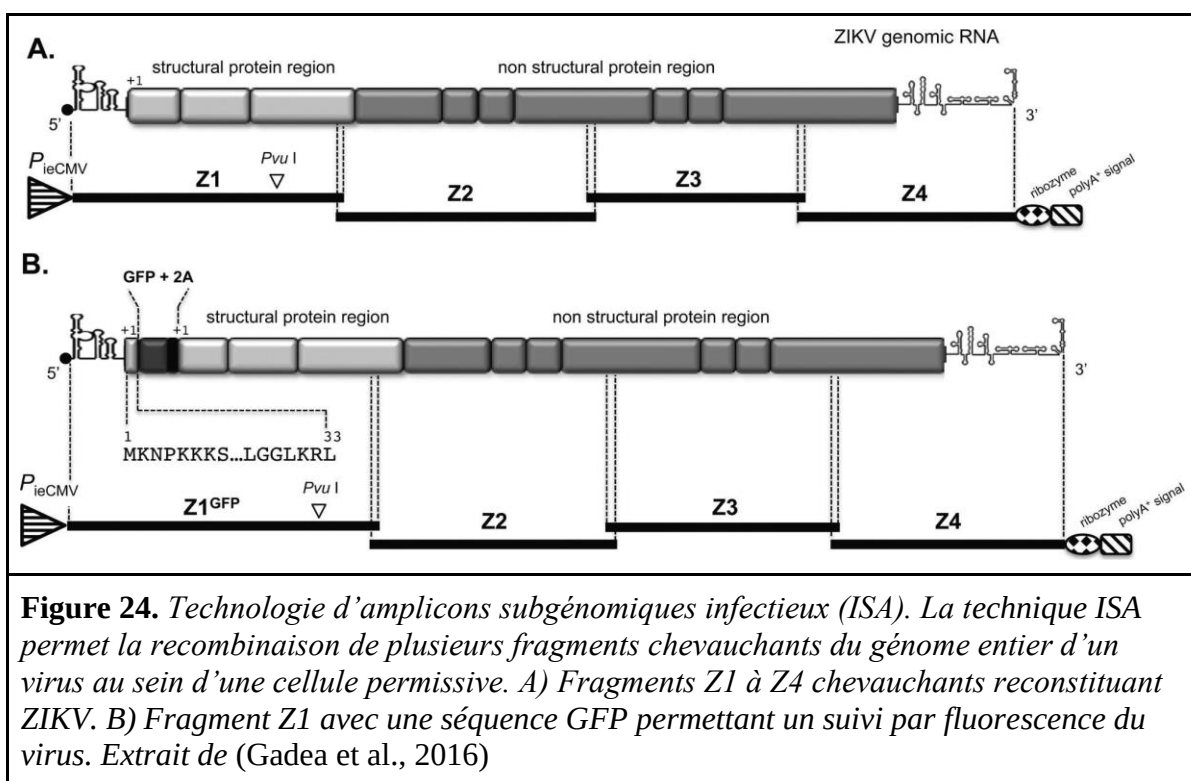
Cette observation m'avait conduit à émettre des hypothèses pour expliquer une mortalité cellulaire tardive, en particulier lorsqu'on la compare aux cinétiques cytopathiques obtenues sur les mêmes cellules avec des alphavirus comme le virus du chikungunya (CHIKV) ou

celui du Ross River (RRV). Une hypothèse était que ZIKV puisse exercer un contrôle précoce de l'apoptose pour en limiter les effets potentiellement antiviraux. Pour vérifier cette théorie, j'ai eu l'idée d'ajouter aux cellules infectées un inducteur 'exogène' de mort pour observer le comportement des cellules et l'effet produit sur le virus. Pour comprendre la mécanistique associée à l'effet 'inhibiteur' exercé par ZIKV, j'ai examiné les voies de mort cellulaire et leurs facteurs associés et plus précisément l'impact des protéines anti-apoptotiques dans le contrôle de cette réponse. J'ai recherché si une voie classique de stress menant à l'apoptose au cours des infections virales pouvait également faire l'objet d'un contrôle par ZIKV et expliquer le retard pris par la mort viro-induite. La suite de mes travaux de thèse s'est donc focalisée sur la réponse UPR au stress du RE lors de l'infection, puis sur le rôle de cette réponse UPR dans la convergence des signaux conduisant à la mort cellulaire par apoptose.

III. Résultats

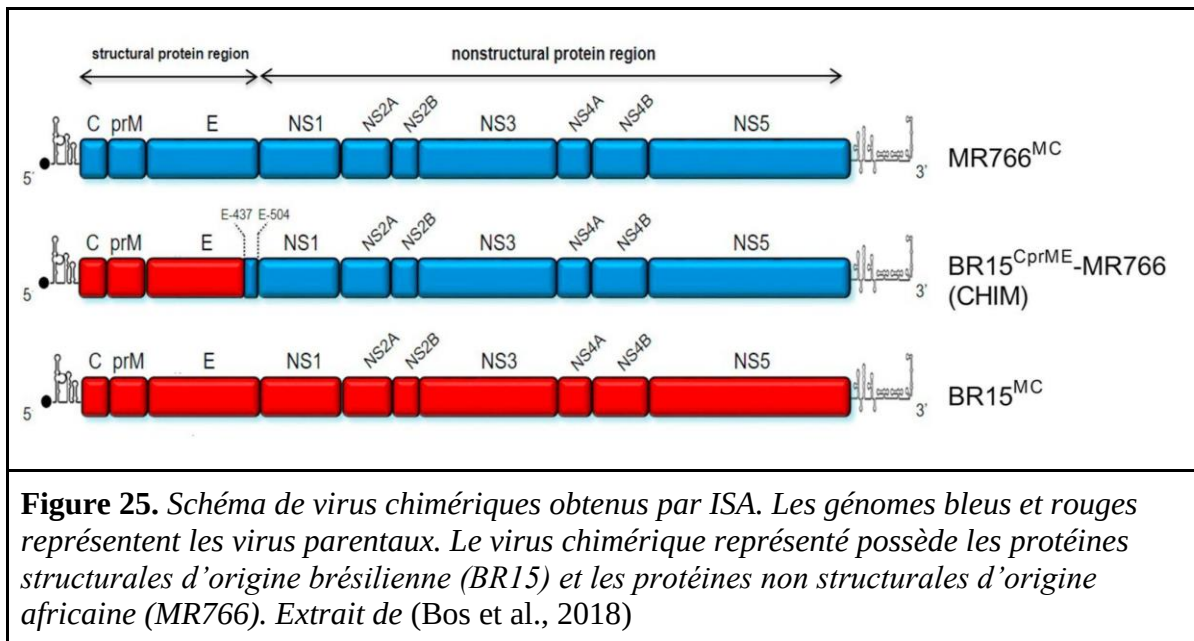
Dans un premier temps, il a fallu mettre au point le modèle d'étude *in vitro* de l'infection par ZIKV et de ses effets cytopathiques. Nous avons choisi la lignée de cellules A549 qui constitue un modèle de cellules épithéliales très permissives à ZIKV.

Pour comparer les infections en fonction des souches virales, nous nous sommes orientés vers la construction de clones moléculaires “synthétiques”, à partir des données disponibles sur les séquences nucléotidiques du virus historique ougandais isolé en 1947 (MR766) et celles du virus épidémique contemporain circulant au Brésil en 2015 (BeH819015). Les clones moléculaires des différents virus ont été construits grâce à la technique ISA (infectious subgenomic amplicon) (Atieh et al., 2016; Gadea et al., 2016). Cette technique consiste à introduire, par transfection des cellules, différents fragments d'ADN obtenus par PCR et couvrant le génome viral (**figure 24A**). La transcription de ces fragments partiellement chevauchants permet la reconstitution *in cellulo* des ARNs génomiques viraux et donne naissance à une progénie infectieuse. La technique ISA nous a permis de disposer également d'un virus recombinant exprimant la GFP (**figure 24B**).



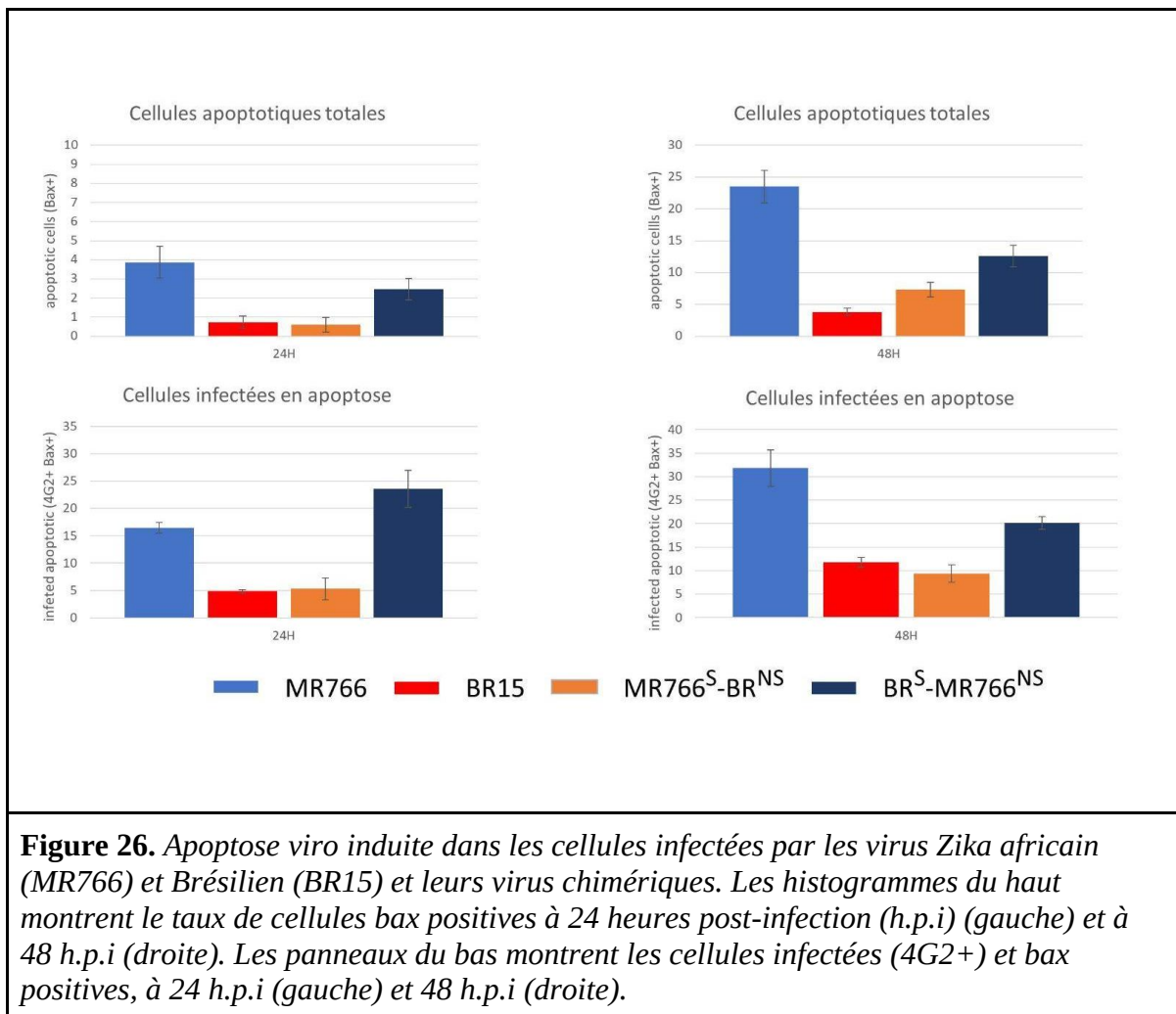
Cette technologie nous a aussi permis de créer des virus chimères, au sein desquels on peut interchanger des régions génomiques entre souches virales, en mixant les régions structurales et non structurales provenant des souches africaines ou brésiliennes (**Figure 25**). Ma participation à l'obtention de ces outils moléculaires indispensables à l'étude des interactions entre ZIKV et ses hôtes m'a permis d'être co-auteur en 2018 de la publication jointe en annexe (*The Structural Proteins of Epidemic and Historical Strains of Zika Virus Differ in Their Ability to Initiate Viral Infection in Human Host Cells*, *Virology* 516 (2018): 265-73). Nous avons en parallèle utilisé un isolat clinique de ZIKV provenant de Polynésie Française et isolé du sérum d'un patient en 2013 (PF13, H/PF/2013 (genbank access : KJ776791.2)). Ce virus 'épidémique', de souche asiatique présentait l'avantage d'apporter des conditions d'infection avec 'quasi espèces virales' et de les comparer pour validation au 'modèle' de

virus à faible diversité génomique, issu d'un clone moléculaire synthétique. Même si je n'ai pas moi-même isolé cette souche, j'ai eu la chance de participer à l'isolement d'une souche de DENV-2 circulant à l'île de La Réunion en 2019 (*The epidemic of Dengue virus type-2 Cosmopolitan genotype on Reunion Island relates to its active circulation in the Southwestern Indian Ocean neighboring islands*, Heliyon (2019)- 5, no 4).



Le suivi des infections menées *in vitro* avec la chimère BR15^S-MR766^{NS} et avec les virus parentaux a révélé que les protéines structurales sont déterminantes pour la capacité infectieuse de ZIKV. Les protéines structurales d'origine brésilienne semblent diminuer la capacité du virus à entrer dans les cellules cibles en raison d'une efficacité d'adhésion bien inférieure à celle de la souche africaine. La comparaison des infections produites par les chimères et celles des virus parentaux, m'ont également permis de mettre en évidence une nette différence de cinétique d'apoptose des cellules infectées par les différents virus. J'ai

ainsi noté une induction plus tardive de la mort cellulaire dans les cellules infectées par des virus ayant la région non structurale d'origine brésilienne (**figure 26**).



Ces observations ont suggéré que ZIKV devait contrôler l'entrée en apoptose des cellules infectées et que les souches historiques africaines et épidémiques brésiliennes présentaient des différences dans les aspects qualitatifs et quantitatifs des effets cytopathiques qu'elles induisent. Elles m'ont de plus indiqué que la mise en place d'un délai ou une inhibition de

l'apoptose intervenait en lien avec un facteur ou plusieurs facteurs viraux associés à la région non structurale du génome viral.

A. Une apoptose contrôlée par le virus Zika (Article 1)

Comme beaucoup de virus, ZIKV doit composer avec énormément de réponses antivirales. Si les mécanismes des réponses antivirales de l'immunité innée sont largement documentés et notamment les interactions entre ZIKV et la réponse interféron (Barnard et al., 2017; Grant et al., 2016; S. Lin et al., 2019; Ma et al., 2018), les mécanismes moléculaires de l'interaction entre ZIKV et sa cellule hôte conduisant à l'apoptose restaient peu décrits. Comme rappelé dans le paragraphe B.8 de l'Introduction, l'apoptose est une réponse mise en place par la cellule hôte afin de court-circuiter la propagation virale et ainsi préserver les cellules du tissu alentour du risque infectieux, tout en recrutant des cellules immunitaires qui pourront oeuvrer pour une réponse immune adaptée (Gregory and Devitt, 2004; Jorgensen et al., 2017; Okamoto et al., 2017; Thomson, 2001).

Au cours des cinq dernières années, diverses études ont évalué les effets cytopathiques du ZIKV. Ainsi, d'autres équipes ont observé que ZIKV induit une apoptose *in vitro*, au moins pour la souche épidémique, et surtout dans les modèles de cellules neuroprogénitrices. Une capacité de ZIKV à interférer avec l'entrée en apoptose a été remarquée et associée à sa capacité d'agir sur le cycle cellulaire, impliquant souvent les protéines structurales virales, telles que prM ou la protéine E. Ces protéines virales induiraient des anomalies mitotiques et un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M et S, potentiellement via une réduction de la phosphorylation de CDK1 et une réduction de la cycline B1 (Souza et al., 2016; Liu et al., 2018; Kesari et al., 2020). La capacité d'interférence de ZIKV avec le cycle et/ou la

différenciation cellulaire a été proposée pour expliquer en partie les complications neurologiques associées à l'infection par ZIKV (Ghouzzi et al., 2016; Li et al., 2016; Tang et al., 2016).

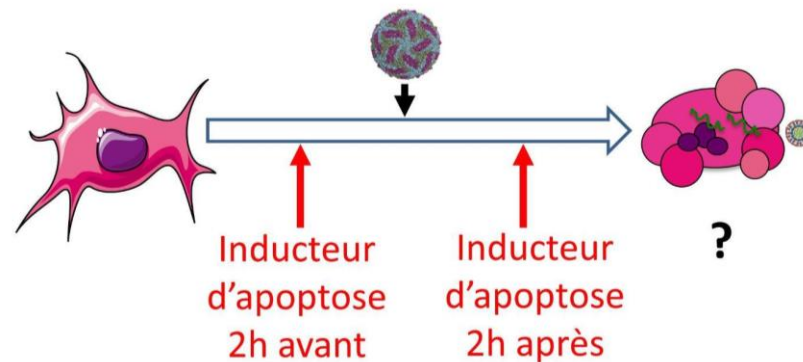
La plupart de ces études présentent des résultats qui concordent avec les nôtres. Leurs auteurs observent une apoptose *in vitro*, environ 48h ou 72h dans les modèles de tapis cellulaires, et entre 3 et 5 jours dans les modèles neuronaux plus complexes tels que les neurosphères ou les organoïdes dont la taille est réduite lors d'une infection par ZIKV (Cugola et al., 2016; Qian et al., 2016; Dang et al., 2016; Xu et al., 2016; Watanabe et al., 2017; Gabriel et al., 2017). Ces travaux concluent au rôle qu'aurait l'apoptose sur les cellules progénitrices neuronales pour expliquer les microcéphalies, mais n'abordent pas l'effet de cette mort cellulaire sur le virus.

Mon travail a donc consisté à évaluer la cinétique d'induction de l'apoptose par ZIKV, puis de déterminer si le délai observé de la mortalité cellulaire dans mon modèle de cellule épithéliale était le résultat d'un équilibre neutre entre effet cytopathique de ZIKV et réponse de la cellule hôte, où si ZIKV avait acquis la capacité de retarder cette réponse cellulaire.

1. ZIKV retarde l'apoptose et les déterminants viraux responsables de l'inhibition sont portés par la région "Non Structurale" du génome viral.

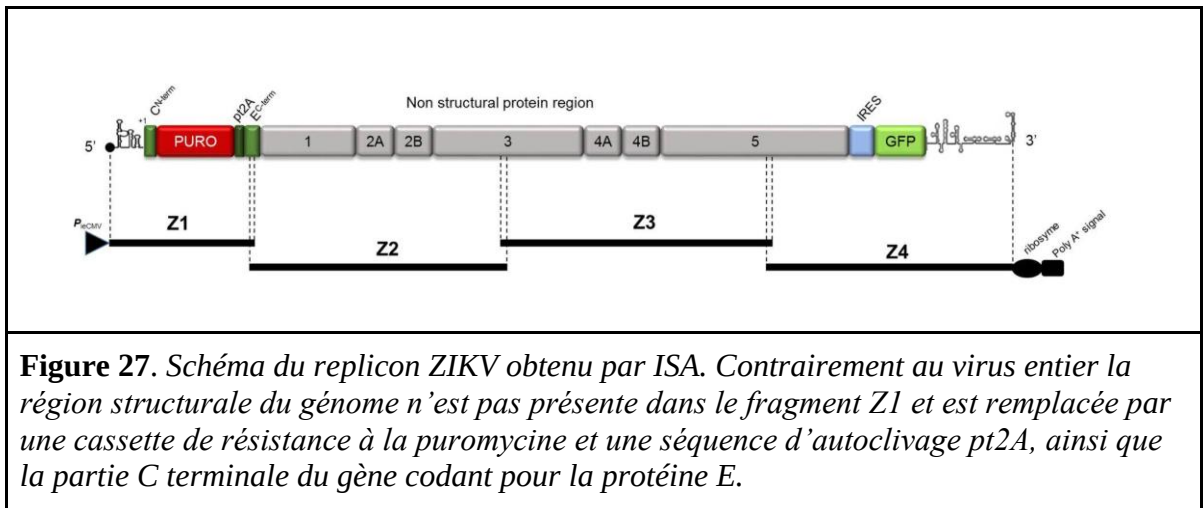
L'étude de la cinétique d'infection comparée à la cinétique de mort cellulaire a confirmé que les premiers signes d'une apoptose viro-induite, de nature intrinsèque mitochondriale (associée à la relocalisation du facteur pro-apoptotique Bax aux mitochondries) corrélait avec le plateau de production maximale de la progénie virale, à partir de 48h.

Pour évaluer le potentiel contrôle de l'apoptose par ZIKV, nous avons cherché à induire une apoptose exogène dans les cellules infectées en utilisant des inducteurs de nature extrinsèque (TNF α) ou intrinsèque (étoposide/blastocidine). Nous avons ajouté ces inducteurs au virus en pré ou post-traitement (2H avant ou 2H après l'infection).



Nous avons pu observer que ZIKV inhibe l'induction d'une apoptose exogène dans les cellules infectées. Il n'est en revanche pas capable d'interférer avec l'apoptose si on ajoute aux cellules l'inoculum viral 2h après l'inducteur de mort.

Pour identifier quels déterminants viraux pouvaient être impliqués dans ce mécanisme de protection vis à vis de l'apoptose, nous avons utilisé des cellules exprimant des réplicons de ZIKV. Ces réplicons sont des molécules d'ARN constituées uniquement de la partie non-structurale du génome viral et des séquences non traduites. Ces ARNs se maintiennent dans les cellules en exprimant leur machinerie autonome de réplication mais l'absence de la partie codant les protéines structurales empêche toute initiation de nouvelles infections (**figure 27**).

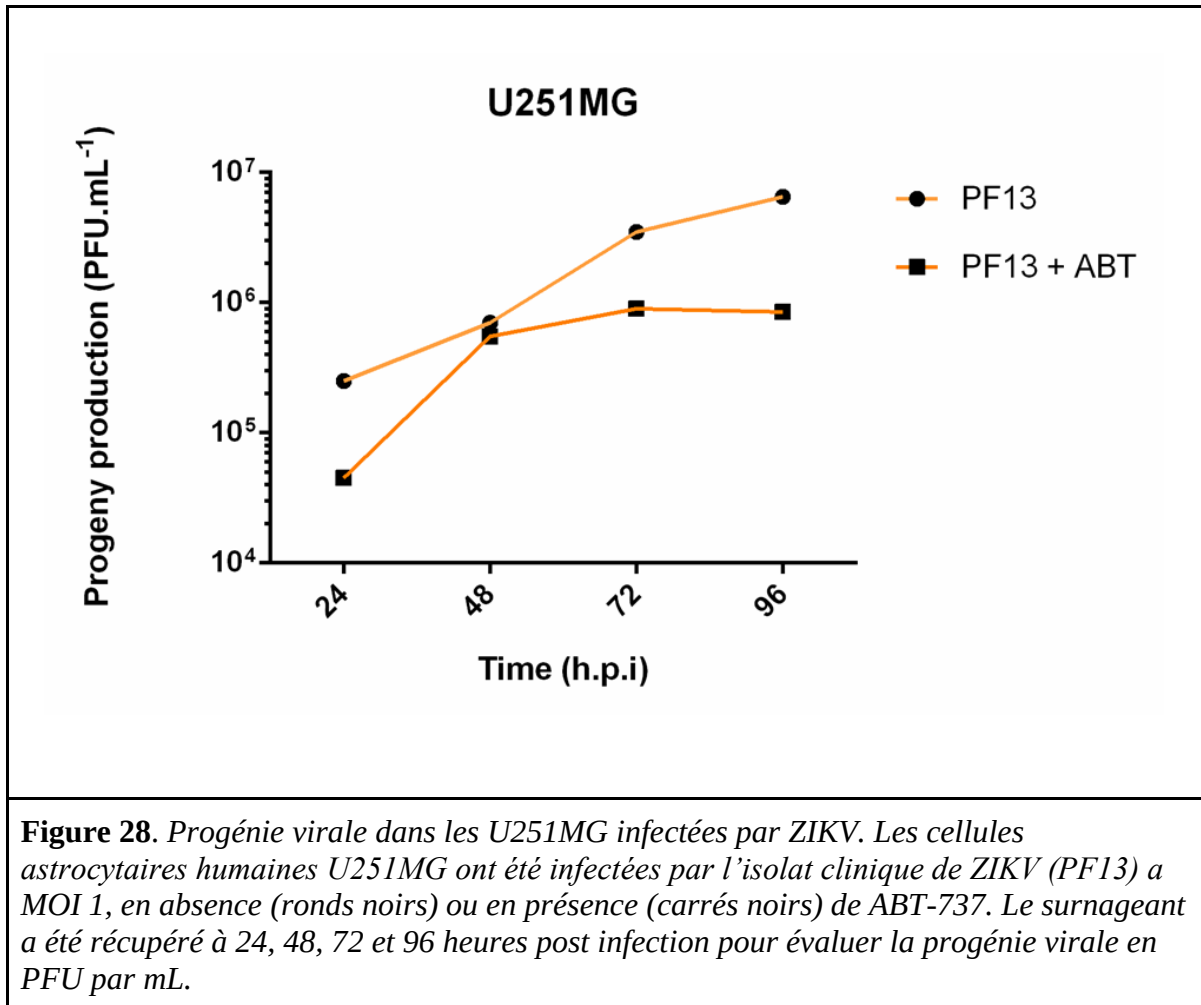


Les données obtenues montrent que la région non structurale de ZIKV suffit à initier cette cytoprotection. Les réplicons correspondant au virus africain ont montré une capacité à inhiber l'induction de l'apoptose similaire à celle des réplicons avec les séquences du virus brésilien.

2. ZIKV retarde l'apoptose en agissant sur la protéine anti-apoptotique Bcl-2

Nous avons formulé l'hypothèse que le retard d'apoptose provoqué par ZIKV pouvait être dû à un maintien d'un effet dominant des facteurs anti-apoptotiques dans les cellules infectées. Nous avons alors utilisé un inhibiteur de Bcl-2/BclX-L qui est l'ABT-737. Ajouté à l'inducteur de mort, lors de l'infection par ZIKV, l'ABT-737 neutralise la cytoprotection qui était conférée par ZIKV, démontrant l'importance des protéines anti apoptotiques de la famille Bcl-2 dans le mécanisme de retard d'apoptose. Nous avons de plus pu constater que le niveau de la protéine Bcl-2 était effectivement maintenu pendant l'infection, même en présence d'un inducteur de mort additionnel.

En complément des différentes données obtenues, l'utilisation de l'ABT 737 a confirmé que l'apoptose était dommageable au virus car la levée de la protection a conduit à des titres viraux moins importants (**figure 28**).



Article

The ZIKA Virus Delays Cell Death Through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins

Jonathan Turpin, Etienne Frumence, Philippe Desprès , Wildriss Viranaicken *  and Pascale Krejbich-Trotot *

PIMIT, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme CYROI, 97490 Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France; jonathan.turpin@univ-reunion.fr (J.T.); etiennefrum@gmail.com (E.F.); philippe.despres@univ-reunion.fr (P.D.)

* Correspondence: wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr (W.V.); pascale.krebich@univ-reunion.fr (P.K-T.); Tel.: +33-262938829 (W.V.)

Received: 16 September 2019; Accepted: 26 October 2019; Published: 29 October 2019



Abstract: Zika virus (ZIKV) is an emerging human mosquito-transmitted pathogen of global concern, known to be associated with complications such as congenital defects and neurological disorders in adults. ZIKV infection is associated with induction of cell death. However, previous studies suggest that the virally induced apoptosis occurs at a slower rate compared to the course of viral production. In this present study, we investigated the capacity of ZIKV to delay host cell apoptosis. We provide evidence that ZIKV has the ability to interfere with apoptosis whether it is intrinsically or extrinsically induced. In cells expressing viral replicon-type constructions, we show that this control is achieved through replication. Finally, our work highlights an important role for anti-apoptotic Bcl-2 family protein in the ability of ZIKV to control apoptotic pathways, avoiding premature cell death and thereby promoting virus replication in the host-cell.

Keywords: Zika virus; apoptosis; viral replication; Bcl-2 protein family

1. Introduction

Zika virus (ZIKV), which is a flavivirus belonging to the Flaviviridae family, like Dengue virus (DENV), yellow fever virus (YFV) or West Nile virus (WNV), has become a major medical problem worldwide. The human disease known as Zika fever is characterized by mild flu-like symptoms including fever, maculopapular rash, headache and sometimes conjunctivitis, arthralgia and myalgia. Symptoms usually subside within a week [1]. However, during the latest outbreaks, serious pathological features of the disease have been reported. Complications such as microcephaly in newborns or Guillain-Barré syndrome (GBS) in adults were documented during the French Polynesia outbreak in 2013 and in Brazil in 2015 [2,3]. ZIKV is an arbovirus, mainly transmitted to humans through the bite of a mosquito vector from *Aedes* species [4]. Due to an increasingly global distribution of *Aedes*, ZIKV emergence is a threat in many areas that are no longer necessarily located in intertropical areas [5]. The ZIKV particle is composed of a single strand RNA molecule of about 11 kb, inside a nucleocapsid, surrounded by a host-derived membrane that contains two virus encoded proteins (E and M). Phylogenetic analysis of viral sequences has identified two main virus lineages, African and Asian [6], the latter being the main cause of large current epidemics with millions of cases of infection, in particular those that recently affected Brazil and the Americas [7]. Once ZIKV has entered the human body, it targets many types of cells such as epithelial cells, in order to replicate and produce a viral progeny. The life cycle of ZIKV, like other flaviviruses, leads to the release of its single-strand positive sense genomic RNA in the cell cytoplasm where it is translated into a single polypeptide, which is then cleaved by host and viral proteases into three structural proteins (C, prM/M and E),

and seven nonstructural proteins (NS; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) [8]. The viral cycle continues with the replication process and the production and maturation of envelope proteins, encapsidation, budding and release of virions by exocytosis.

As with many other viruses, interactions between ZIKV and its host trigger a variety of host responses in the body's attempt to resolve the infection [9]. Among these responses, apoptosis plays an important role as a host defense mechanism [10]. Apoptosis can quickly remove intracellular niches of viral replication and thus bypass the virus as it multiplies and spreads. As a result, many viruses have developed strategies to evade, delay or divert the cell death responses, often to their advantage [11]. One example is the case of chikungunya virus (CHIKV), an arbovirus of the alphavirus family, which takes advantage of massive apoptosis to hide in disseminating blebs and thus optimizes its spread [12]. Typically, alphaviruses such as CHIKV (but also Sindbis virus, Ross River virus and Semliki Virus) replicate extremely quickly and the infected cells are characterized by rapid and concomitant apoptosis [13]. Unlike alphaviruses, flaviviruses replication is relatively slow. For several of them such as DENV, Japanese encephalitis virus (JEV) and WNV, apoptosis has been shown to be inhibited during the early stages of the viral cycle [14]. The role of viral proteins in the control of apoptosis has been extensively studied, with many observations in support of both pro-apoptotic activity and antiapoptotic effects. For WNV, a nuclear localization of the capsid was shown to induce a caspase-9-dependent apoptosis [15]. Whereas the WNV capsid protein was shown to suppress the activation of caspases 3 and 8 via Akt through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism (PI3K) [16]. Concerning ZIKV, in cellulo models have shown that infection can lead to cytopathic effects that are typical of apoptosis, and in previous work we observed late-onset apoptosis 48 h after infection of A549 cells with ZIKV isolate PF13 [17]. In some other cell types (human fetal astrocytes), moderate apoptosis can occur even later and possibly contribute to persistent infection [18]. In the particular case of Zika pathology, homeostasis disorder; involving a lack of apoptosis control, a persistent inflammatory response and even viral persistence in the brain has been reported to explain the microcephaly observed in infected newborns [19].

In this study we examined the time course of cellular death associated with ZIKV infection. We confirm that, in A549 cells infected with the epidemic strain from Asian lineage (BeH819015, BR15^{MC}), apoptosis is quantitatively moderate and occurs late, after the maximum production of viral progeny. We investigated whether this delay was due to a protective effect of the virus itself. When intrinsic or extrinsic apoptosis was induced within 2 h after infection, we could observe a significant decrease in cell death. As this protection was also obtained in cells expressing ZIKV "replicons", we deduced that viral replication was efficient at inhibiting apoptosis. ABT-737, an inhibitor of the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, abrogates the protective effects provided by ZIKV. This implies that, with a subversion mechanism that remains to be elucidated, ZIKV is able to maintain an anti-apoptotic status in infected cells while it completes its viral cycle.

2. Materials and Methods

2.1. Viruses, Cell Lines, Antibodies and Reagents

The clinical isolate PF-25013-18 (PF13) and the molecular clones of ZIKV (BR15^{MC} and MR766^{MC}) have been previously described [20,21]. Vero cells (ATCC, CCL-81) and HEK 293T (CRL-3216) were cultured at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere in MEM medium (PAN Biotech, Aidenbach, Germany), supplemented with 5% or 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAN Biotech, Aidenbach, Germany). A549-DualTM cells (InvivoGen, Toulouse, France, a549d-nfis) designated hereafter as A549 cells were maintained in MEM medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS. A549 cells were maintained in growth medium supplemented with 10 µg.mL⁻¹ blasticidin and 100 µg.mL⁻¹ zeocin (InvivoGen, Toulouse, France).

To detect the ZIKV envelope E protein (ZIKV-E), we used the mouse anti-pan flavivirus envelope E protein mAb 4G2 produced by RD Biotech or the rabbit anti-ZIKV-E-DIII that was kindly provided

by Dr. Valerie Choumet (Institut Pasteur). The rabbit anti-BAX (#2772) and anti-active caspase 3 (#9664) antibodies and the mouse anti-cytc 6H2.B4 (#12963) were purchased from Cell Signalling Technology (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France). The mouse anti-BAX clone 2D2 was from Invitrogen (ThermoFisher, Les Ulis, France). The anti-mitochondria antibody MTC02-3298 was from Abcam (Cambridge, UK). Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 594 IgG antibodies were from Invitrogen (ThermoFisher, Les Ulis, France). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (ab97051) and anti-mouse (ab6789) antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK).

All reagents were from Sigma Aldrich (Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France) except when indicated. ABT-737 (ab141336) was purchased from Abcam (Cambridge, UK).

2.2. Plaque Forming Assay

Viral titers were determined by a standard plaque-forming assay as previously described with minor modifications [17]. Briefly, Vero cells grown in 48-well culture plates were infected with tenfold dilutions of virus samples for 2 h at 37 °C and then incubated with 0.8% carboxymethylcellulose (CMC) for 4 days. The cells were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. Viral titers were expressed as plaque-forming units per mL (PFU.mL⁻¹).

2.3. Western Blotting (WB)

Cell lysates were performed in Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer). All subsequent steps of immunoblotting followed previous descriptions [22,23]. Primary antibodies were used at 1:1000 dilutions. Anti-rabbit immunoglobulin-horseradish peroxidase and anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugates were used as secondary antibody (dilution 1:2000). Blots were revealed with enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagents using an Amersham Imager 680 (GE, Buc, France).

2.4. Induction of Apoptosis

Apoptosis inducers were added 2 h post-infection (hpi) or 2 h before infection (hbi) for ZIKV infected cells. For the replicons, cells were treated 24 h after transfection or passage of stable cells.

For extrinsic apoptosis, cells were treated 2 hpi or 2 hbi with TNF α (10 ng.mL⁻¹) and cycloheximide (10 μ g.mL⁻¹) (TNF α /CHX). The addition of cycloheximide prevents the activation of NF κ B and the inhibition of apoptosis [24]. Drugs were added as indicated in the figure legends, before quantification of cell death.

For intrinsic apoptosis, etoposide at 10 μ M or blasticidin at 5 μ g.mL⁻¹ (InvivoGen, Toulouse, France) were added 16 h to 18 h as indicated in the legends. Alternatively, cells were treated with a dose of 400 mJ of UV (Uvitec, Cambridge, UK) and collected for death measurements 16 h after treatment.

For inhibition of the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, ABT-737 (1 μ M) was added at the same time as TNF/CHX and the cells were treated as above. Previous experiments were set-up to show that ABT-737 alone under these conditions did not induce cell death (Figure 8B).

2.5. Immunofluorescence Assay

A549 and HEK cells grown, infected and treated on glass coverslips were fixed with 3.7% formaldehyde at room temperature for 10 min. Fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 4 min. Coverslips were incubated with primary antibodies (1:1000 dilution) in 1% PBS BSA. Antigen staining was visualized with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000, Invitrogen). Nucleus morphology was revealed by DAPI staining. The coverslips were mounted with VECTASHIELD® (Clinisciences, Nanterre, France) and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope. Images were captured and processed using a Hamamatsu ORCA2 ER camera and the imaging software NIS-Element AR (Nikon, Tokyo, Japan). From the immunofluorescence imaging, percentage of ZIKV-E-positive cells with a stained active mitochondrial

BAX or cytosolic cytochrome-c or cleaved caspase 3 was estimated after counting a minimum of six microscopic fields i.e., about 1000 cells examined for each condition.

2.6. Cytotoxicity Assay

Necrotic cell damage was evaluated measuring lactate dehydrogenase (LDH) release resulting from a plasma membrane rupture. The supernatant of infected cells was recovered and subjected to a cytotoxicity assay, performed using the CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega, Madison, USA) according to manufacturer's instructions. Absorbance of converted dye was measured at 490 nm using a microplate reader (Tecan, Grödig, Austria).

2.7. Cell Viability Assay (MTT)

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) at 5 mg/mL⁻¹ was added on A549 cells cultured in 96-well plate at a density of 5000 cells per well. Following 1 h incubation, MTT medium was removed and the insoluble formazan was solubilized with 100 µL of DMSO. Absorbance of converted dye was measured at 570 nm with a background subtraction at 690 nm.

2.8. Caspase-3/7 Activity

Cells were cultured in 96-well plate at a density of 5×10^3 cells per well. Caspase 3/7 activity in crude cell lysates was measured using the Caspase Glo® 3/7 Assay Kit (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's protocols. Caspase activity was quantified by luminescence using a FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany).

2.9. Generation of ZIKV Replicon by the ISA Method

The production of HEK 293T expressing a stable ZIKV RNA replicon with GFP as a reporter protein, named Rep ZIKV-GFP in the study, was based on the sequence of ZIKV strain MR766 Uganda 47-NIID (Genbank access # LC002520) and the ISA (infectious subgenomic amplicons) method as described previously [25]. As a negative control, HEK 293T cells were transfected with pSilencer-puro 2.6 (Ambion, Thermofisher, Les Ulis, France) and pEGFP-C1 (Clontech, Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France) plasmids with a ratio of 1 to 10 using lipofectamine 3000 according to supplier's instructions (Thermofisher, Les Ulis, France) and selected for 5 days in puromycin at 1 µg/mL⁻¹.

The production of A549 cells transiently expressing a ZIKV RNA replicon was based on the ISA method and four amplicons overlapping the sequences of BeH819015 isolated in Brazil in 2015 [25] (Figure 7A). Cells were electroporated in the presence of the viral amplicons (Z1 to Z4 fragments) using the Gene pulser II apparatus according to supplier's instructions (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and treated within 2 days with apoptotic inducers. Cell controls in these experiments were A549DUALtransfected with a plasmid encoding GFP (pEGFP-N1) and A549 transfected with the same amplicons as above but lacking the first segment (the Z1 amplicon) and named REP NEG (Figure 7A).

2.10. Statistical Analysis

All values are expressed as mean $\pm$ SD of at least three independent experiments, as indicated in figure legends. After normality tests, comparisons between different treatments were analyzed by a one-way ANOVA tests. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant for a post-hoc Tukey's test. All statistical tests were done using the software Graph-Pad Prism version 7.01. Degrees of significance are indicated in the figure captions as follow: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant.

3. Results

3.1. ZIKV Does Not Trigger Apoptosis Until the Release of Most of its Progeny

Our research team had previously demonstrated that a South Pacific epidemic clinical isolate of ZIKV (PF13-25013-18) was able to infect A549 epithelial cells. These cells are particularly permissive to the virus and therefore constitute a suitable model for studying in cellulo host-virus interactions [17]. In order to characterize the cellular death profile that accompanies ZIKV infection more precisely, we conducted a study of the cytopathic effects induced with the viral molecular clone of the epidemic strain from Asian lineage, BeH819015 isolated in Brazil in 2015 (BR15^{MC}) [21]. We infected A549 cells with BR15^{MC} at a multiplicity of infection (MOI) of 1 and followed for 3 days, the characteristics of the viro-induced cell death (Figure 1). We further monitored the induction and execution of apoptosis specifically in infected cells to compare them with the results of viral production (Figure 2).

The measurement of LDH activity in infected cell culture supernatants, which results from a loss of cell integrity mainly reflecting secondary necrosis or estimation of cell viability by measurement of mitochondrial activity by MTT assay, revealed that cell mortality was detected at 48 h post infection (hpi) to reach a high level 72 hpi (Figure 1A,B). At 24 hpi there was no detectable sign of cell death by apoptosis when we looked at the activity or presence of cleaved caspase 3 (Figures 1C and 2C). Relocalization of the pro-apoptotic factor BAX to mitochondria, an early marker of apoptosis (Supplemental Figure S1A), was only observed at 48 hpi (Figure 2A,B) and only occurred in approximately 10% of the cells that were immunolabeled with an antibody directed against the viral envelope protein E (ZIKV-E; Figure 2B). Examination of another signal of engagement in apoptosis, namely the presence of cytosolic cytochrome-c (Figure 2A, magnified image with (b) arrow on the cyt-c immunodetection panel), led to the same observation (Figure 2C). It should be noted that only some of the cells immunolabeled for ZIKV-E had apoptotic characteristics (Figure 2A). The percentage of uninfected cells with signs of death by apoptosis was always equivalent to that observed in the controlled cell cultures over time (Figure S1B). Analysis of apoptosis execution, such as the measurement of caspase 3/7 activity (Figure 1C), immuno-detection in infected cells of cleaved activated caspase 3 (Figure 2A,D) or by Western blotting (WB; Figure 3C) supported the delay in cell death with respect to the course of viral multiplication. Moreover, significant signs of engagement in apoptosis occurred when the released viral progeny have already reached their maximum (Figure 2E). A late and low proportion of ZIKV-infected cells engaged in apoptosis were also retrieved during the infection of Vero cells (Figure S2). This apoptosis kinetics differed significantly from the one induced during the Ross River alphavirus (RRV) infection. Thus during RRV infection the maximum of caspase 3 activity was observed at 24 hpi and was at least 10 fold higher than the one measured in ZIKV-infected cells. These observations suggest a ZIKV-infection specific feature of the viro-induced apoptosis, together with a regulatory mechanism implemented by the ZIKV to delay apoptosis.

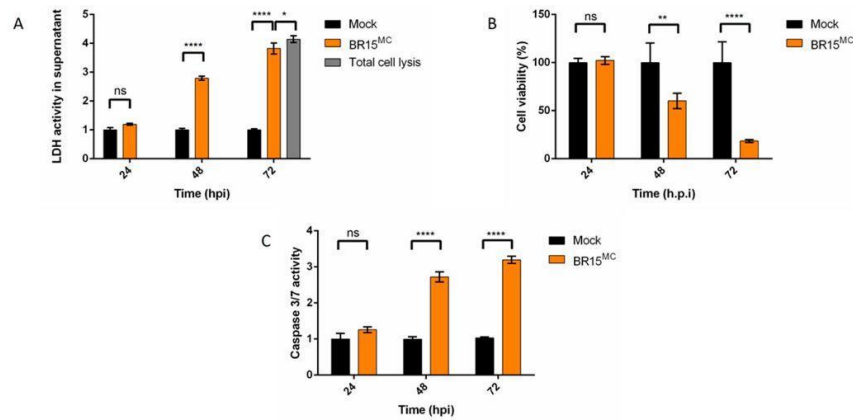


Figure 1. Cell death during a Zika virus (ZIKV) infection of A549 cells. A549 cells were infected with BR15^{MC} at a multiplicity of infection (MOI) of 1. LDH activity was measured in cell supernatant of mock infected cells, BR15 infected cells and in cells treated with triton X-100 as a positive control of total cell lysis value (grey bar) and was normalized to mock infected cells value (A), cell viability (MTT assay) (B) and caspase 3/7 activity (C) were measured at 24, 48 and 72 h post infection (hpi) and normalized to mock infected cells values. Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns = not significant).

To rule out that delayed apoptosis in infected cells was not a feature of the epithelial cell line A549 or Vero cells, we verified the respective courses of infection and cell death in other cell models. In the U251MG line of human brain glioblastoma-astrocytoma cells, infection kinetics was accompanied by a complete absence of apoptosis within the first 48 h of infection before the maximum of viral progeny production (Figure S3). Thus we confirm that death by apoptosis induced by our BR15^{MC} viral molecular clone as for the Asian epidemic clinical isolate PF13 occurs late and is relatively moderate compared to the kinetics of induced viral death that can be observed in the case of infection by other arboviruses like alphaviruses (Figure S2 and [12]).

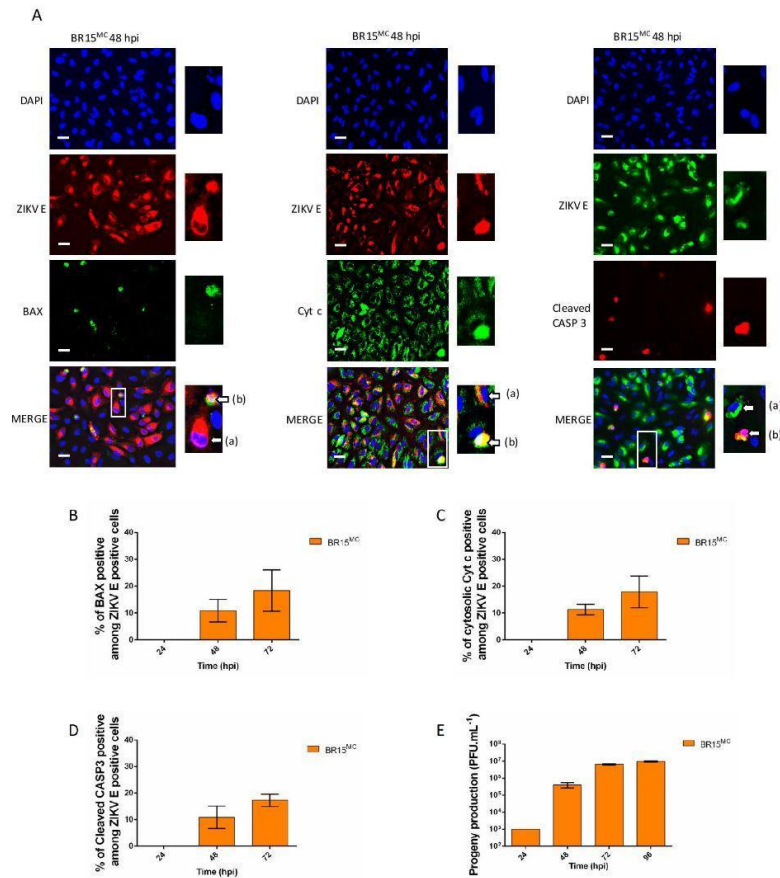


Figure 2. BR15^{MC} does not cause significant activation of apoptosis until late in infection. A549 cells were infected with BR15^{MC} at MOI of 1. (A) Cells were immunostained for active mitochondrial BAX, cytochrome c (Cyt c), ZIKV E and cleaved caspase 3 (CASP 3), 48 hpi. The white scale bar represents 10 μ m. Right panel series show magnified details of selected cells from the $\times 200$ microscopic field (white square). Arrows indicate (a): an infected cell (stained for ZIKV E) and (b): an infected and apoptotic cell (stained for ZIKV E and with mitochondrial localization of BAX or Cytosolic Cyt c or cleaved CASP3). (B) Percentage of A549 infected cells co-immunolabeled for ZIKV E and for active mitochondrial BAX, among the ZIKV E positive cells were determined at 24, 48 and 72 hpi. (C) Percentage of A549 infected cells co-immunolabeled for ZIKV E and for cytosolic Cyt c, among the ZIKV E positive cells were determined at 24, 48 and 72 hpi. (D) Percentage of A549 infected cells immunostained with anti-cleaved CASP 3 antibody among the ZIKV E positive cells were followed at 24, 48 and 72 hpi. (E) The infectious viral particles were collected from infected cell culture supernatants at 24, 48, 72 and 96 hpi and titrated. Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments.

3.2. ZIKV Infected Cells Display Resistance to Apoptosis Inducers

Apoptosis can be initiated by extrinsic or intrinsic pathways, the former being mediated by death receptors located on the cell surface, the latter being driven by various cellular stresses such as DNA damage. Activation of apoptosis-initiating caspases 8 or 9 results in mitochondrial outer membrane

permeabilization (MOMP) via oligomerization and insertion of the proapoptotic factors BAX/BAK in the mitochondria of type II cells such as epithelial cells [26].

The late onset of apoptosis in infected cells led us to postulate that ZIKV may modulate the apoptotic response of the cell, delaying it through transient inhibition. To test this hypothesis, we investigated whether ZIKV could counteract the effect of death inducers added during the infection time course. We induced apoptosis through extrinsic and intrinsic pathways and tested the addition of the inducer at 2 h prior-to and 2 h post infection (Figures 3 and 4).

3.2.1. ZIKV Provides Protection Against Death Receptor Mediated Cell Death

To drive an extrinsic apoptosis, we induced the TNF-receptor using its ligand, TNF-alpha (TNF α), inhibiting the cytoprotective NF κ B response by the addition of the translation inhibitor cycloheximide (CHX). Between 6 and 8 h of treatment leads to an estimated 20% cell mortality in A549 cells, when counting BAX positive cells (Figure 3A). No variation in the percentage of cells engaged in early apoptosis (BAX+) 8 h after the onset of treatment was observed when TNF α /CHX was added 2 h prior to ZIKV infection.

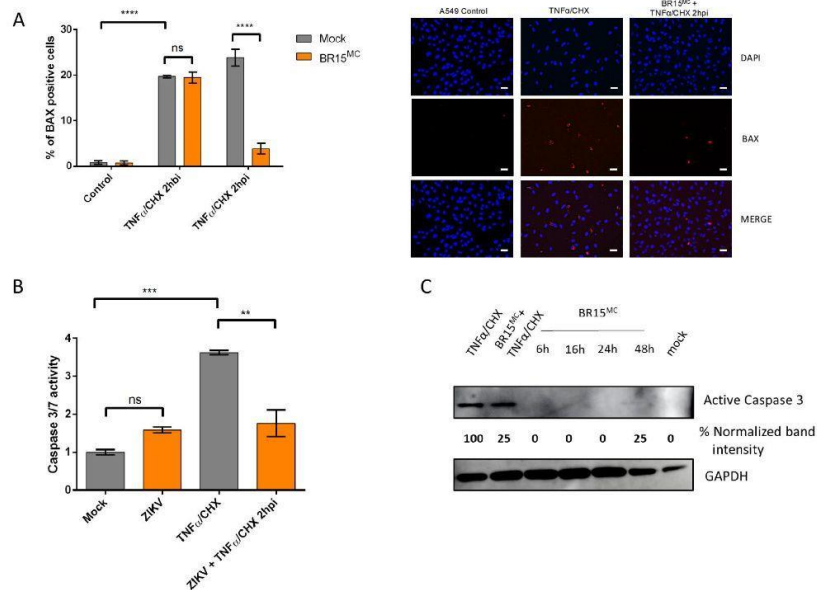


Figure 3. BR15^{MC} provides a protection against extrinsically induced cell death. A549 cells were infected with BR15^{MC} at MOI of 1 for 8 h and treated with TNF α and cycloheximide (TNF α /CHX) 2 h post infection (2 hpi) or 2 h before infection (2 hbi). (A) The percentage of A549 cells immunolabeled with anti-BAX antibody was enumerated from images representative of immunofluorescence observations (panels on the right, white scale bar: 10 μ m). (B) Caspase 3/7 activity was measured after TNF α /CHX treatment 2 hpi and normalized to mock treated and infected cells. (C) Immunoblot of active caspase 3 during TNF α treatment 2 hpi and infection time course with BR15^{MC}. Active caspase 3 band intensity was normalized with GAPDH. Western blotting (WB) is representative of three independent experiments. Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant).

Conversely, if TNF α /CHX was added 2 h post infection, a drastic and significant drop in the percentage of cells engaged in apoptosis was observed. This drop was corroborated by the measure of caspase 3 activity (Figure 3B). It is worth recalling that in this lapse of time, virally induced apoptosis is undetectable and therefore is unlikely to interfere with the quantification of cell death induced by the action of TNF α /CHX. Moreover, in Western blots, detectable levels of the active form of caspase 3 in BR15^{MC}-infected cells were seen to be reduced by around 75% after treatment with TNF α /CHX (Figure 3C).

3.2.2. ZIKV Provides Protection Against Intrinsically Induced Cell Death

Intrinsically induced apoptosis was stimulated by chemical DNA damage. To do this, we used the genotoxic agent etoposide, a topoisomerase-II inhibitor, which causes chromosome breaks during DNA replication. Overnight treatment with etoposide (16–18 h) resulted in a percentage of cells with a mitochondrial BAX among the remaining adherent cells that was between 7% and 12%, depending on the experiment (Figure 4). Similar to the induction of cell death by TNF α /CHX, although the effects are slightly more modest, apoptosis produced in A549 cells after 16 h of etoposide treatment was significantly reduced in the case where ZIKV was added 2 h post-infection (Figure 4A). In addition, both BR15, the molecular clone of ZIKV (Figure 4A) and a clinical isolate of the epidemic strain PF13 (Figure 4B) were capable to interfere with apoptosis induction by etoposide.

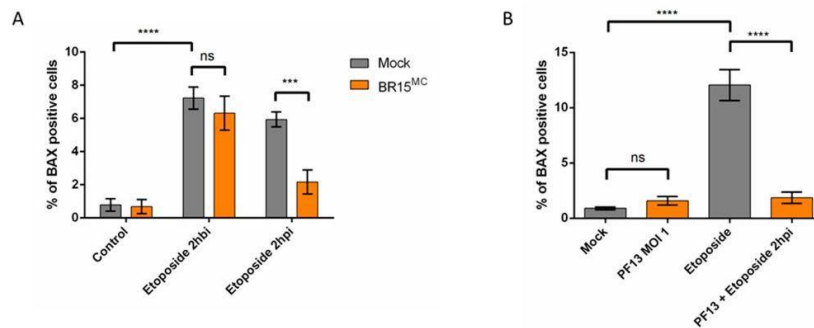


Figure 4. ZIKV provides a protection against intrinsically induced cell death by etoposide. (A) A549 cells were infected with BR15^{MC} at MOI of 1 for 8 h and treated with etoposide 2 h before infection (2 hbi) or 2 h post infection (2 hpi). The percentage of A549 cells immunostained with anti-BAX antibody was followed. (B) A549 cells were infected with PF13 at MOI of 1 for 8 h and treated with etoposide for 16 h, 2 hpi. The percentage of A549 cells immunostained with anti-BAX antibody was followed. Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test (***) $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant).

We also tested the effect of the cell line used for infection by repeating the procedure in Vero cells, in this instance using blasticidin to induce intrinsic apoptosis in response to the inhibition of translation instead of DNA damage with etoposide. Following cell death by MTT assay and caspase 3/7 activity again suggested that ZIKV infection represses apoptosis, regardless of cell type and death inducers (Figure 5A,B).

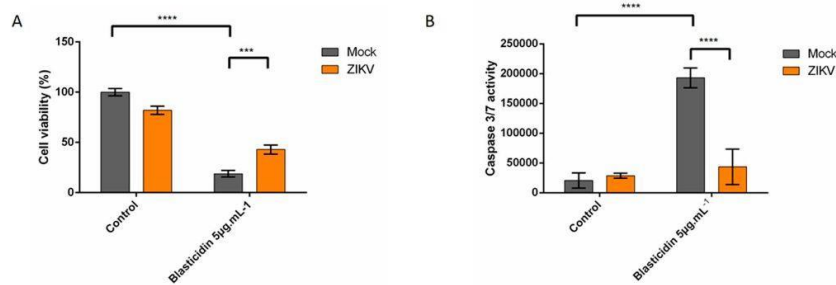


Figure 5. ZIKV provides a protection against intrinsically induced cell death by blasticidin. Vero cells were infected with ZIKV-PF13 at MOI of 1 for 8 h and treated with blasticidin for 16 h, followed by viability assay (MTT) (A) or caspase 3/7 activity (B). Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant).

In order to ensure that the ZIKV mediated repression of apoptosis was conserved between ZIKV strains, we looked at the effect of apoptosis induction with etoposide after infection with the epidemic clinical isolate PF13 (ZIKV-PF13) but also with a molecular clone of historical strain from African lineage, MR766-NIID isolated in Uganda in 1947 (MR766^{MC}; Supplemental Figure S4). ZIKV infection resulted in reduced apoptosis for all tested strains. Convergent measurements of several parameters that establish the death rate and degree of protection confirm that ZIKV interferes with the achievement of apoptosis in response to a death signal.

3.3. Apoptosis is Repressed Through ZIKV Replication

Our data suggest that protection against an exogenous induced apoptosis is acquired once the virus has entered the cells and started its multiplication cycle. In order to determine the contribution of the replicative process in the protective mechanism, we exploited the “replicon” systems.

3.3.1. Cells Stably Expressing a ZIKV Replicon are Protected from Intrinsically and Extrinsically Mediated Apoptosis

Since both epidemic Asian (BR15^{MC}) and historical African (MR766^{MC}) strains of ZIKV were found to be able to control apoptosis, we investigated the role of viral replication in the mechanism of apoptosis repression using a previously established MR766 replicon system in HEK-293 cells [25]. The Rep ZIKV-GFP cells have a self-replicating RNA encoding the viral NS proteins from MR766-NIID, a puromycin resistance gene to facilitate selection and GFP as a reporter. HEK-293 cells stably transfected with a plasmid encoding a GFP reporter gene and puromycin resistance without any viral material was used as a control (HEK CT; Figure 6). Apoptosis was induced either with TNF α /CHX, with etoposide or with blasticidin. We monitored apoptosis and in particular measured caspase 3/7 activity 6h post addition of TNF α /CHX or 16 h post addition of etoposide or blasticidin. We compared the values related to caspase 3/7 activity in Rep ZIKV-GFP with those obtained with the control cells (HEK CT; Figure 6A).

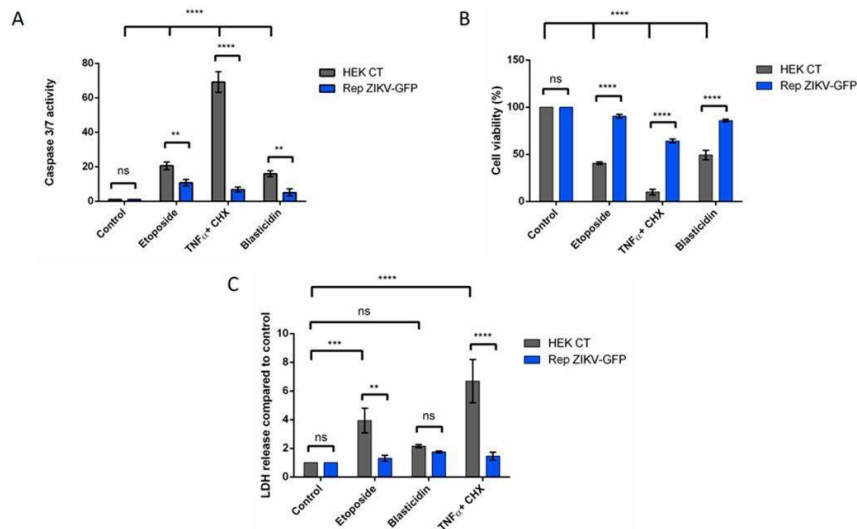


Figure 6. ZIKV replicon-expressing cells are protected from apoptosis. HEK-293 cells stably expressing a ZIKV replicon (Rep ZIKV-GFP) are protected from intrinsically and extrinsically mediated apoptosis. HEK-293 cells with Rep ZIKV-GFP were treated with TNF α and CHX for 6 h, or treated with etoposide 10 μ M or blasticidin 25 μ g/mL⁻¹ for 16 h and analyzed for: caspase 3/7 activity (A), cell viability (MTT assay) (B) and released LDH activity (C). Values represent the mean and standard deviation obtained with three different clones of Rep ZIKV-GFP. Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant).

Monitoring apoptosis by caspase 3/7 activity (Figure 6A), together with the measure of cell viability (Figure 6B) and released LDH activity (Figure 6C) demonstrated that ZIKV replicon resulted in a significant reduction in the indicators of cell death. An inhibition of apoptosis was not observed in the case of the cell control, selected for GFP and puromycin resistance (HEK CT) as well as in untransfected HEK-293 cells (data not shown). It can be concluded that resistance to puromycin or the presence of a GFP encoding gene were not responsible for a protective effect.

It can therefore be proposed that the presence of an autonomous replication of a viral RNA associated with the expression of ZIKV NS proteins makes cells resistant to several extrinsic and intrinsic apoptotic inducers.

3.3.2. A549 Cells Transiently Expressing a ZIKV Replicon are Protected from Different Intrinsically Induced Apoptosis

To address a protective effect of the viral replication in a system consistent with the one in which the effect was revealed through infection, we adapted the ISA method to obtain A549 cells transiently expressing a ZIKV replicon with the non-structural sequences from BeH819015 (REP BR15). We used A549 cells transfected with an incomplete set of amplicons as a negative control (REP-NEG; Figure 7A). Apoptosis was induced 48 h after amplicon transfection either by etoposide treatment (Figure 7B) or by DNA damage through exposure to UV light (Figure 7C).

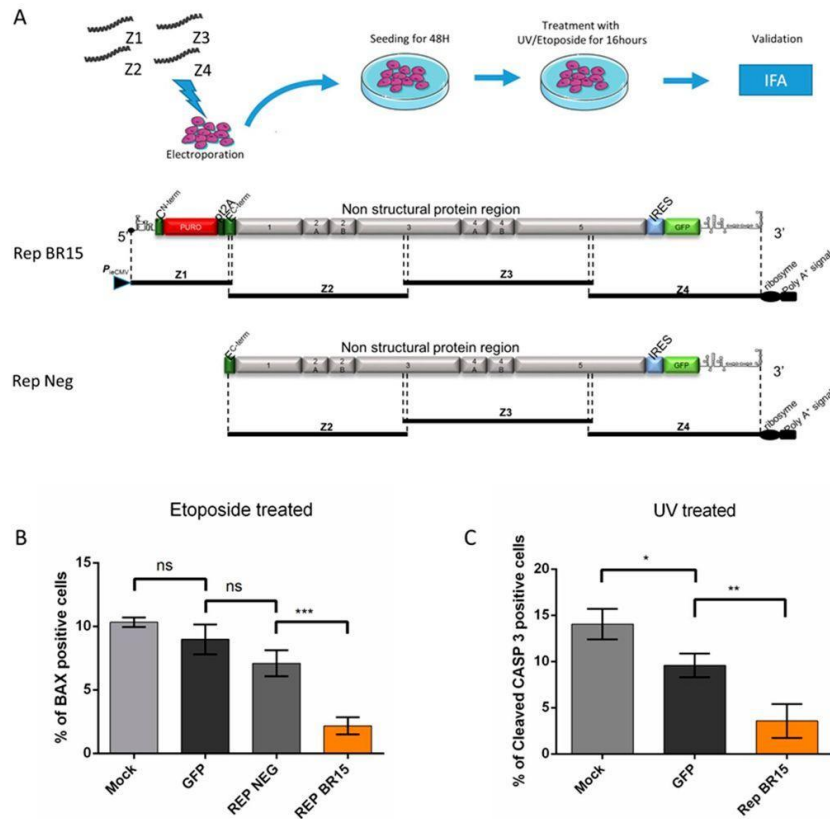


Figure 7. A549 cells transiently expressing a ZIKV replicon are protected against cell death by apoptosis. A549 cells were transfected with ZIKV amplicons (Z genomic overlapping fragments) for production of REP BR15 (Z1, 2, 3 and 4) and REP NEG (Z2, 3 and 4) or with pEGFP-N1 (A). At 48 h after transfection A549 cells were treated with etoposide for 16 h (B) or UV at 400 mJ (C). The percentage of A549 cells immunostained with anti-BAX antibody or anti-cleaved CASP 3 was monitored. Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, ns = not significant).

In cells treated with etoposide, REP BR15 expressing cells showed approximately half the number of apoptotic cells of the replicon control (REP NEG; Figure 7B). The percentage of dying cells was even lower in cells expressing REP BR15 after UV treatment (Figure 7C). Thus, REP BR15 was able to confer resistance to apoptosis. This resistance was also observed in an experiment conducted with A549 cells transiently expressing a ZIKV replicon from the MR766 strain of ZIKV (Figure S5). All together these results suggest that replication of the ZIKV was capable of inhibiting apoptosis.

3.4. ZIKV Promotes an Anti-Apoptotic Prevailing Status in Infected Cells Through the Bcl-2 Family Protein

The long delay in the onset of viral apoptosis induced by ZIKV infection, particularly in the case of Asian viral strains responsible for current epidemics, and the demonstration that, when the viral RNA is present and replicating there is an inhibition of apoptotic induction, suggest that cells have acquired with the virus a status in which anti-apoptotic activity prevails. The protective effect

acquired with ZIKV could be at the level of convergence of the intrinsic and extrinsic pathways. As we followed BAX relocalization we could argue in favor of protection around the mitochondria events and the control of the outer membrane permeabilization (OMP). A prominent anti-apoptotic factor involved in the regulation of early apoptosis, by operating mainly at the mitochondrial level for the control of its permeabilization is Bcl-2 and the related Bcl-XL protein [27]. To identify to which extent these anti-apoptotic factors play a role in the protection provided by ZIKV, we examined the effect of ABT-737 on cell death outcomes, with or without BR15^{MC} (Figure 8A,B). ABT-737 is a BH3 mimetic molecule that can bind to the hydrophobic groove of the members of the anti-apoptotic Bcl-2 protein family, Bcl-2 and Bcl-xL, and therefore inhibits their activity by shifting oligomerization mechanisms in favor of BAX/BAK dimerization [28].

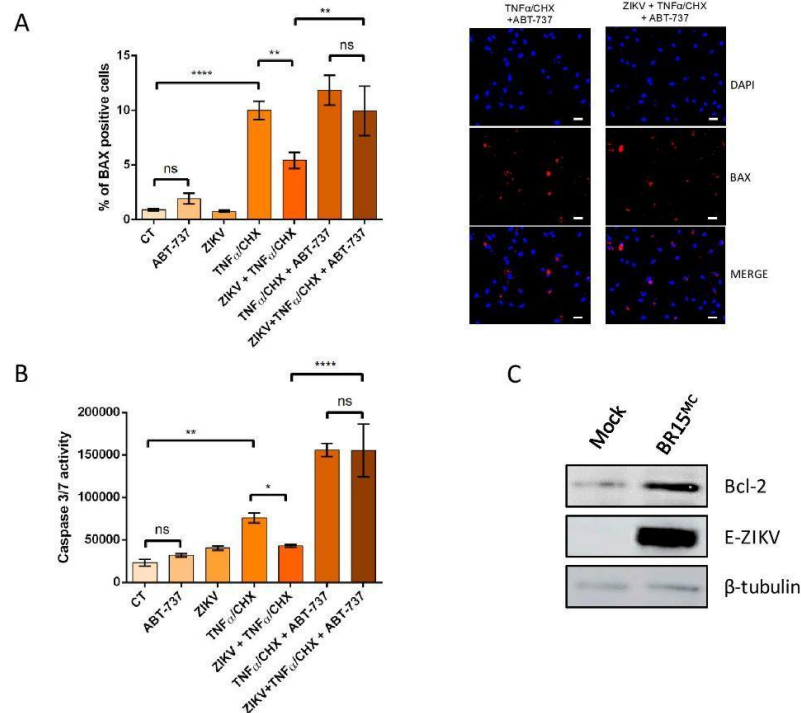


Figure 8. Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins abrogates the protection mediated by ZIKV. A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 1. TNFα and CHX were added 2 h post infection for 6 h with or without ABT-737. A549 cells were immunostained with an anti-BAX antibody (representative images in panels on the right, white scale bar: 10μm) (A) and caspase 3/7 activity was followed after treatment (B). A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 1 and level of Bcl-2 was followed by western blot 24 h post infection (C). Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, ns = not significant).

When inducing apoptosis with TNFα/CHX, addition of ABT-737 restored the percentage of ZIKV-infected cells with mitochondrial BAX (Figure 8A) and caspase 3/7 activity (Figure 8B) to levels that were similar to cells that were not infected with ZIKV.

These observations suggest that ABT-737 has counteracted the protective effect acquired with the virus. It can legitimately be deduced that the viro-induced protective effect probably depends on the anti-apoptotic activity of Bcl-2 family proteins. When Bcl-2/Bcl-XL is inhibited, ZIKV no longer allows a quantitative reduction of apoptosis.

As we used cycloheximide or blasticidin in our assays, we could therefore assume that the mechanism implemented by ZIKV did not involve a “de novo” synthesis of proteins. Based on these remarks, we formulated the hypothesis that ZIKV might allow stabilization of the Bcl-2 protein over time. We performed a western blot assay to measure Bcl-2 protein level upon ZIKV infection. Upon ZIKV infection, we observed an increase of Bcl-2 at the protein level (Figure 8C). This stabilization of Bcl-2 could support the anti-apoptotic capacity of ZIKV.

4. Discussion

ZIKV has attracted tremendous attention in the field of medically important flaviviruses, which are responsible of world epidemics that are difficult to control [29]. To date, there is no effective treatment against this emerging pathogen despite significant efforts made to succeed in providing an effective vaccine. The characterization of the interaction modalities between the pathogen and host cells are important in order to better understand the strategies adopted by the virus to be effective in its replication and dispersal of its progeny. Among the responses of infected cells, a high priority must be given to virally induced apoptosis since its completion can significantly interfere with the virus’s multiplication cycle and hinder its spread [30]. Moreover, crosstalk between innate immune signaling and cell death pathways and how the viruses are able to manipulate each other are essential for viral clearance or persistence and for the global outcomes of the infection. Many studies support that ZIKV infection induces apoptosis in vivo as well as in vitro [31–33]. However, several of them also assert that ZIKV induced cell death could be delayed [17,18]. We therefore wanted to define whether this capacity was specific to the strain of ZIKV responsible for the current epidemic and whether ZIKV was able to interfere with the induction of apoptosis.

Using a molecular clone of the BeH819015 from the Brazilian 2015 outbreak (BR15^{MC}) and its comparison to the clinical isolate from the French Polynesian 2013 outbreak (PF13), our work has highlighted that ZIKV strains from the actual epidemic Asian lineage are particularly inclined to delay the onset of apoptosis in infected human epithelial cells (A549) as well as in human brain glioblastoma–astrocytoma cells (U251 MG; Figure 1, Figure 2 and Figure S3). These viruses are also characterized by a rather slow viral growth compared to the molecular clone of the historical strain of ZIKV MR766 from the African lineage [21]. Infection with MR766^{MC} was marked by a higher cytotoxicity over the duration of infection, with 10% of infected cells showing signs of entry into apoptosis as early as 24 h, whereas epidemic strains had no signs of mortality before 48 h. However, despite this behavior of MR766^{MC}, which seems more aggressive, it must be admitted that the mortality rate among infected cells remained limited until 48 h post infection (Figure 2 and Figure S4). We proposed from these results that both viruses had the ability to interfere with the onset of apoptosis even though faster and more effective viral growth in the early hours of infection for MR766^{MC} than for BR15^{MC} had resulted in faster and more cytopathic effects. In both cases, the maximum mortality was only recorded when the virion production had reached its highest titer. This observation suggests a manipulation of apoptosis orchestrated by ZIKV in order to give it enough time to complete its entire production cycle. This phenomenon has already been described for other flaviviruses such as DENV, JEV and WNV as they can delay apoptosis through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Akt pathway [16,34].

In a rather unexpected way, our work mainly shows that in the early stages of infection, ZIKV infection provides a solid protection against an exogenous induced cell death. We provided supporting evidence that protection is acquired both with the Asian epidemic strains and with the African strain (Figure 3, Figure 4, Figures S4 and S5). This protection is effective against apoptosis mediated by an extrinsic death inducer (TNF α) as well as by an intrinsic signal (provided by the action of etoposide or

blastocidin). Resistance to these induction modes has also been found to characterize cells expressing replicons, either HEK 293 cells stably expressing a MR766 replicon or A549 cells transiently expressing BR15 replicons or MR766 replicons (Figure 6, Figure 7 and Figure S5). The data obtained with the use of these replicons are in support of a greater protection granted by BR15. This is consistent with the data obtained with the whole virus that is responsible for the longest delay in apoptosis entry. Cell death inhibition ability acquired with the ZIKV replicons would imply that the single presence of a viral RNA leading to the production of the NS proteins and allowing its self-replication is the driving force behind the protection acquired against apoptosis.

This discovery is rather unusual when one considers the literature mainly in favor of pro apoptotic functions for the NS proteins [35]. However, studies have also shown that some NS may help ZIKV to evade antiviral immunity and cell death. NS2B in particular was proposed to be responsible for blocking (RIG-I)-like receptors triggered apoptotic cell death [36]. A thorough identification of the viral protein responsible for an inhibitory effect needs to be confirmed and further investigated. While our work suggests a possible role for NS proteins in the control of apoptosis, we cannot rule out the possibility that structural proteins may also act. Anti-apoptotic activities have been previously reported in relation to the capsid [16,18]. It should be noted that in the construct we used to generate the replicons, the polyprotein produced retains the first 33 amino acids of the capsid. It would be interesting to see if this part of the structural protein, released after the cleavage of the GFP has a role in protection. We could not also exclude a role of the viral RNA by itself. Recent work has also investigated the effects of viral RNAs, as flaviviruses are known to produce multiple small RNAs that may have interference activities in the cell physiology. It was recently described that recent epidemic Asian lineage display more negative-strand replicative intermediates than the historical African strain [37]. This important production could be a key element in the search for which viral determinants are crucial in the control of apoptosis. We also know how important are the viral genomic 3' UTR regions and the Subgenomic Flavivirus RNA (sfRNA) produced, in the implementation of cellular responses to infection [38]. It remains to be discovered which factor associated with the replication process of ZIKV viral RNA is involved in the protection mechanism. What we already know from our study is that this mechanism required the Bcl-2 family protein as ABT-737 abrogates the protection acquired against apoptosis by ZIKV infection (Figure 8). The anti-apoptotic capacity of the pro-survival Bcl-2 proteins is known to depend mainly on their ability to sequester pro-apoptotic proteins by binding their BH3 domains. A decrease in Bcl-2 leads to the disruption of associated pro-survival and pro-apoptotic Bcl-2 proteins and will promote apoptosis whereas overexpression of Bcl-2 will inhibit mitochondrial OMP [39,40]. A control of the stability and degradation of Bcl-2 is therefore a key in the subtle balance that takes place between pro and anti-apoptotic suits to determine the cell's fate [40]. A previous study showed the importance of Bcl-xL for cells survival, in deficient Bcl-2 cells during ZIKV infection [41], but here we could not exclude a role for Bcl-2 and/or Bcl-xL protein as our model expressed these two anti-apoptotic proteins. Based on the fact that Bcl-2 family protein was involved in ZIKV infection with a Bcl-2 protein level quantitatively maintained (Figure 8), we formulated the hypothesis that ZIKV might allow a stabilization of the Bcl-2 protein over time and inhibit MOMP formation (Figure 9). The mechanism by which the virus allows the Bcl-2 stabilization and blocks apoptosis needs further investigation.

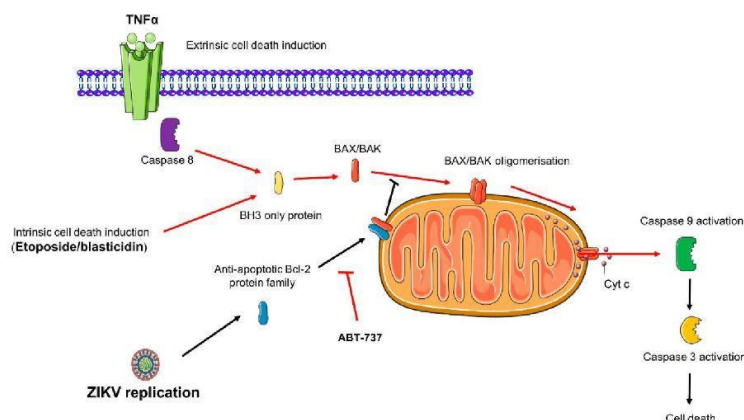


Figure 9. Model depicting the protective action of ZIKV infection against apoptosis. Intrinsic or extrinsic activation of cell death occurs through the formation of mitochondrial outer membrane pore (MOMP) via the BAX/BAK complex. The anti-apoptotic family Bcl-2 members Bcl-2/Bcl-XL interfere with the complex formation by sequestering BAX via their BH3 domain. ZIKV replication interferes with BAX relocalization at the mitochondria. ABT-737, a BH3 mimetic, which inhibits Bcl-2/Bcl-XL, abrogates the inhibition induced by ZIKV. Indeed, the virus delays apoptosis during infection by modulating the homeostasis of Bcl-2/Bcl-XL.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/11/1338/s1>, Figure S1. IF imaging to validate markers of apoptosis in A549 cells. Figure S2. Alphavirus RRV induces early and massive apoptosis compared to Zika virus. Figure S3. ZIKV-PF13 does not cause significant activation of apoptosis until late in infection in U251MG cells. Figure S4. ZIKV-MR766 does not cause significant activation of apoptosis until late in infection and ZIKV-MR766 is able to control cell death. Figure S5. A549 cells transiently expressing a ZIKV-MR766 replicon are protected against cell death by apoptosis.

Author Contributions: J.T., E.F., W.V., P.K.-T. designed the research. J.T., E.F., W.V., P.K.-T. performed the research; J.T., E.F., P.D., W.V., P.K.-T. contributed new reagents/analytic tools; all authors analyzed the data; J.T., E.F., W.V., P.K.-T. wrote, revised and edited the manuscript.

Funding: This work was supported by the Federation BioST from Reunion Island University (Zikapone project), the ZIKAlert project (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0001902). E.F. holds a fellowship from the Regional Council of Reunion Island (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0012406). J.T. has a PhD degree scholarship from La Réunion Island University (Ecole Doctorale STS), funded by the French ministry MEESR.

Acknowledgments: We thank the members of PIMIT and DÉTROIT laboratories for helpful discussions. We are grateful to David A. Wilkinson for the critical review of the manuscript and Valérie Ferment-Van de Moortele for the English spelling. We also thank Valérie Choumet for providing us the rabbit anti-ZIKV EDIII antibodies. Servier Medical art provided the icons used in Figures 7 and 9.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Paixão, E.S.; Barreto, F. History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. *Am. J. Public Health* **2016**, *106*, 606–612.
- Cao-Lormeau, V.-M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [\[CrossRef\]](#)
- Lover, A.A. Zika virus and microcephaly. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 1331–1332. [\[CrossRef\]](#)
- McKenzie, B.A.; Wilson, A.E.; Zohdy, S. Aedes albopictus is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PLoS ONE* **2019**. [\[CrossRef\]](#)

5. Kraemer, M.U.; Sinka, M.E.; Duda, K.A.; Mylne, A.Q.; Shearer, F.M.; Barker, C.M.; Moore, C.G.; Carvalho, R.G.; Coelho, G.E.; Van Bortel, W.; et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Haddow, A.D.; Schuh, A.J.; Yasuda, C.Y.; Kasper, M.R.; Heang, V.; Huy, R.; Guzman, H.; Tesh, R.B.; Weaver, S.C. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Giovanetti, M.; Milano, T.; Alcantara, L.C.J.; Carcangiu, L.; Cella, E.; Lai, A.; Lo Presti, A.; Pascarella, S.; Zehender, G.; Angeletti, S.; et al. Zika Virus spreading in South America: Evolutionary analysis of emerging neutralizing resistant Phe279Ser strains. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, *9*, 445–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Apte-Sengupta, S.; Sirohi, D.; Kuhn, R.J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *9*, 134–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Hamel, R.; Dejarnac, O.; Wichit, S.; Ekchariyawat, P.; Neyret, A.; Luplertlop, N.; Perera-Lecoin, M.; Surasombattana, P.; Talignani, L.; Thomas, F.; et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J. Virol.* **2015**, *89*, 8880–8896. [[CrossRef](#)]
10. Mehrbod, P.; Ande, S.R.; Alizadeh, J.; Rahimizadeh, S.; Shariati, A.; Malek, H.; Hashemi, M.; Glover, K.K.M.; Sher, A.A.; Coombs, K.M.; et al. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence* **2019**, *10*, 376–413. [[CrossRef](#)]
11. Roulston, A.; Marcellus, R.C.; Branton, P.E. Viruses and Apoptosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 577–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Krejbich-Trotot, P.; Denizot, M.; Hoarau, J.-J.; Jaffar-Bandjee, M.-C.; Das, T.; Gasque, P. Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2011**, *25*, 314–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Li, M.-L.; Stollar, V. Alphaviruses and apoptosis. *Int. Rev. Immunol.* **2004**, *23*, 7–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Okamoto, T.; Suzuki, T.; Kusakabe, S.; Tokunaga, M.; Hirano, J.; Miyata, Y.; Matsuura, Y. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bhuvanankantham, R.; Cheong, Y.K.; Ng, M.-L. West Nile virus capsid protein interaction with importin and HDM2 protein is regulated by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Microbes Infect.* **2010**, *12*, 615–625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Urbanowski, M.D.; Hobman, T.C. The West Nile Virus Capsid Protein Blocks Apoptosis through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Mechanism. *J. Virol.* **2013**, *87*, 872–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Frumence, E.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; El-Kalamouni, C.; Nativel, B.; Rondeau, P.; Missé, D.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Desprès, P. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology* **2016**, *493*, 217–226. [[CrossRef](#)]
18. Limonta, D.; Jovel, J.; Kumar, A.; Airo, A.M.; Hou, S.; Saito, L.; Branton, W.; Ka-Shu Wong, G.; Mason, A.; Power, C.; et al. Human Fetal Astrocytes Infected with Zika Virus Exhibit Delayed Apoptosis and Resistance to Interferon: Implications for Persistence. *Viruses* **2018**. [[CrossRef](#)]
19. Van der Linden, V.; Pessoa, A.; Dobyns, W.; Barkovich, A.J.; van der Linden Júnior, H.; Filho, E.L.R.; Ribeiro, E.M.; de Carvalho Leal, M.; de Araújo Coimbra, P.P.; de Fátima Viana Vasco Aragão, M.; et al. Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth–Brazil. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 1343–1348. [[CrossRef](#)]
20. Gadea, G.; Bos, S.; Krejbich-Trotot, P.; Clain, E.; Viranaicken, W.; El-Kalamouni, C.; Mavingui, P.; Desprès, P. A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology* **2016**, *497*, 157–162. [[CrossRef](#)]
21. Bos, S.; Viranaicken, W.; Turpin, J.; El-Kalamouni, C.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; Desprès, P.; Gadea, G. The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells. *Virology* **2018**, *516*, 265–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Nativel, B.; Marimoutou, M.; Thon-Hon, V.G.; Gunasekaran, M.K.; Andries, J.; Stanislas, G.; Planes, C.; Da Silva, C.R.; Césari, M.; Iwema, T.; et al. Soluble HMGB1 is a novel adipokine stimulating IL-6 secretion through RAGE receptor in SW872 preadipocyte cell line: Contribution to chronic inflammation in fat tissue. *PLoS ONE* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

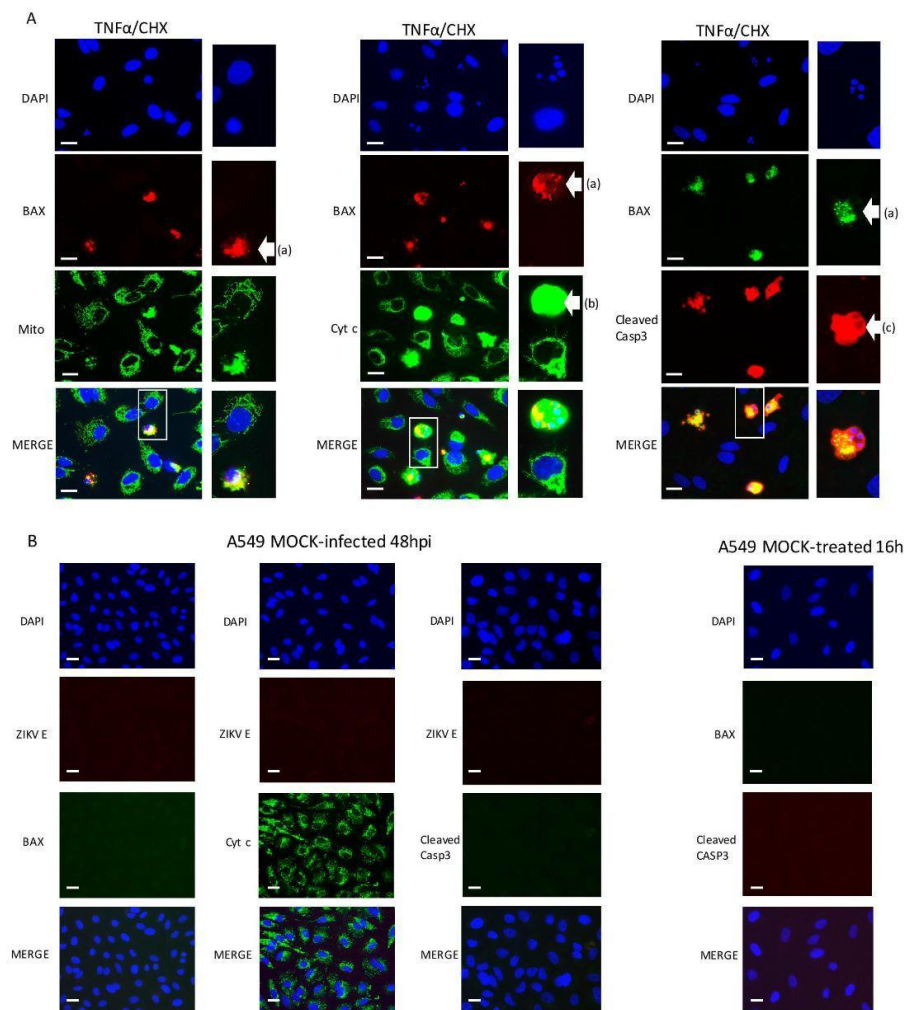
23. Viranaicken, W.; Gasmi, L.; Chaumet, A.; Durieux, C.; Georget, V.; Denoulet, P.; Larcher, J.-C. L-Ilf3 and L-NF90 Traffic to the Nucleolus Granular Component: Alternatively-Spliced Exon 3 Encodes a Nucleolar Localization Motif. *PLoS ONE* **2011**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Antwerp, D.J.V.; Martin, S.J.; Verma, I.M.; Green, D.R. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- κ B. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 107–111. [[CrossRef](#)]
25. El Kalamouni, C.; Frumence, E.; Bos, S.; Turpin, J.; Nativel, B.; Harrabi, W.; Wilkinson, D.A.; Meilhac, O.; Gadea, G.; Desprès, P.; et al. Subversion of the Heme Oxygenase-1 Antiviral Activity by Zika Virus. *Viruses* **2018**, *11*. [[CrossRef](#)]
26. Kantari, C.; Walczak, H. Caspase-8 and bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 558–563. [[CrossRef](#)]
27. Gross, A.; McDonnell, J.M.; Korsmeyer, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1899–1911. [[CrossRef](#)]
28. Oltschendorf, T.; Elmore, S.W.; Shoemaker, A.R.; Armstrong, R.C.; Augeri, D.J.; Belli, B.A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T.L.; Dinges, J.; Hajduk, P.J.; et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **2005**, *435*, 677–681. [[CrossRef](#)]
29. Musso, D.; Gubler, D.J. Zika Virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29*, 487–524. [[CrossRef](#)]
30. Jorgensen, I.; Rayamajhi, M.; Miao, E.A. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 151–164. [[CrossRef](#)]
31. Souza, B.S.F.; Sampaio, G.L.A.; Pereira, C.S.; Campos, G.S.; Sardi, S.I.; Freitas, L.A.R.; Figueira, C.P.; Paredes, B.D.; Nonaka, C.K.V.; Azevedo, C.M.; et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci. Rep.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Li, C.; Xu, D.; Ye, Q.; Hong, S.; Jiang, Y.; Liu, X.; Zhang, N.; Shi, L.; Qin, C.-F.; Xu, Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 120–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ghouzzi, V.E.; Bianchi, F.T.; Molineris, I.; Mounce, B.C.; Berto, G.E.; Rak, M.; Lebon, S.; Aubry, L.; Tocco, C.; Gai, M.; et al. ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly and p53. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lee, C.-J.; Liao, C.-L.; Lin, Y.-L. Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection. *J. Virol.* **2005**, *79*, 8388–8399. [[CrossRef](#)]
35. Liu, J.; Li, Q.; Li, X.; Qiu, Z.; Li, A.; Liang, W.; Chen, H.; Cai, X.; Chen, X.; Duan, X.; et al. Zika Virus Envelope Protein induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis via an Intrinsic Cell Death Signaling Pathway in Neuroendocrine PC12 Cells. *Int. J. Biol. Sci.* **2018**, *14*, 1099–1108. [[CrossRef](#)]
36. Wu, Y.; Liu, Q.; Zhou, J.; Xie, W.; Chen, C.; Wang, Z.; Yang, H.; Cui, J. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins *in vitro*. *Cell Discov.* **2017**. [[CrossRef](#)]
37. Barnard, T.R.; Rajah, M.M.; Sagan, S.M. Contemporary Zika Virus Isolates Induce More dsRNA and Produce More Negative-Strand Intermediate in Human Astrocytoma Cells. *Viruses* **2018**. [[CrossRef](#)]
38. Göertz, G.P.; Abbo, S.R.; Fros, J.J.; Pijlman, G.P. Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Res.* **2018**, *254*, 41–53. [[CrossRef](#)]
39. Kim, H.; Rafiuddin-Shah, M.; Tu, H.-C.; Jeffers, J.R.; Zambetti, G.P.; Hsieh, J.J.-D.; Cheng, E.H.-Y. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 1348–1358. [[CrossRef](#)]

40. Rooswinkel, R.W.; van de Kooij, B.; de Vries, E.; Paauwe, M.; Braster, R.; Verheij, M.; Borst, J. Antiapoptotic potency of Bcl-2 proteins primarily relies on their stability, not binding selectivity. *Blood* **2014**, *123*, 2806–2815. [[CrossRef](#)]
41. Suzuki, T.; Okamoto, T.; Katoh, H.; Sugiyama, Y.; Kusakabe, S.; Tokunaga, M.; Hirano, J.; Miyata, Y.; Fukuhara, T.; Ikawa, M.; et al. Infection with flaviviruses requires BCLXL for cell survival. *PLOS Pathog.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplemental data :



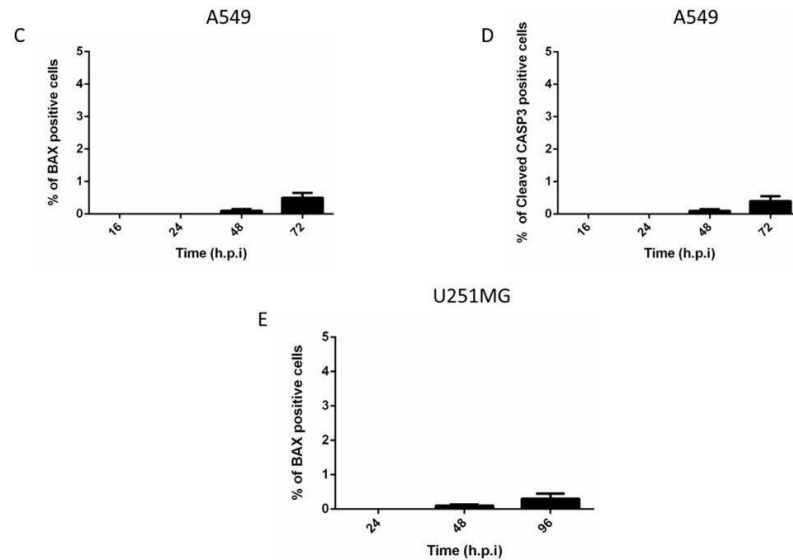


Figure 1. IF imaging to validate markers of apoptosis in A549 cells. (A) A549 cells were treated with TNF/CHX for 16h and co-immunolabeled with anti-BAX Ab and anti-mitochondria Ab (mito) (left panel), anti-cytochrome c Ab (cyt c) (middle panel), anti-Cleaved Caspase 3 (Cleaved CASP3) (right panel). The white scale bar represents 10 μ m. Magnified details of selected cells from the $\times 200$ microscopic field (white square) are displayed next to the images. Arrows indicate apoptotic characteristics (a): BAX mitochondrial staining, (b): cytosolic cytochrome c staining, (c) cleaved CASP3 staining. (B) A549 cells were mock-infected for 48 hours and cells were immuno-labelled with anti-E and anti-BAX Ab (left panel), anti-cytochrome c Ab (cyt c) (middle panel) or anti-Cleaved Caspase 3 Ab (Cleaved CASP3) (right panel). Mock-treated A549 for 16 h were immuno-labelled with anti-BAX Ab and anti-Cleaved Caspase 3 Ab (white scale bar: 10 μ m). Percentage of A549 cells with mitochondrial staining of BAX (C) or with a Cleaved Caspase 3 staining (D) and percentage of U251MG with mitochondrial staining of BAX (E) during the time course experiments. Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments.

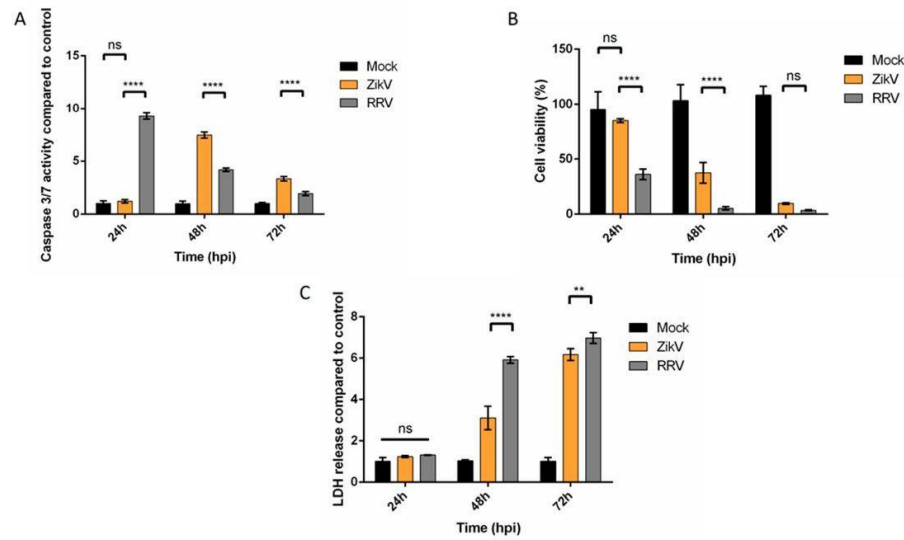


Figure 2. Alphavirus RRV induces early and massive apoptosis compared to Zika virus. Vero cells were infected with Ross River virus (RRV) or with ZIKV at an MOI of 1 for 72 h and analysed for (A) caspase 3/7 activity, (B) cell viability assay (MTT) and (C) released LDH activity in cell supernatants. Values represent the mean and SD of three independent experiments. Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, ns = not significant).

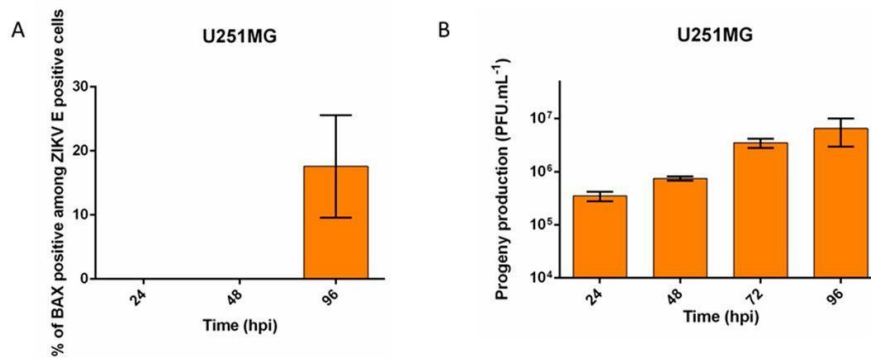


Figure 3. ZIKV-PF13 does not cause significant activation of apoptosis until late in infection in U251MG cells. U251MG cells were infected with ZIKV PF13 (clinical isolate) at MOI of 1 for 96h. (A) Percentage of U251MG cells infected immunostained with anti-BAX antibody were determined at 24, 48 and 96 hpi. (B) The infectious viral particles were collected from infected cell culture supernatants during 96 h post infection and titrated. Values represent mean of three independent experiments.

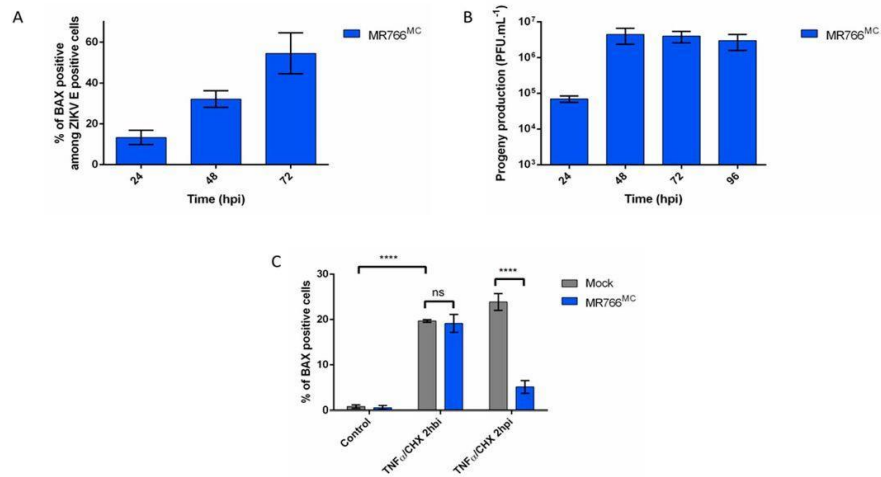


Figure 4. ZIKV-MR766 does not cause significant activation of apoptosis until late in infection and ZIKV-MR766 is able to control cell death. A549 cells were infected with MR766MC at MOI of 1 and during 96h. The percentage of A549 infected cells immunostained with anti-BAX antibody at 24, 48 and 72 hpi (A). The infectious virus was collected in supernatant of infected cells at 24, 48, 72 and 96 hpi for titration (PFU assay) (B). A549 cells were infected with MR766MC at MOI of 1 for 8 h and treated with TNF α /CHX 2 hours before infection (2hbi) or 2 hours post infection (2hpi). Percentage of A549 cells immunostained with anti-BAX antibody (C). Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test. (**** $p < 0,0001$, ns: not significant).

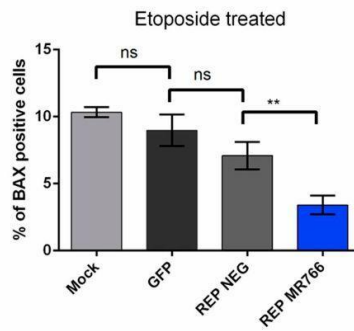


Figure 5. A549 cells transiently expressing a ZIKV-MR766 replicon are protected against cell death by apoptosis. A549 cells were transfected with amplicons of ISA methods to generate replicon for ZIKV-MR766 or with pEGFP-N1. 48h after transfection A549 cells were treated with Etoposide for 16 h. Percentage of A549 cells immunostained with BAX antibody were monitored. Values represent the mean and standard deviation of three independent experiments. Data were analyzed by a one-way ANOVA test with post-hoc Tukey's test (** $p < 0,01$, ns: not significant).

3. Discussion de l'article 1

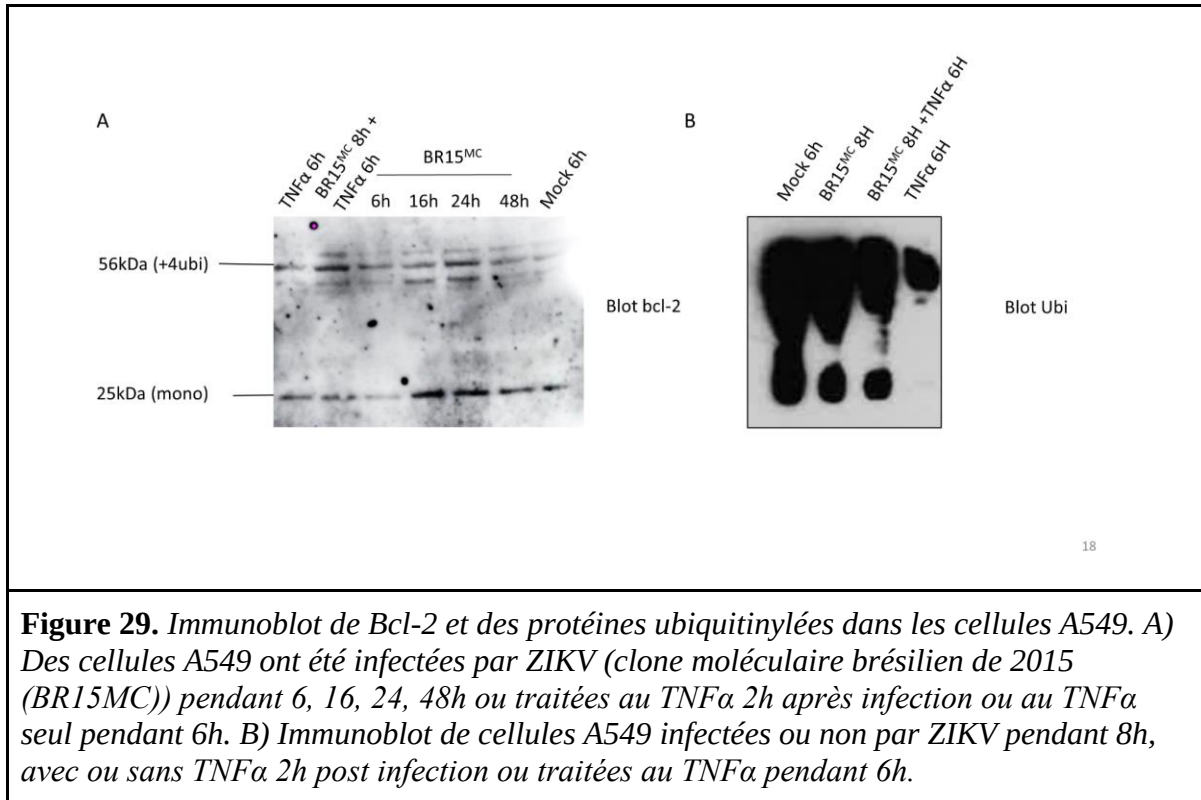
Ce premier article de ma thèse peut être identifié comme un des rares à mettre en exergue l'apoptose comme une réponse antivirale que le virus ZIKV s'emploie à retarder, en parallèle de quelques autres (Kumar et al., 2018; Limonta et al., 2018). Des équipes ont ainsi montré qu'un inhibiteur à large spectre des caspases, le ZVAD-FMK ou l'Emricasan, ajoutés pendant l'infection étaient profitables au virus avec une augmentation de la production d'ARN et de protéines virales (Souza et al., 2016; Xu et al., 2016). D'autres montrent que même si on observe une mort cellulaire par apoptose dans les modèles neuronaux, on observe bien une augmentation de l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et une diminution de l'expression génique de certains facteurs pro-apoptotiques tels que FasL ou TNFR (Cugola et al., 2016). L'inhibition des protéines de la famille Bcl-2 induit une apoptose précoce et conduit à une réduction de la charge virale dans les modèles cellulaires et chez l'animal, ainsi qu'une survie plus importante dans un modèle murin (Suzuki et al., 2018). De plus, des données indiquent que l'apoptose induite par de l'ARN double brin (Poly I:C) est réduite par la surexpression des protéines non structurales NS2B/3 du ZIKV (Wu et al., 2017). La littérature semble aussi montrer que les astrocytes sont des cibles du ZIKV dans lesquels le virus pourrait persister, en raison d'effets cytopathiques réduits et d'une expression augmentée de FGF2 (Limonta et al., 2018, 2019).

Cette capacité à manipuler une réponse cruciale pour la résolution de l'infection pourrait apporter des éléments de compréhension de phénomènes spécifiquement liés à l'infection par ZIKV. Parmi ces phénomènes, les cas de syndromes neurologiques post partum 6 à 18 mois après infection (Aragao et al., 2017) et la persistance de ZIKV dans les tissus

reproducteurs (cellule de sertoli, spermatozoïdes) (Matheron et al., 2016; Kumar et al., 2018) sont évocateurs d'un défaut d'élimination du virus qui se maintiendrait dans l'organisme sur de longues périodes. Ils suggèrent des défauts de résolution de l'infection en phase aiguë dont une des causes pourrait être des défauts d'apoptose. Il est probable que le retard de l'apoptose soit plus ou moins marqué selon les types cellulaires infectés, mais qu'il favoriserait dans certaines niches l'échappement du virus aux mécanismes de clairance virale. De plus, les données biologiques qui rapportent une augmentation des niveaux de Bcl-2 dans les cerveaux microcéphaliques de nouveaux nés exposés au ZIKV, comparés à des microcéphalies indépendantes de ZIKV pourraient suggérer que les syndromes congénitaux associés à Zika sont plutôt une conséquence d'un défaut que d'un excès d'apoptose (Sousa et al., 2018).

Après avoir mis en évidence cet effet 'protecteur' de ZIKV vis à vis de l'apoptose, il était nécessaire d'explorer les voies qui conduisent les cellules infectées à entrer en apoptose, en particulier avec l'objectif de comprendre à quels niveaux le virus agit et interfère avec cette réponse cellulaire. La manipulation de l'apoptose par les protéines non structurales de ZIKV qui aboutit à une stabilisation de Bcl-2 et à un maintien durable d'un statut anti-apoptotique dans les cellules peut résulter de plusieurs mécanismes. Nous avons remarqué qu'une bande atypique revenait souvent lorsqu'on recherchait par immunoblots la protéine Bcl-2 dans les extraits de cellules infectées par ZIKV (**Figure 29A**). Ce signal à 56 KDa correspondrait à une protéine Bcl-2 additionnée de quatre ubiquitines qui est une forme de Bcl-2 qui a déjà été décrite dans la littérature (Dimmeler et al., 1999). La persistance du signal de Bcl-2 ubiquitinylé indiquerait un adressage au protéasome qui n'aboutit pas à la dégradation de la protéine. J'ai ainsi pu apporter des données expérimentales complémentaires qui montrent

que les protéines ubiquitinylées s'accumulent dans les cellules infectées et traitées au TNF α comparées aux cellules traitées au TNF α seul (**figure 29B**). Cette observation suggère que l'activité de dégradation des protéines par le protéasome serait impactée au cours de l'infection. Une réduction du turn-over global des protéines pourrait favoriser la stabilité de la protéine Bcl-2, ce qui prolongerait sa fonction cytoprotectrice.



Dans le sens de cette possible inhibition de l'activité du protéasome, des travaux ont mis en évidence un recrutement de déubiquitinasés comme USP8 dans les cellules infectées par ZIKV. Les auteurs suggèrent que l'activité accrue de ces déubiquitinasés réduirait la dégradation de certaines protéines de l'hôte comme la caspase 1 et limiterait la réponse IFN via cGAS (Zheng et al., 2018). Il n'est pas non plus exclu que l'infection conduise à une

déphosphorylation de Bcl-2 susceptible d'augmenter sa demi-vie comme décrit dans le cas de cellules tumorales réfractaires à l'apoptose (Simizu et al., 2004).

Afin d'explorer les voies qui conduisent les cellules infectées à entrer en apoptose et pour comprendre à quels niveaux le virus agit, je me suis ensuite intéressé au rôle que le stress du RE pourrait jouer au cours de l'interaction du virus ZIKV avec ses cellules hôtes.

La saturation protéique du RE lors de la phase de réplication virale est un des stress majeurs que subit la cellule infectée et qui la conduit à s'autodétruire face à un retour impossible de son homéostasie. La réponse UPR lors de l'infection par *Flavivirus* à déjà été décrite comme induisant la mort cellulaire par apoptose. La suite de mes travaux s'est donc orientée sur le rôle de l'UPR lors de l'infection par ZIKV.

B. Manipulation de la réponse UPR par le virus Zika (Article 2)

1. La réponse UPR lors de l'infection par ZIKV

Lors d'une infection par un *Flavivirus*, et notamment par ZIKV, l'ARN génomique viral est traduit au niveau du réticulum endoplasmique. La synthèse des protéines virales génère des invaginations locales de la membrane du RE où les complexes de réplication se mettent en place (Cortese et al., 2017). La multiplication de ces chaînes de production de virus, qui s'ajoutent à une synthèse protéique accrue, entraînent un engorgement de l'organite dont la distorsion et l'augmentation de volume sont parfaitement visibles en microscopie à fluorescence. Le réticulum est alors sujet à un stress qui produit une signalisation destinée à mettre en œuvre des réponses adaptatives à cette situation. La réponse cellulaire aux protéines mal repliées et accumulées dans le RE est transduite par trois voies de signalisation impliquant respectivement PERK, ATF6 et IRE1 qui, selon l'état du stress, i) régulent la charge en protéines néosynthétisées, grâce à une réduction de la traduction via la phosphorylation de eIF2 α ii) favorisent l'élongation endomembranaire, la synthèse lipidique et augmentent la synthèse de protéines chaperonnes telles que GRP78 et GRP94; iii) promeuvent l'ERAD. Dans le cas d'une résolution impossible, le stress persiste et mène généralement à la mort cellulaire. Un stress du RE persistant, une accumulation de protéines agrégées et une augmentation de la mortalité cellulaire peuvent conjointement conduire à des pathologies neurologiques en particulier si les réponses cellulaires adaptatives sont incontrôlées et/ou défectueuses dans le tissu nerveux. Il a ainsi été noté qu'un défaut de l'UPR avec une absence d'activation de la voie ATF6 et de GRP78/BiP conduit à une perte de la masse neuronale lors du développement (Luo et al., 2006). Plusieurs travaux ont

montré que l'infection par ZIKV entraîne un stress du RE et une réponse UPR associée (Gladwyn-Ng et al., 2018; Kolpikova et al., 2020, p. 1) et que cette réponse cellulaire à l'infection pourrait contribuer à la neuropathogénèse (Alfano et al., 2019). J'ai donc poursuivi mes recherches par une analyse des voies de transduction de l'UPR dans mon modèle *in cellulo*.

2. Contrôles de l'UPR par ZIKV dans les cellules A549

J'ai confirmé que ZIKV induit un stress du réticulum dans les cellules A549. Cependant, si nous avons effectivement observé que les voies PERK et IRE1 étaient activées en réponse au stress, avec l'augmentation de l'expression transcriptionnelle de CHOP et l'épissage alternatif de XBP1, en revanche la voie ATF6 ne semblait pas active, avec un niveau d'expression de la chaperonne GRP78/BiP semblable à celui des cellules contrôles non infectées. Nous avons alors évalué l'activité de la voie ATF6 dans un double contexte d'induction du stress du RE, par l'infection par ZIKV d'une part et en ajoutant des inducteurs pharmacologiques comme la tunicamycine d'autre part. Nous avons alors montré que le niveau protéique de GRP78/BiP est significativement moindre si on induit un stress du RE dans des cellules déjà infectées par ZIKV, en comparaison avec des cellules uniquement traitées avec la tunicamycine. Symétriquement, la progénie virale s'est retrouvée réduite en présence d'inducteurs pharmacologiques de stress du RE. Ces données suggèrent fortement que ZIKV a la capacité de moduler la réponse UPR en inhibant la voie ATF6 et qu'une UPR entièrement fonctionnelle lui est défavorable (**article 2**).



Zika virus subversion of chaperone GRP78/BiP expression in A549 cells during UPR activation



Jonathan Turpin¹, Etienne Frumence¹, Wissal Harrabi, Juliano G. Haddad, Chaker El Kalamouni, Philippe Després, Pascale Krejbich-Trotot^{**}, Wildriss Viranaïcken^{*}

Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, PIMIT, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Plateforme CYROI, 2, Rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 February 2020
Received in revised form
22 May 2020
Accepted 22 May 2020
Available online 25 May 2020

Keywords:

Zika virus
Unfolded protein response
Persistent ER stress
Viral growth

ABSTRACT

Flaviviruses replicate in membranous factories associated with the endoplasmic reticulum (ER). Significant levels of flavivirus polyprotein integration contribute to ER stress and the host cell may exhibit an Unfolded Protein Response (UPR) to this protein accumulation, stimulating appropriate cellular responses such as adaptation, autophagy or cell death. These different stress responses support other antiviral strategies initiated by infected cells and can help to overcome viral infection. In epithelial A549 cells, a model currently used to study the flavivirus infection cycle and the host cell responses, all three pathways leading to UPR are activated during infection by Dengue virus (DENV), Yellow Fever virus (YFV) or West Nile virus (WNV). In the present study, we investigated the capacity of ZIKA virus (ZIKV) to induce ER stress in A549 cells. We observed that the cells respond to ZIKV infection by implementing an UPR through activation of the IRE1 and PERK pathway without activation of the ATF6 branch. By modulating the ER stress response, we found that UPR inducers significantly inhibit ZIKV replication. Interestingly, our findings provide evidence that ZIKV could manipulate the UPR to escape this host cell defence system by downregulating GRP78/BiP expression. This subversion of GRP78 expression could lead to unresolved and persistent ER stress which can be a benefit for virus growth.

© 2020 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

ZIKA virus (ZIKV) is a pathogenic single-stranded RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family together with DENV, WNV and JEV. Among the pathogenic flaviviruses, ZIKV has gained notoriety in the last ten years, due to explosive outbreaks and serious clinical concerns. Neurological complications have been described, including Guillain-Barré syndrome (GBS) and congenital malformations, prompting specific vigilance for pregnant women in the event of a Zika epidemic [1,2]. Due to these atypical clinical manifestations, the ability of ZIKV to be transmitted sexually in addition to being vector-borne, and the evidence of its persistence in some tissues, increasing numbers of molecular and cellular studies had

focused on specific ZIKV-host interactions that distinguish it from other flaviviruses. Similar to other flaviviruses, ZIKV replication occurs in Endoplasmic Reticulum (ER) invaginations of infected cells and leads to an accumulation of viral proteins [3–5]. Genome translation is followed by proteolytic cleavage of a polyprotein incorporated into the ER into three structural (C, M, and E) and seven non-structural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS) viral proteins. The ER is thus an essential cellular compartment for the completion of the viral cycle, in addition to several key mechanisms in cell physiology. The standard function of the ER is to regulate folding and post-translational modification of proteins that are to be transported within the cell, or secreted. The correct folding of proteins depends on the N-linked protein glycosylation, the oxidative environment in the ER lumen which promotes the formation of disulfide bonds, and the presence of several Ca^{2+} -dependent molecular chaperones (calreticulin, GRP78 also named BiP and GRP94) which stabilize protein folding intermediates [6,7]. ER homeostasis can be perturbed in the case of glucose starvation, hypoxia, calcium dysregulation or following a protein accumulation

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: pascale.krebich@univ-reunion.fr (P. Krejbich-Trotot), wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr (W. Viranaïcken).

¹ Contribute equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.011>

0300-9084/© 2020 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

which will in turn provoke ER stress. The Unfolded Protein Response (UPR) is activated in response to ER stress, in an attempt to restore ER homeostasis. In cells infected by a virus, the huge and sudden accumulation of viral proteins that are processed in the ER usually results in ER stress and the induction of the UPR. This cell response has been shown to be involved in several modes of cell defence, i.e. antiviral programs, immune responses [8,9] and commitment in autophagy or cell suicide [10,11]. During ER stress, the folding chaperone GRP78/BiP dissociates from three ER-resident transmembrane proteins i.e. PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1) and activating transcription factor 6 (ATF6) [12]. Each of these proteins acts as a stress transducer in independent pathways devoted to stress resolution. The activated kinase activity of PERK results in phosphorylation of eIF2 α , followed by a transitory translational attenuation and consequently reduced ER influx of newly synthesized proteins. The endonuclease activity of activated IRE1 produces a spliced form of the x-box binding protein 1 (xbp1) transcript. This spliced xbp1 encodes a transcription factor that promotes the expression of genes coding for several factors aimed at resolving ER stress. ATF6 can egress from the ER to the Golgi apparatus for maturation by S1P or S2P cleavage to generate ATF6f. ATF6f acts in the nucleus where it regulates UPR target gene expression. The transcriptional activity of ATF6 and Xbp1 leads to increased expression of chaperones and proteins implicated in enhanced folding capacity or in ER-associated protein degradation (ERAD). In spite of the implementation of an UPR with these adaptive mechanisms, an excessive, unresolved or prolonged ER stress will result in cellular autophagy or apoptosis [13]. Crosstalk between ER stress, UPR, autophagy and apoptosis pathways are of particular importance in the case of virally infected cells since each of these responses will influence the infected cell's health and contribute to determining the efficacy of viral replication and spread.

It has previously been shown that ZIKV has the ability to initiate a UPR response to ER stress in several cell types (Table S1) [14–18] and that infection is accompanied by morphological modification of cellular organelles [19]. However, it is important to decipher how ER stress initiation is mediated, which branches of the UPR pathways are involved and how pathway crosstalk is mediated during cellular and ER responses to ZIKV infection. In epithelial A549 cells, a widely *in vitro* used cell line to characterize cell responses to flavivirus infection (DENV, WNV, JEV), all three branches of the UPR are activated (PERK, ATF6 and IRE1) and associated with enhanced GRP78/BiP expression [20–23]. In this present work, we followed ER stress and the UPR in A549 cells in order to identify mechanisms that could be specific to ZIKV infection and that may lead to new “*in cellulo*” approaches for understanding clinical outcomes. Imaging of infected A549 cells shows a morphological change typical of ER stress. When we looked at the stress transduction mechanisms, we discovered that the UPR was initiated by the host cell but with no induction of GRP78 expression. This was unexpected regarding previous observations with other flaviviruses including DENV, JEV and WNV [21,23,24]. Considering that UPR pre-activation can limit ZIKV infectious capacity [9], we hypothesized that a partial or impaired UPR could be beneficial for the virus and showed that exogenously-induced UPR was also detrimental to ZIKV at the post entry step. ZIKV would thus have the ability to modulate UPR to its benefits with a mechanism that remains to be discovered.

2. Materials and methods

2.1. Virus, cell culture, antibodies and reagents

The clinical isolate PF-25013-18 (PF13) of ZIKV [25] was used for all infections. A549 cells (ATCC, CCL-185) were cultured at 37 °C

under a 5% CO₂ atmosphere in MEM medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS). Plaque assays were used for viral progeny quantification as described previously [26]. Cellular damages were evaluated measuring a released lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture supernatants resulting from a plasma membrane rupture. Supernatants of infected cells were collected and subjected to a cytotoxicity assay, performed using CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega) according to manufacturer's instructions. Absorbance of converted dye was measured at 490 nm using a microplate reader (Tecan).

Immunodetection of the viral proteins was performed using the mouse anti-pan flavivirus envelope E protein mAb 4G2, produced by RD Biotech, or with the rat anti-EDIII ZIKV which was described previously [27]. The rabbit anti-Calnexin antibody was purchased from Santa-Cruz Biotechnology (Clinisciences, Nanterre, France). Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 594 IgG antibodies were from Invitrogen (ThermoFisher, Les Ulis, France). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (ab97051) and anti-mouse (ab6789) antibodies were from Abcam (Cambridge, UK). The antibody against GRP78/BiP (#3177) was from cell Signalling Technology (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France). Thapsigargin (TG), an endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase inhibitor and Tunicamycin (TM) an inhibitor of N-glycosylation were used to induce ER stress and UPR respectively at 1 μ M and 2 μ g mL⁻¹ for the indicated time in figure legends. These inhibitors were from Sigma-aldrich (Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France).

2.2. Luciferase reporter assay

Plasmids with GRP94 and GRP78 promoters upstream of F-Luc (pGRP78-Luc and pGRP94-Luc) were provided by Dr. Kazutoshi Mori [28]. One million cells were transfected with the indicated plasmids using Lipofectamine 3000 according to manufacturer instructions (Invitrogen, ThermoFisher, Les Ulis, France), incubated for 12 h and then divided into three separate flasks. The first flask was mock treated, the second was infected with ZIKV PF13 at an MOI of 5 for 24 h and the third was treated with thapsigargin (1 μ M) for 6 h. Luciferase activities were measured using the Luciferase Glo™ assay according to manufacturer's instructions (Promega, Madison, USA).

2.3. Western blot

Cells were grown on 6 well plates at 3.10⁶ cells/well and infected and/or treated with UPR inducer for the indicated time. Then, the cells were washed with PBS and lysed with 300 μ L of Radio-immunoprecipitation assay buffer RIPA buffer (Sigma-aldrich Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France). Total cell extracts were proceeded for western blot as before [27,29].

2.4. Immunofluorescence

A549 cells were grown, infected or treated on glass coverslips. They were further fixed with 3.7% formaldehyde at room temperature for 10 min. Fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. Coverslips were incubated with primary antibodies (1:1000 dilution) in 1x PBS 1% BSA for 2 h and with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000, Invitrogen) for 1 h. Nucleus morphology was revealed by DAPI staining. The coverslips were mounted with VECTASHIELD® (Clinisciences, Nanterre, France) and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope. Images were captured and processed using a Hamamatsu ORCA2 ER camera and the imaging software NIS-Element AR (Nikon, Tokyo, Japan).

2.5. RT-PCR

Semi quantitative RT-PCR and real time qPCR experiments were performed as before [22]. Primers used for RT-PCR were CHOP: F 5'-GCACCTCCAGAGCCCTCACTCTCC-3', R 5'-GTCTACTCAAGCCTTCCCTCGC-3'; GRP78: F 5'-CATCAGCCGCTCTATGTGC-3', R 5'-CGTCAAGACCGTGTCTCG-3'; XBP1: F 5'-CCTTGTAGTTGA-GAACCAGG-3', R 5'-GGGGCTTGGTATATGTGG-3'; NS1: F 5'-AGAGGACCATCTCTGAGATC-3', R 5'-GGCCTTATCTCCATCCATACC-3'; GAPDH: F 5'-GGGAGCCAAAGGGTCATCA-3', R 5'-TGATGG-CATGGACTGTGGTC-3'. ZIKV-E: F 5'-GTCTTGAACATGGAGG-3', R 5'-TTCACCTTGTGTGGGC-3'.

For semi quantitative RT-PCR, PCR products were analyzed on a 1.5% agarose gel electrophoresis and stained as described before [25].

For Real time, Total RNA including genomic viral RNA was extracted from cells with RNeasy kit (Qiagen) and reverse transcribed using E reverse primer and M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) at 42 °C for 50 min. Quantitative PCR was performed on a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Briefly, cDNA was amplified using 0.2 μM of each primer and GoTaq Master Mix (Promega, Charbonnières-les-bains, France). For each single-well amplification reaction, a threshold cycle (Ct) was calculated using the CFX96 program (Bio-Rad, Life Science, Marnes-la-Coquette, France) in the exponential phase of amplification. A synthetic gene coding for nucleotides 954 to 1306 of the MR766 strain (GenBank: LC002520) cloned in the pUC57 plasmid was used as template to generate a standard curve, which then served to make absolute quantitation of viral RNA copies in infected cells.

2.6. Statistical analysis

All values are expressed as mean ± SD of at least three independent experiments, as indicated in the figure legends. After normality tests, comparisons between different treatments were analyzed using a one-way ANOVA. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant for a post-hoc Tukey's test. All statistical tests were done using the software Graph-Pad Prism version 7.01.

3. Results and discussion

A549 epithelial cells have been shown to be permissive to infection by most flaviviruses [25,30] and are a suitable model for studying *in cellulo* host-virus interactions. Many research teams, including ours, have used this epithelial cell line to characterize ZIKV infection with different strains of the epidemic (clinical isolate PF13, molecular clone BR15) and historical (MR766) ZIKV, deciphering viral entry pathways, viral replication kinetics [31] and cellular responses such as apoptosis [32]. As protein load increases in cells replicating the virus, resulting in the accumulation of misfolded or partially processed viral polyproteins and ER stress, we investigated markers of ER stress and the contribution of the Unfolded Protein Response during the course of ZIKV infection.

3.1. ZIKV infection induces ER morphological changes

When stressed, the ER exhibits morphological abnormalities with luminal swelling and membrane expansion [33]. These morphological changes can be observed by fluorescence microscopy. When we compared Calnexin expression, a standard ER marker, between A549 cells infected for 48 h with the epidemic strain of ZIKV (PF13) and control (mock infected cells), we noticed morphological shape changes of the ER with obvious swelling and

increased calnexin staining (Fig. 1). Imaging of the infected cells also showed the colocalization of immunodetected viral envelope protein (E-ZIKV) and calnexin, confirming that viral proteins are present in the enlarged and globe-shaped compartment of an expanding ER (Fig. 1).

3.2. Unfolded Protein Response during ZIKV infection in A549 cells

Upon ER stress, cells initiate an UPR to prevent persistent damage due to stress and to restore ER homeostasis. In order to decipher the stress transduction mechanisms induced upon ZIKV infection in A549 cells, we analyzed each of the three main UPR pathways. For this purpose, we investigated the expression level of target genes specific to each activated branch.

3.2.1. Effect of ZIKV infection on PERK and IRE1 pathways of UPR

Activation of the PERK pathway results in eIF2α phosphorylation which is followed by a reduced translation rate. It also leads to ATF4 upregulation. ATF4 is a transcription factor acting on several targets among which is the C/EBP homologous protein (CHOP) encoding gene. CHOP factor plays a key role in stress resolution and in relationships between UPR, cell survival or cell death. We therefore followed activation of this PERK/ATF4 branch by a measure of the expression level of the CHOP gene by RT-PCR (Fig. 2A). Effective upregulation of CHOP at the transcriptional level suggests that the PERK branch of UPR was activated during ZIKV infection of A549 cells. This observation is in agreement with previous findings in ZIKV infected human neural stem cells [14].

The IRE1 pathway is characterized by the splicing of the Xbp1-transcript. The spliced Xbp1 (s-Xbp1) encodes a transcription factor able to transactivate genes mainly involved in ERAD. Splicing of Xbp1 was then followed by RT-PCR as an indicator of IRE1 branch activation. s-Xbp1 was detected upon ZIKV infection like in cells treated with thapsigargin (TG), an endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase inhibitor that is an ER stress and UPR inducer (Fig. 2A). The observation of IRE branch activation by ZIKV was also in accordance with previous findings [10].

3.2.2. Effect of ZIKV infection on ATF6 branch of UPR

The third branch of the UPR is mediated by the maturation of ATF6 upon S1P or S2P processing in the Golgi apparatus. Once translocated to the nucleus, mature ATF6 upregulates the expression of chaperone encoding genes like GRP78 (Bip) and GRP94. Increased levels of these chaperones, involved in the refolding of proteins, plays a crucial role in the resolution of ER stress. Unlike thapsigargin treatment of A549 cells, RT-PCR results revealed that grp78 was not upregulated at the transcriptional level during ZIKV infection (Fig. 2A). This observation is potentially important as it could be one of the specific interactions of ZIKV that differentiates it from other flaviviruses. Indeed, until now, studies of the UPR response to flavivirus infections, such as for DENV, report the ability of the infected cells to induce grp78 transcription in this A549 model [22].

We further investigated this lack of GRP78 upregulation by two approaches. We first checked the GRP78 protein levels by western blot in cells that were infected for 48 h at increasing ZIKV MOI (1, 5 and 10). No modulation of GRP78 expression could be detected under any of these conditions (Fig. 2B).

In a second approach, we monitored chaperone induction using luciferase reporter constructs during ZIKV infection. We transfected A549 cells with plasmids encoding a F-Luc reporter gene downstream of grp78 or grp94 promoter. These two promoters contain the ER stress response element (ERSE) which is transactivated by ATF6. Thapsigargin induced expression of the F-Luc reporter gene under control of ERSE for both grp78 and grp94 constructs. This

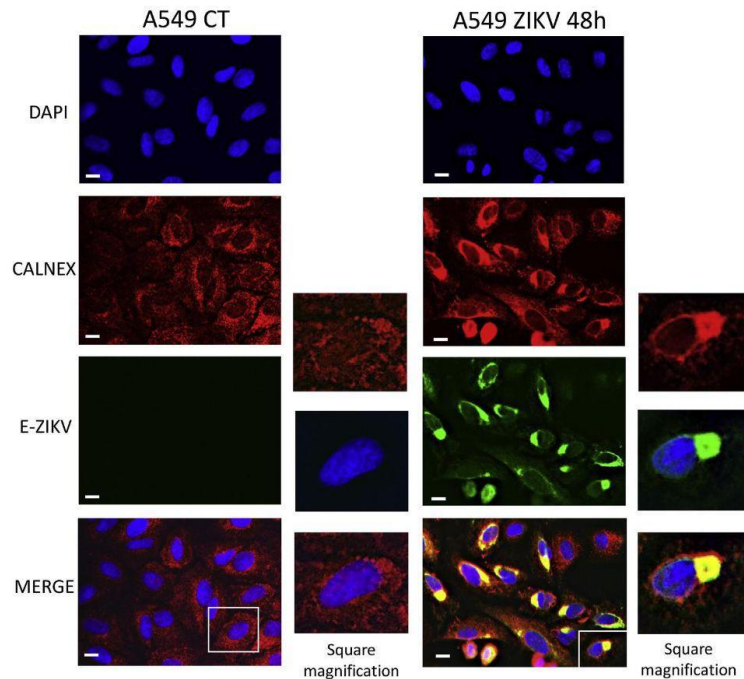


Fig. 1. ER morphological features during ZIKV infection. A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 1 for 48 h. Cells were immunostained for calnexin and E-ZIKV. Scale bar: 5 μ m. Right panel series show magnified details of a selected cell from the x200 microscopic field (white square). All experiments were representative of three independent experiments.

was not the case after ZIKV infection (Fig. 2C).

Together these results suggest that ZIKV infection provides a partial transduction of the ER stress with activation of the PERK/ATF4 and IRE1 pathways of the UPR but without any involvement of ATF6. Incomplete or delayed re-folding chaperone induction due to this missing branch of UPR could impact the adaptive response and lead to persistent ER stress. This could also interplay with programmed cell death by signaling pathways downstream of PERK activation with CHOP-mediated regulation of proteins involved in apoptosis like BIM, Bcl-2 and PUMA [34].

3.3. ZIKV controls the UPR pathway to promote viral growth

3.3.1. Activation of the UPR-dependent signaling pathway influences viral growth

ER stress can be induced by the action of tunicamycin (TM), an inhibitor of N-glycosylation. The resulting UPR can be qualified as 'standard' with activation of the PERK, IRE1 and ATF6 pathways [35,36]. To assess the effect of exogenous activation of UPR on ZIKV infection, we added this inducer to infected cells 2 h after ZIKV inoculation. Cells were harvested and cell culture supernatant collected after 16 h of treatment with TM.

We showed that TM treatment during the ZIKV infection of A549 cells was able to significantly inhibit the virus replication. Reduced amounts of viral RNA were related to tunicamycin concentration (Fig. 3A). We then confirmed that UPR induction with Tunicamycin impaired viral progeny production by at least 1 log as

compared to mock-treated cells (Fig. 3B). As expected, the TM-mediated inhibition of viral growth was associated to a lower expression level of ZIKV E protein in a TM dose-dependent manner (Fig. 3C). To exclude the possibility that antiviral effect of TM was related to cell death upon infection or treatment, the amount of released LDH was measured in cell culture supernatants (Fig. 3B). Using thapsigargin (TG), a UPR inducer that works by alteration of Ca^{2+} homeostasis, or dithiothreitol (DTT), a UPR inducer that works by blocking disulfide bond formation, incubated with infected cells for 16 h, 2 h after ZIKV inoculation, we observed the same inhibition of ZIKV infection (Fig. S1). These observations suggest that a 'standard' UPR has the ability to interfere with ZIKV replication efficiency, independently of the nature of the UPR inducer and even after the post-entry step. This result complements previous findings that pre-activating the UPR response decreases flavivirus titers [9]. However, in the mentioned study, the antiviral effect of the UPR relied on an early activation, by priming an IFN regulatory factor 3-dependent innate immune signaling. In our case, since the UPR inducer is added 2 h after virus addition, the mechanism that limits infection should be different and exerted on a virus cycle already in progress.

3.3.2. The UPR-dependent activation of GRP78/BiP is counterbalanced by ZIKV

Given that ZIKV infection of A549 cells causes ER-stress leading to UPR activation without ATF6 branch activation nor GRP78/BiP chaperone expression, we asked whether ZIKV counteracts the UPR

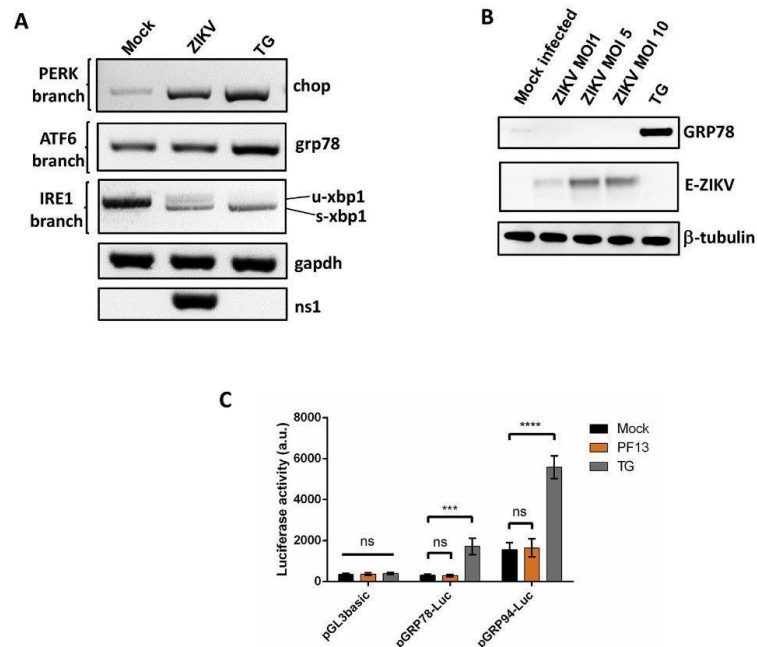


Fig. 2. UPR branch activation during ZIKV infection. (A) A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 1 for 24 h. RT-PCR were performed to monitor transcriptional regulation of downstream gene targets of the UPR branch, chop (PERK branch), xbp1 splicing (IRE1 branch) and grp78 (ATF6 branch). u-xbp1 correspond to unspliced xbp1 and s-xbp1 to spliced Xbp1. (B) A549 cells infected with ZIKV at indicated MOI for 48 h were lysed in buffer A, total protein extracts, under reducing conditions were immuno-blotted for E-ZIKV with EDIII antibody, GRP78 and β -tubulin as a loading control. (C) A549 cells (1×10^6 cells) were transfected with the indicated reporter constructs. After 12 h, transfected cells were plated at a density of 3×10^4 cells per well and infected with ZIKV at MOI of 5. Luciferase activities were measured 24 h post infection. Degrees of significance are indicated in the figure captions as follow: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, ns = not significant. For all experiments Thapsigargin-ER stress induced (TG) were used as positive control at $1 \mu\text{M}$ for 6 h. RT-PCR and western blot experiments were representative of three independent experiments.

pathway to promote viral replication. To investigate this issue, ZIKV-infected cells were incubated with TG for 4 h and cell lysates were examined for GRP78 expression by Western blot (Fig. 3D). As it has been observed with TM, a short treatment with TG resulted in a dramatic reduction in the expression level of ZIKV E protein. This confirms that ZIKV replication is affected by UPR activation in A549 cells. We noted that GRP78 expression was undetectable in A549 cells infected with ZIKV as above (Fig. 3D). In contrast to what it has been observed when A549 cells were incubated with TG, TG treatment resulted in a minor change on GRP78 protein expression in cells in which ZIKV replication has been initiated (Fig. 3D). Taken together these results would suggest that ZIKV has developed a capacity to control the UPR pathway to its own benefit with a downregulation of GRP78/BiP expression.

4. Conclusions

Our study showed that ZIKV infection of epithelial A549 cells could trigger ER stress. We confirmed the activation of the UPR in this cell model but found that, unlike other flaviviruses [37], ZIKV does not activate all three branches of the UPR stress response. In addition, we found that the UPR can affect ZIKV cellular replication efficiency, but that ZIKV can interfere with the UPR achievement by modulating GRP78 expression. Therefore, we hypothesize that persistent ER stress is induced by ZIKV infection and exploited by

the virus to increase its replication that would otherwise be controlled by UPR induction.

Author contributions

Conceptualization, W.V., P.K.-T.; methodology, J.T., E.F., W.V., P.K.-T.; validation, J.T., E.F., W.V., P.K.-T.; formal analysis, J.T., E.F., W.H., J.-G.H., C.E.K., P.D., W.V., P.K.-T.; investigation, J.T., E.F., W.H., J.-G.H., C.E.K., W.V., P.K.-T.; resources, P.D., W.V., P.K.-T.; data curation, J.T., E.F., P.D., W.V., P.K.-T.; writing—original draft preparation, J.T., E.F., P.D., W.V., P.K.-T.; writing—review and editing, J.T., E.F., P.D., W.V., P.K.-T.; visualization, W.V., P.K.-T.; supervision, W.V., P.K.-T.; project administration, P.D., W.V., P.K.-T.; funding acquisition, P.D.

Funding

This work was supported by the ZIKAlert project (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0001902). E.F. holds a fellowship from the Regional Council of Reunion Island (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0012406). J.T. has a PhD degree scholarship from La Réunion Island University (Ecole Doctorale STS), funded by the French ministry MEESR. J.-G.H. received funding from the ZIKAlert program.

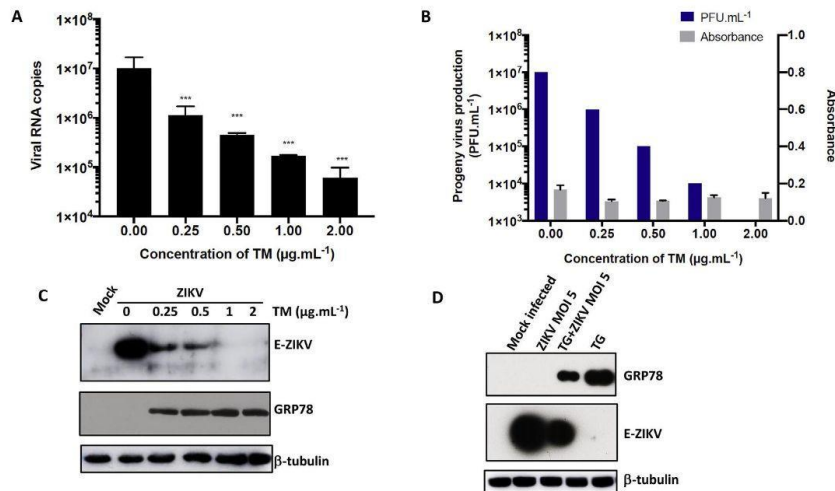


Fig. 3. Crosstalk between UPR and ZIKV during infection. (A) A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 5 for 18 h. 2 h post-infection tunicamycin (TM) was added at the indicated concentration. After RNA extraction, qRT-PCR were realized to quantify viral genomic RNA copies. (B) Viral progeny production in cell culture supernatants of cells infected and treated with TM were determined by PFU assay (left axis). (C) Total protein extract under reducing conditions were immuno-blotted for E-ZIKV with EDIII antibody. GRP78 and β -tubulin as a loading control. Cell mortality was evaluated through LDH release and absorbance measurement (right axis). (D) A549 cells were infected or not with ZIKV for 16 h at MOI of 5, followed by 4 h treatment with TG at 1 μ M. Western blot were performed on total extract as in (A). All results were representative of three independent experiments.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank the members of PIMIT and DÉTROIT laboratories for helpful discussions. We are grateful to Dr. Steeve Bourane and Dr. David A. Wilkinson for the critical review and improvements made to the use of the English language throughout the text. Also, Dr. Kazutoshi Mori, from Kyoto University, for providing us pGRP78-Luc and pGRP94-Luc plasmids.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biuchi.2020.05.011>.

References

- [1] Z. Wen, H. Song, G. Ming, How does Zika virus cause microcephaly? *Genes Dev.* 31 (2017) 849–861, <https://doi.org/10.1101/gad.298216.117>.
- [2] J. Miranda, D. Martín-Tapia, Y. Valdespino-Vázquez, L. Alarcón, A. Espejel-Núñez, M. Guzmán-Huerta, J.E. Muñoz-Medina, M. Shibayama, B. Chávez-Munguía, G. Estrada-Gutiérrez, S. Lievano, J.E. Ludert, L. González-Mariscal, Syncytiotrophoblast of placenta from women with Zika virus infection has altered tight junction protein expression and increased paracellular permeability, *Cells* 8 (2019) 1174, <https://doi.org/10.3390/cells8101174>.
- [3] M. Cortese, S. Goellner, E.G. Acosta, C.J. Neufeldt, O. Oleksiuk, M. Lampe, U. Haselmann, C. Funaya, N. Schieber, P. Ronchi, M. Schorb, P. Pruunsild, Y. Schwab, L. Chatel-Chaix, A. Ruggieri, R. Bartenschlager, Ultrastructural characterization of Zika virus replication factories, *Cell Rep.* 18 (2017) 2113–2123, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>.
- [4] L. Miorin, I. Romero-Brey, P. Maiuri, S. Hoppe, J. Krijnse-Locker, R. Bartenschlager, A. Marcello, Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA, *J. Virol.* 87 (2013) 6469–6481, <https://doi.org/10.1128/JVI.03456-12>.
- [5] I. Romero-Brey, R. Bartenschlager, Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses, *Viruses* 6 (2014) 2826–2857, <https://doi.org/10.3390/v6072826>.
- [6] Z. Sun, J.L. Brodsky, Protein quality control in the secretory pathway, *J. Cell Biol.* (2019), <https://doi.org/10.1083/jcb.201906047>.
- [7] L.M. Hendershot, The ER function BiP is a master regulator of ER function, *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 71 (2004) 289–297.
- [8] J.A. Smith, A new paradigm: innate immune sensing of viruses via the unfolded protein response, *Front. Microbiol.* 5 (2014), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00222>.
- [9] T. Carletti, M.K. Zakaria, V. Faoro, L. Reale, Y. Kazungu, D. Licastro, A. Marcello, Viral priming of cell intrinsic innate antiviral signaling by the unfolded protein response, *Nat. Commun.* 10 (2019) 3889, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11663-2>.
- [10] A.-B. Blázquez, E. Escribano-Romero, T. Merino-Ramos, J.-C. Saiz, M.A. Martín-Acebes, Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy, *Front. Microbiol.* 5 (2014), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00266>.
- [11] R. Sano, J.C. Reed, ER stress-induced cell death mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 3460–3470, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>.
- [12] B.M. Gardner, D. Pincus, K. Gotthardt, C.M. Gallagher, P. Walter, Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a013169, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013169>.
- [13] A. Almanza, A. Carlesso, C. Chinha, S. Creedican, D. Doultinos, B. Leuzzi, A. Luis, N. McCarthy, L. Montibeller, S. More, A. Papaioannou, F. Püschel, M.L. Sassano, J. Skoko, P. Agostinis, J. de Belleruche, L.A. Eriksson, S. Fulda, A.M. Gorman, S. Healy, A. Kozlov, C. Muñoz-Pinedo, M. Rehm, E. Chevet, A. Samali, Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications, *FEBS J.* 286 (2019) 241–278, <https://doi.org/10.1111/febs.14608>.
- [14] I. Gladwyn-Ng, L. Córdón-Barris, C. Alfano, C. Creppe, T. Couderc, G. Morelli, N. Thelen, M. America, B. Bessières, F. Encha-Razavi, M. Bonnière, I.K. Suzuki, M. Flamand, P. Vanderhaeghen, M. Thiry, M. Lecuit, L. Nguyen, Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly, *Nat. Neurosci.* 21 (2018) 63–71, <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0038-4>.
- [15] C. Alfano, I. Gladwyn-Ng, T. Couderc, M. Lecuit, L. Nguyen, The unfolded protein response: a key player in Zika virus-associated congenital microcephaly, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019) 94, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00094>.
- [16] S. Hou, A. Kumar, Z. Xu, A.M. Airo, I. Stryapunina, C.P. Wong, W. Branton, E. Tchesnokov, M. Götze, C. Power, T.C. Hobman, Zika virus hijacks stress granule proteins and modulates the host stress response, *J. Virol.* 91 (2017), <https://doi.org/10.1128/JVI.00474-17>.
- [17] R. Amorim, A. Temzi, B.D. Griffin, A.J. Moulard, Zika virus inhibits eIF2 α -dependent stress granule assembly, *PLoS Neglected Trop. Dis.* 11 (2017), e0005775, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005775>.

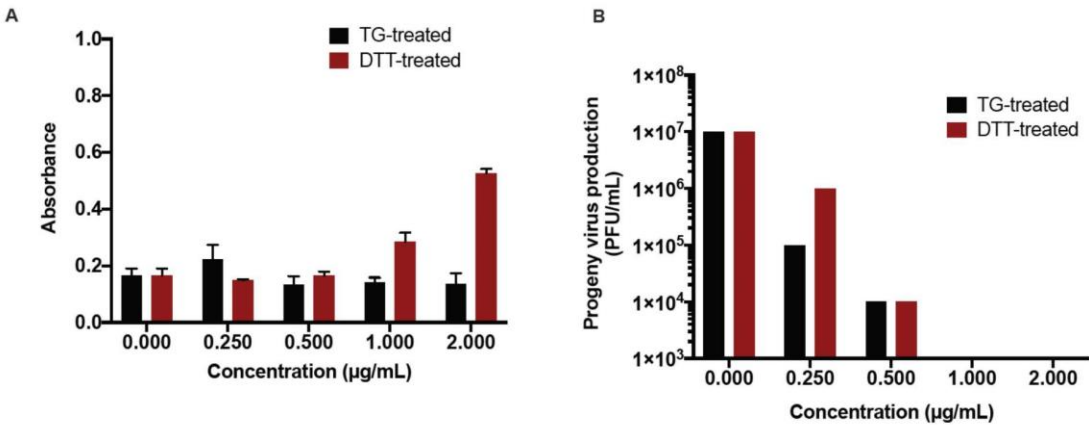
- [18] G. Bonenfant, N. Williams, R. Netband, M.C. Schwarz, M.J. Evans, C.T. Pagar, Zika virus subverts stress granules to promote and restrict viral gene expression, *J. Virol.* 93 (2019), <https://doi.org/10.1128/JVI.00520-19.e00520-19>.
- [19] B. Monel, A.A. Compton, T. Bruel, S. Amraoui, J. Burlaud-Gaillard, N. Roy, F. Guivel-Benhassine, F. Porrot, P. Génin, L. Meertens, L. Sinigaglia, N. Jouvenet, R. Weil, N. Casartelli, C. Demangel, E. Simon-Lorière, A. Moris, P. Roingeard, A. Amara, O. Schwartz, Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells, *EMBO J.* 36 (2017) 1653–1668, <https://doi.org/10.15252/embj.201695597>.
- [20] I. Umarreddy, O. Pluquet, Q.Y. Wang, S.G. Vasudevan, E. Chevet, F. Gu, *Virol. J.* 4 (2007) 91, <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-91>.
- [21] H.-L. Su, C.-L. Liao, Y.-L. Lin, Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response, *J. Virol.* 76 (2002) 4162–4171, <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4162-4171.2002>.
- [22] Y.-R. Lee, S.-H. Kuo, C.-Y. Lin, P.-J. Fu, Y.-S. Lin, T.-M. Yeh, H.-S. Liu, Dengue virus-induced ER stress is required for autophagy activation, viral replication, and pathogenesis both in vitro and in vivo, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–14, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18909-3>.
- [23] J. Peña, E. Harris, Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 14226–14236, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.222703>.
- [24] G.R. Medigeshi, A.M. Lancaster, A.J. Hirsch, T. Briese, W.I. Lipkin, V. DeFilippis, K. Früh, P.W. Mason, J. Nikolich-Zugich, J.A. Nelson, West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis, *J. Virol.* 81 (2007) 10849–10860, <https://doi.org/10.1128/JVI.01151-07>.
- [25] E. Frumence, M. Roche, P. Krejbich-Trotot, C. El-Kalamouni, B. Nativel, P. Rondeau, D. Missé, G. Gadea, W. Viranaicken, P. Desprès, The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction, *Virology* 493 (2016) 217–226, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.006>.
- [26] C. El Kalamouni, E. Frumence, S. Bos, J. Turpin, B. Nativel, W. Harrabi, D.A. Wilkinson, O. Meilhac, G. Gadea, P. Desprès, P. Krejbich-Trotot, W. Viranaicken, Subversion of the heme oxygenase-1 antiviral activity by Zika virus, *Viruses* 11 (2018), <https://doi.org/10.3390/v11010002>.
- [27] W. Viranaicken, B. Nativel, P. Krejbich-Trotot, W. Harrabi, S. Bos, C. El Kalamouni, M. Roche, G. Gadea, P. Desprès, ClearColi BL21(DE3)-based expression of Zika virus antigens illustrates a rapid method of antibody production against emerging pathogens, *Biochimie* 142 (2017) 179–182, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.011>.
- [28] J. ichi Nozaki, H. Kubota, H. Yoshida, M. Naitoh, J. Goji, T. Yoshinaga, K. Mori, A. Koizumi, K. Nagata, The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic β cells, *Gene Cell.* 9 (2004) 261–270, <https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00721.x>.
- [29] W. Viranaicken, L. Gasmi, A. Chaumet, C. Durieux, V. Georget, P. Denoulet, J.-C. Larcher, L-If3 and L-NF90 traffic to the nucleolus granular component: alternatively-spliced exon 3 encodes a nucleolar localization motif, *PLoS One* 6 (2011), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022296>.
- [30] J.L. Muñoz-Jordan, G.G. Sánchez-Burgos, M. Laurent-Rolle, A. García-Sastre, Inhibition of interferon signaling by dengue virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 14333–14338, <https://doi.org/10.1073/pnas.2335168100>.
- [31] S. Bos, W. Viranaicken, J. Turpin, C. El-Kalamouni, M. Roche, P. Krejbich-Trotot, P. Desprès, G. Gadea, The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells, *Virology* 516 (2018) 265–273, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.003>.
- [32] J. Turpin, E. Frumence, P. Desprès, W. Viranaicken, P. Krejbich-Trotot, The ZIKA virus delays cell death through the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, *Cells* 8 (2019) 1338, <https://doi.org/10.3390/cells8111338>.
- [33] A. Saito, K. Imaizumi, Unfolded protein response-dependent communication and contact among endoplasmic reticulum, mitochondria, and plasma membrane, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 3215, <https://doi.org/10.3390/ijms19103215>.
- [34] H. Urra, E. Dufey, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera, C. Hetz, When ER stress reaches a dead end, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Mol. Cell Res.* 1833 (2013) 3507–3517, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.024>.
- [35] C.M. Osowski, F. Urano, Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system, *Methods Enzymol.* 490 (2011) 71–92, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0>.
- [36] T. Okamoto, T. Suzuki, S. Kusakabe, M. Tokunaga, J. Hirano, Y. Miyata, Y. Matsuura, Regulation of apoptosis during flavivirus infection, *Viruses* 9 (2017), <https://doi.org/10.3390/v9090243>.

Supplemental data :

Table S1

Reference	Cell line/Organism	Virus	PERK activation	IRE1 activation	ATF6 activation
Gladwyn et al. 2017	hNSC/NMRI mice	ZIKV	+	+	- (data not shown)
Hou et al. 2017	HFA/HuH7/A549	ZIKV	+	+	nd
Bonenfant et al. 2019	HuH7	ZIKV	nd	nd	nd
Monel et al. 2017	HeLa	ZIKV	nd	nd	nd
Than Z. et al. 2018	AG6 mice	ZIKV	+	+	+
Than Z. et al. 2018	SK-N-SH/CCF-STTG1	ZIKV	+	+	-
Lee et al. 2018	HuH7/A549	DENV2	+	+	+
Umaredy et al. 2007	A549	DENV1/2	+	+	+
Pena J. et al. 2011	2FTGH	DENV2	+	+	+

Figure S1



3. Discussion de l'article 2

Bien que l'infection par ZIKV de notre modèle de cellules A549 génère un stress du RE, la réponse UPR n'est que partielle en raison d'un contrôle exercé par le virus. L'infection s'accompagne d'une activation des voies PERK et IRE1 mais pas de la voie ATF6, ce qui a été confirmé par ailleurs (Gladwyn-Ng et al., 2018) et ce, même en présence d'inducteurs pharmacologiques additionnels du stress du RE. Elle conduit à un défaut principal pour un retour à l'homéostasie du RE qui est l'absence de production de la chaperonne GRP78/BiP qui est un acteur essentiel pour la détection des protéines mal repliées et leur traitement.

Cette donnée est à nouveau essentielle pour apporter des éléments de compréhension des mécanismes physiopathologiques spécifiques à l'infection par ZIKV, en lien avec les effets possibles produits par une réponse UPR incomplète. Celle-ci est en effet susceptible de favoriser un stress persistant avec des protéines mal repliées accumulées, assorti d'une augmentation possible de la mortalité cellulaire. De plus la présence de GRP78 a été montrée comme indispensable pour la prévention de la mort cellulaire de cellules embryonnaires pluripotentes du système nerveux, son absence conduisant à une perte substantielle de la masse nerveuse corticale lors du développement (Mimura et al., 2008; Baek et al., 2019).

Des travaux publiés en 2020 et 2021 semblent contredire nos observations et conclusions sur la subversion de GRP78/BiP par ZIKV. Ils montrent que la chaperonne GRP78/BiP serait au contraire augmentée en contexte infectieux et que son activité serait provirale. L'effet favorisant serait dû à une capacité infectieuse facilitée par des GRP78 localisées au niveau de la membrane plasmique (Khongwichit et al., 2021). L'hypothèse est soutenue par l'utilisation de siRNA qui en inhibant GRP78 aboutissent à une diminution de la production

virale. La réduction des capacités infectieuses de ZIKV serait attribuée à un retard dans le processus d'entrée du virus dans les cellules (Royle et al., 2020; Khongwichit et al., 2021). Nous pensons que leurs observations divergent des nôtres car ils se placent dans des conditions où leurs cellules sont préalablement stressées avant l'infection. Ils ne constatent donc aucun effet de ZIKV sur le contrôle d'une UPR déjà installée ce qui diffère de nos conditions pour lesquelles l'UPR est induite postérieurement à l'addition du virus. D'autres travaux confortent à l'inverse nos conclusions en mettant en évidence le rôle d'ATF6 dans l'infection par DENV ou ZIKV, en montrant entre autres que l'activation artificielle d'ATF6 réduit significativement le titre viral (Almasy et al., 2021).

Concernant l'apport de nos observations pour la compréhension des mécanismes neuro-physiopathologiques spécifiques à l'infection par ZIKV, il est intéressant de constater que les microcéphalies génétiquement acquises présentent certaines mutations affectant l'homéostasie du RE. C'est le cas d'une mutation du gène codant YIPF5 qui est un facteur impliqué dans le trafic vésiculaire, en particulier dans le processus de sortie des protéines du RE à destination de l'appareil de Golgi. La mutation est responsable d'une accumulation de protéines qui ne quittent pas le RE, ce qui provoque un stress et une UPR non résolutive aboutissant à la mort cellulaire par apoptose (Franco et al., 2020, p. 5).

Il est également important de relever que l'absence d'activation de la voie ATF6 et l'absence consécutive de protéines chaperonnes nécessaires au bon repliement et au traitement de l'engorgement protéique momentané dans le RE peut être responsable d'un phénomène d'agrégation des protéines qui s'y accumulent. Le milieu oxydant de la lumière du réticulum endoplasmique est propice à la formation de ponts disulfures intra et inter caténaux. Les

liaisons covalentes aléatoires entre les polypeptides engendrent une formation d'oligomères protéiques de haut poids moléculaire particulièrement insolubles, comme illustré dans le western blot visant à détecter la protéine d'enveloppe virale en conditions réductrices ou non (**figure 30**). Nous formulons ainsi l'hypothèse qu'un stress persistant dû à une UPR partielle aboutirait à une accumulation d'agrégats de protéines virales.

Une accumulation d'agrégats protéiques est largement décrite dans diverses protéinopathies responsables de mécanismes neurodégénératifs (Kumar et al., 2016). Il n'est pas exclu qu'un mécanisme similaire intervienne au cours de la neuropathogénèse spécifique à l'infection Zika.

Il me restait à déterminer si l'UPR partielle et le stress persistant en conditions d'infection par ZIKV pouvait conduire à la mort cellulaire par apoptose, entre autres via la voie PERK-ATF4-CHOP.

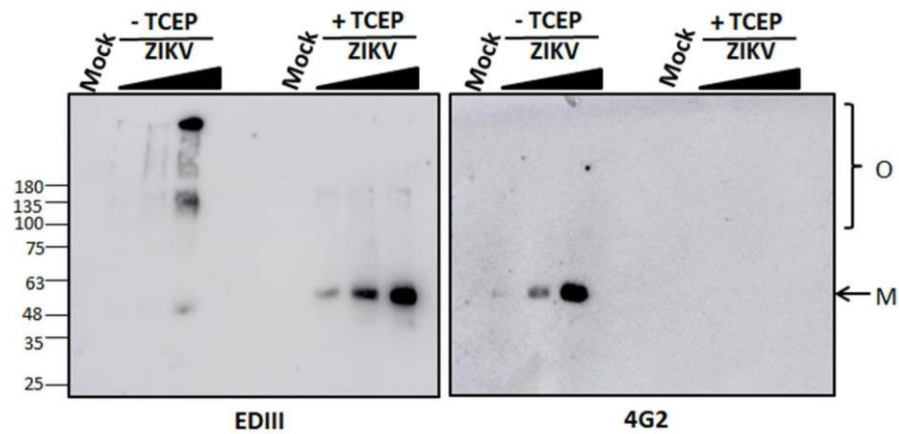


Figure 30. Les protéines d'enveloppe forment des agrégats liés de manière covalente par des ponts disulfures. Des cellules A549 ont été infectées ou pas par ZIKV à MOI 0.5, 1, 5 puis les extraits protéiques totaux ont été traités ou non avec un agent réducteur (-/+TCEP). Figure extraite de (Turpin et al., 2019) : Crosstalk Between Endoplasmic Reticulum Stress and The Unfolded Protein Response During ZIKA Virus Infection », Preprint, 2 octobre 2019.

C. Interférence du virus Zika avec l'UPR et le facteur de transcription pro apoptotique CHOP (Article 3 et article 4)

1. Rôle de CHOP dans l'infection par ZIKV

Lors du stress du RE, si la réponse UPR ne permet plus de résoudre ce stress, via l'augmentation des protéines chaperonnes ou le ralentissement de la traduction, la cellule s'oriente alors vers la mort cellulaire. L'axe liant plus particulièrement l'UPR à l'apoptose passe par la voie PERK, dont une particularité est de conduire, malgré l'inhibition de la traduction par la phosphorylation de eIF2 α , à une traduction spécifique de ATF4. ATF4 est un facteur de transcription qui dirige la transcription du facteur CHOP/GADD153. CHOP, comme ATF4 fait partie des gènes traduits lorsque eIF2 α est phosphorylé. C'est un facteur activateur de la transcription qui déclenche un programme pro-apoptotique lorsqu'il est synthétisé et transloqué dans le noyau des cellules stressées. Il est connu pour se fixer sur des séquences promotrices de gènes cibles parmi lesquels on trouve les gènes des facteurs pro-apoptotiques Bim, PUMA, NOXA et Trb3, mais aussi des gènes codant les récepteurs de mort tels que DR4/5. CHOP est de plus associé à la réduction de l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2. L'activité transcriptionnelle de CHOP conduit à l'expression de TRB3, une pseudokinase qui régule l'activité pro-apoptotique de Akt en inhibant sa phosphorylation (Wang et al., 2015, p. 3). L'expression de CHOP conduit également à l'expression de protéines telles que GADD34 qui permet la levée de l'inhibition de la traduction en recrutant une phosphatase PP1, laquelle entraîne la déphosphorylation de eIF2 α (Novoa et al., 2001) et entraîne *in fine* le retour d'une traduction globale et de la néosynthèse des protéines pro-apoptotiques entre autres. De nombreux virus, en

accomplissant leur cycle de multiplication, provoquent un stress du RE et une réponse UPR qui induit une signalisation aboutissant à l'expression de CHOP. Dans le cas du WNV par exemple, la cellule infectée répond par l'expression de CHOP ce qui conduit à une réponse apoptotique qui limite la progénie virale (Medigeshi et al., 2007). A contrario certains virus ont acquis la possibilité de déjouer la réponse UPR à leur profit comme par exemple le African swine fever virus (ASFV). Des études ont ainsi mis en évidence une inhibition de la traduction de CHOP lors du cycle viral, notamment via la protéine DP71L qui conduit à la déphosphorylation de eIF2 α par PP1a, prévenant ainsi l'inhibition de la synthèse protéines virales (Netherton et al., 2004; Zhang et al., 2010).

Il faut signaler que des études menées par ailleurs ont montré que les voies PERK et IRE1 étaient fonctionnelle durant l'infection par ZIKV en apportant comme donnée que l'expression de CHOP était augmentée au cours de l'infection virale (Gladwyn-Ng et al., 2018). Cependant les données de l'expression augmentée de CHOP apportées par ce papier ne concernaient que le niveau des ARNm de Chop. Aucune information n'était jusque là disponible sur le statut de la protéine CHOP dans les cellules infectées par ZIKV ni sur son activité biologique de facteur activateur de la transcription.

Nous souhaitons absolument disposer de cette information et vérifier l'induction de l'expression de CHOP, mais aussi vérifier la présence de la protéine, sa translocation nucléaire et mesurer l'activité de la protéine au travers de sa capacité à induire la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques.

La mise en évidence de la protéine CHOP s'est heurté à quelques difficultés qui ont requis une réflexion pour mettre au point des ajustements à la méthode de détection.

2. Détection de la protéine CHOP par immunoblot (**article 3**)

Dans la continuité de mes travaux sur le stress du RE et sur le statut protéique de CHOP, je me suis employé à détecter cette protéine par les techniques habituelles d'immunodétection, à des fins d'imagerie en microscopie et par western blot. Nous avons hélas constaté que si nous arrivions à observer aisément un signal nucléaire en immunofluorescence dans les cellules traitées par un inducteur pharmacologique de stress du RE (Tunicamycine ou Thapsigargine), nous n'étions pas en mesure d'obtenir un signal sur des immunoblots en utilisant les mêmes anticorps dirigés contre la protéine CHOP. Il a donc fallu réfléchir à un protocole permettant d'optimiser la détection de la protéine sur les membranes de western blot. CHOP est une petite protéine aux caractéristiques acides (poids moléculaire = 19,174 kDa ; point isoélectrique (PI) = 4.61) et il avait déjà été décrit dans la littérature que des petites protéines acides ont une moindre reconnaissance par les anticorps lors d'immunoblot. Parmi les causes évoquées, un changement de la conformation de ces protéines, ou encore la perte de ces protéines lors des différentes étapes de lavages des membranes post transfert. Des études avaient également montré qu'en ajoutant une étape de fixation chimique des membranes, on améliorerait sensiblement la détection de ces protéines. Nous avons donc testé plusieurs fixateurs chimiques et avons opté pour une étape de fixation par le glutaraldéhyde après le transfert semi-sec. Nous avons déterminé qu'une concentration de 0.5% et une durée d'incubation de 5 minutes étaient optimales pour une détection correcte de la protéine CHOP. La persévérance à trouver comment obtenir un signal pour CHOP en immunoblot a porté ses fruits puisqu'elle a conduit à la publication d'une note technique ci-jointe (**article 3**).



Technical note

Improvement of immunodetection of the transcription factor C/EBP homologous protein by western blot

Jonathan Turpin^{a,1}, Etienne Frumence^{a,1}, Daed El Safadi^a, Olivier Meilhac^{b,c},
Pascale Krejbich-Trotot^{a,*}, Wildriss Viranaïcken^{a,*}^a Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Plateforme CYROI, 2, Rue Maxime Rivière, 97490, Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France^b Université de La Réunion, INSERM UMR 1188, Diabète Athérothrombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTRO), Plateforme CYROI, 2, Rue Maxime Rivière, 97490, Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France^c CHU de La Réunion, Saint-Denis, France

ARTICLE INFO

Keywords:

CHOP
Unfolded protein response
Western blot
Immunodetection
Nitrocellulose

ABSTRACT

Accumulation of misfolded proteins within the endoplasmic reticulum (ER) induces an unfolded protein response (UPR) that either restores homeostasis or triggers apoptosis in case of adaptation failure. The three activated branches of UPR lead to IRE1-, PERK- and ATF6- dependent transcriptional induction of the gene encoding the transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP) which plays an important role in apoptosis induction. In conventional immunoblotting conditions, detection of CHOP is a difficult task. Using a fixation step, we have optimized the detection of CHOP and this method provides a valuable tool to decipher CHOP involvement in UPR.

1. Introduction

Endoplasmic reticulum (ER) is involved in many cellular processes such as lipid synthesis, cellular calcium homeostasis, protein synthesis and folding. Proteostasis is maintained by the ER through many biological processes that control and participate in the correct folding of newly synthesized proteins. In some conditions the ER can be submerged by overexpressed, unfolded or misfolded proteins. To overcome this stress, the cell engages the unfolded protein response (UPR) through three activated pathways, namely ATF6, IRE-1 and PERK. Upon ER stress, activated ATF6 will be translocated to the Golgi apparatus, cleaved and then reach the nucleus to drive transcription up-regulation of genes encoding chaperone proteins like GRP78/94 [1]. The IRE-1 pathway will lead to the activation of the Transcription Factor XBP1 through an endonuclease spliced Xbp1 mRNA (Xbp1s). This branch of the UPR will be mainly devoted to ER-associated protein degradation (ERAD) [2]. Lastly, the PERK pathway will be quickly activated to limit protein translation with phosphorylation of the initiation factor eIF2 α . However, this phosphorylation allows a selective translation of specific mRNA including the one coding for ATF4 which is a transcriptional factor that upregulates CHOP expression. CHOP,

alternatively named GADD153 or DDIT3 is a factor directly involved in ER-mediated apoptosis through the regulation of genes like PUMA, BIM and Bcl2 [3]. CHOP is therefore an essential marker for the monitoring of the UPR and an indicator of ER stress resolution and cell fate.

To monitor specific cell response markers, Western blot is a commonly used method allowing semi-quantification of target proteins after migration and separation of cell extracts on acrylamide gel and their transfer on nitrocellulose (NC) or PVDF membrane. Western blot sometimes leads to very disappointing results with no signal from the target protein. This lack of signal despite a great amount of proteins could be linked to antibody recognition, loss of a conformational epitope, transfer efficiency or loss of proteins during the washing and incubation steps [4]. To improve the signal, many protocols exist, but none of them solve the problem for all proteins. As detection of CHOP by Western blot remain a challenge for all research work that aims to characterize stress [5], here we have improved a classic blotting protocol to follow CHOP protein level.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: pascale.krebich@univ-reunion.fr (P. Krejbich-Trotot), wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr (W. Viranaïcken).¹ Contribute equally to this work.<https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113775>

Received 17 February 2020; Received in revised form 4 May 2020; Accepted 9 May 2020

Available online 13 May 2020

0003-2697/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. Cell line, antibody and reagent

A549-Dual™ cells (InvivoGen, Toulouse, France, a549d-nfis) designated hereafter as A549 cells were maintained in MEM medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS. A549 cells were maintained in growth medium supplemented with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ blasticidin and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ zeocin (InvivoGen, Toulouse, France). CHOP antibody (D46F1 Rabbit mAb #5554) was from cell Signalling Technology (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France). Glutaraldehyde (GA) and Thapsigargin (TG) were purchased from Sigma-aldrich (Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France). The nitrocellulose membrane, Amersham Protran Premium 0.22 or $0.45 \mu\text{m}$ were from GE HEALTHCARE (GE, Buc, France).

2.2. Western blot

Cells (5×10^6) were lysed in 0.5 mL of radioimmunoprecipitation assay buffer RIPA buffer (Sigma-aldrich Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France) at 4°C for 10 min. Lysate were sonicated at 0°C for 10 s of pulse at 80% at 0.5 cycle using a Mixsonic sonicator. Proteins from total cell extract was quantified using BCA reagent according to manufacturer instructions (Sigma-aldrich Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France). Separation of total cell extract by SDS-PAGE and transfer to nitrocellulose were performed as previously described [6]. Briefly proteins extracts were treated with Laemmli buffer and heat at 95°C for 5 min. 10 or 20 μg of proteins were separated on precast NuPAGE gels 4–12% (ThermoFischer, France) or in house SDS-PAGE at 10% with 37.5/1 ratio of acrylamide/bisacrylamide as describe previously [7]. The standard transfer was performed, as initially describe [8], on NC Protan supported membrane with a $0.45 \mu\text{m}$ pores (Amersham, GE, Buc, France). After transfer, membranes were rapidly washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) and fixed with glutaraldehyde at several different concentrations during indicated times. After 3 wash steps with PBS containing Tween 20 at 0.1% (v/v) (PBS-T), the membrane was saturated using 5% non-fat dry milk in PBS-T. Primary antibodies were used at 1:1000 dilutions ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) in PBS-T. Anti-rabbit immunoglobulin-horseradish peroxidase and anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugates from Abcam (Cambridge, UK) were used as secondary antibody according to manufacturer's instructions (1:2000 in PBS-T, $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Blots were revealed with enhanced chemiluminescence, ECL prime detection reagents (GE, Buc, France) using an Amersham Imager 680 (GE, Buc, France).

2.3. Immunofluorescence assay

A549 cells grown on glass coverslips were fixed with 3.7% formaldehyde at room temperature for 10 min. Fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 4 min. Coverslips were incubated with primary antibodies (1:1000 dilution, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) in 1% BSA-PBS. Antigen-antibody binding was visualized with Alexa 594 Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000, Invitrogen). Nucleus morphology was revealed by 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining. The coverslips were mounted with VECTASHIELD® (Clinisciences, Nanterre, France) and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope. Images were captured and processed using a Hamamatsu ORCA2 ER camera and the imaging software NIS-Element AR (Nikon, Tokyo, Japan).

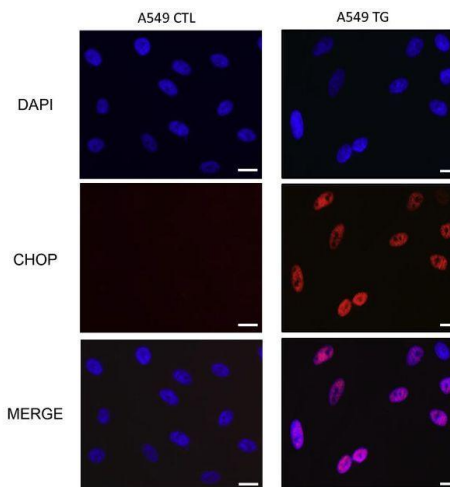


Fig. 1. CHOP detection by immunofluorescence during UPR activation. A549 cells were grown on coverslips and treated with TG for 4 h. Cells were fixed with 3.7% PFA and CHOP was detected by immunofluorescence with DAPI counterstaining of nuclei.

Table 1

Comparison of several biochemical characteristics of the CHOP, insulin and caspase-3 proteins.

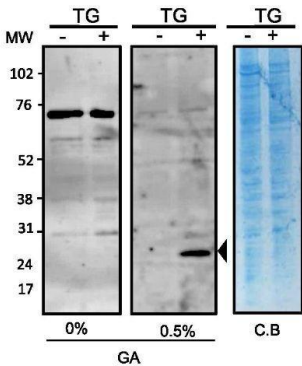
	CHOP	CASP-3	INSULIN
UnitProt number	P35638	P42574	P01308
Number of amino acids	169	277	110
Molecular weight (kDa)	19.174	31.607	11.980
Theoretical pI	4.61	6.09	5.22

3. Results

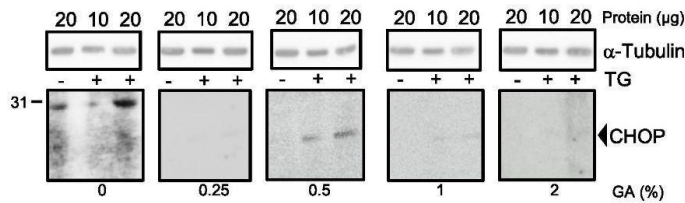
3.1. CHOP is detected by immunofluorescence assay but not by conventional western blot technique

In order to follow CHOP induction upon ER stress in A549 cells and to validate the use of CHOP antibody, CHOP intracellular imaging was performed by immunodetection and analysis by fluorescence microscopy. A549 cells were grown on coverslips and stimulated for 4 h by $1 \mu\text{M}$ of thapsigargin (TG), an inhibitor of SERCA leading to intracellular Ca^{2+} release and ER stress. CHOP was not detectable in non-treated cells (Control) but we evidenced a strong nuclear signal in A549 TG-treated cells (Fig. 1). This result shows that our antibody recognizes CHOP and that CHOP is expressed and localized within the nucleus of A549 cells upon ER stress. To assess CHOP protein levels in A549 cells, we used a total cell extract for western blot. No signal could be observed following a classical immunoblot protocol, even when a more sensitive, enhanced chemiluminescent substrate was used (ECL select from GE, data not shown). Different conditions were tested including proteins preparation with different lysis buffers (RIPA lysis buffer, Laemmli buffer), different ratio of acrylamide/bisAcrylamide for the SDS-PAGE to increase transfer to membrane (ie 37.5/1 or 74/1) or commercially available precast gels (NuPage). Transfer parameters were also tested (transfer time 30 min to 16 h, transfer at room temperature (25°C) or at 4°C , transfer buffer with methanol, ethanol or isopropanol, semi-dry transfer or liquid transfer, transfer on PVDF membrane or on NC membrane (Protan with $0.2 \mu\text{m}$ pores). As it has

A



B



C

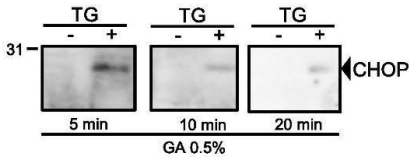


Fig. 2. Improvement of CHOP detection by western blot. (A) Total A549 cell extracts treated or not with TG for 4 h were separated by SDS-PAGE followed by coomassie-blue (C.B) staining or followed by transfer to NC membrane for immunoblotting. After transfer, the membranes were fixed for 10 min with 0.5% glutaraldehyde (GA) in PBS (A) or 10 min with different concentrations of GA in PBS (B) or for the indicated time with 0.5% of GA in PBS (C). The black arrowhead indicates CHOP signal. In (B) for the loading control, the upper part of the membrane (> 38 kDa) was incubated with α -tubulin without any GA fixation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

been previously shown that milk can cause a release of proteins from the transfer membrane during the saturation stage [9], we also tested the alternative saturation with 1%BSA during several times. In all cases, CHOP could not be detected by western blot in our conditions even by the use of different antibodies against CHOP from other suppliers (data not shown). Therefore, CHOP detection by classical western blot techniques was unsuccessful.

3.2. Membrane fixation improved CHOP signal for western blot

As western blot is a gold standard technique to evaluate protein expression modulation and their relative abundance in samples, we tried to optimized CHOP detection by this method. As immunofluorescence allowed a validation of our antibody, with the expected detection of CHOP nuclear localization upon UPR (Fig. 1), we aimed at

solving the lack of detection by WB. It should be noted that, according to the supplier, the antibody used was supposed to be suitable for both immunofluorescence and Western blot. Previous studies have already shown that one major issue of this technique was the loss of proteins from the blotted membrane during incubation and washing steps, especially for small acidic proteins like caspase-3 or insulin (Table 1) [10,11]. Using the ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>), we found that CHOP is a small protein more acidic than caspase-3 or insulin (Table 1). We thus tested whether our difficulties to detect this protein could be related to a poor retention of CHOP to the NC membrane.

Using glutaraldehyde, we tested chemical protein fixation on the membrane before blot saturation and immunolabeling steps. Glutaraldehyde (GA) is a fixative agent forming crosslinks between macromolecules. It is generally used during sample preparation for immunohistochemistry or electron microscopy. Several articles have described membrane fixation [10,12,13], but this technique does not work for all proteins, as conformational changes may occur within the recognized epitopes of the protein of interest. Without available data on our target protein CHOP, we tested this pre-fixation method. NC membrane were incubated after the gel transfer with 0.5% (V/V) glutaraldehyde in PBS for 20 min, and washed three times with PBS-T. Immunolabelling was then performed as usual (see material and methods).

Without GA pre fixation of the blot, three main non-specific bands around 70, 60 and 30 kDa were observed after immunodetection of CHOP. None of these signals match with CHOP, which is expected at 26 kDa as apparent molecular weight (Fig. 2A). Following treatment with GA 0.5% for 10 min, the expected 26 kDa signal appeared (black arrowhead) and was specific of cells treated with the UPR inducer (Fig. 2A). Moreover, we observed a general background decrease and less signal related to non-specific bands. Finally, GA enhanced retention of CHOP on the NC and improved antibody interaction specificity by eliminating non-specific interactions.

The fixation condition could be improved using different incubation times or GA concentrations. To determine the optimal concentration, GA at 0.25, 0.5, 1, and 2% were tested for 10 min for protein fixation on NC membranes. Glutaraldehyde at 0.5% was found to be the optimal concentration for CHOP immunodetection (Fig. 2B).

For incubation time optimization, NC membranes were incubated for 5, 10 or 20 min with GA at 0.5% in PBS. The optimal fixation time for detecting CHOP was 5 min (Fig. 2C). We can conclude that protein fixation with 0.5% glutaraldehyde for 5 min improved CHOP and allowed its detection after western blotting. This optimization of the most obvious way to detect a protein level gives access to an important information on this specific indicator of ER stress and UPR.

4. Conclusion

ER stress is a common cellular response involved in conformational diseases, metabolic syndrome and viral infections [10,14]. GADD153/CHOP is one of the main actors of ER stress resolution that seals the cell's fate in terms of survival or death and its detection by a gold standard method like western blot is indispensable. Here we have improved CHOP immunodetection by western blot with a glutaraldehyde fixation step, providing a great tool to analyze ER stress status in cell extract samples.

Funding

This work was supported by the ZIKAlert and Biomarqueurs projects (European Union-Réunion Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0001902 and RE0001897 respectively), by Federation BioST from Reunion Island University. E.F. holds a fellowship from the

Regional Council of Reunion Island (European Union-Region Reunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0012406). J.T. has a PhD degree scholarship from La Reunion Island University (Ecole Doctorale STS), funded by the French ministry MEESR.

CRediT authorship contribution statement

Jonathan Turpin: Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Etienne Frumence:** Validation, Formal analysis, Investigation. **Daed El Safadi:** Formal analysis, Investigation. **Olivier Meilhac:** Formal analysis, Data curation, Visualization, Funding acquisition. **Pascal Krejbich-Trotot:** Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Wildriss Viranaïcken:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgments

We thank the members of PIMIT and DÉTROIT laboratories for helpful discussions.

References

- [1] K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, K. Mori, Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress, *MBOC* 10 (1999) 3787–3799, <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>.
- [2] C.J. Adams, M.C. Kopp, N. Larburu, P.R. Nowak, M.M.U. Ali, Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1, *Front. Mol. Biosci.* 6 (2019), <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00011>.
- [3] Z. Liu, Y. Lv, N. Zhao, G. Guan, J. Wang, Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate, *Cell Death Dis.* 6 (2015), <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.183> e1822–e1822.
- [4] T. Mahmood, P.-C. Yang, Western blot: technique, theory, and trouble shooting, *N. Am. J. Med. Sci.* 4 (2012) 429–434, <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
- [5] L. Haataja, T. Gurlo, C.J. Huang, P.C. Butler, Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis, *Endocr. Rev.* 29 (2008) 303–316, <https://doi.org/10.1210/er.2007-0037>.
- [6] W. Viranaïcken, B. Nativel, P. Krejbich-Trotot, W. Harrabi, S. Bos, C. El Kalamouni, M. Roche, G. Gadea, P. Desprès, ClearColi BL21(DE3)-based expression of Zika virus antigens illustrates a rapid method of antibody production against emerging pathogens, *Biochimie* 142 (2017) 179–182, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.011>.
- [7] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [8] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (1979) 4350–4354, <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.
- [9] N. DenHollander, D. Befus, Loss of antigens from immunoblotting membranes, *J. Immunol. Methods* 122 (1989) 129–135, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90343-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90343-8).
- [10] G. Nestal de Moraes, É. Carvalho, R.C. Maia, C. Sternberg, Immunodetection of caspase-3 by Western blot using glutaraldehyde, *Anal. Biochem.* 415 (2011) 203–205, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.032>.
- [11] N. Okita, Y. Higami, F. Fukai, M. Kobayashi, M. Mitarai, T. Sekiya, T. Sasaki, Modified Western blotting for insulin and other diabetes-associated peptide hormones, *Sci. Rep.* 7 (2017), <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04456-4>.
- [12] J. Xu, H. Sun, G. Huang, G. Liu, Z. Li, H. Yang, L. Jin, X. Cui, L. Shi, T. Ma, et al., A fixation method for the optimisation of western blotting, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43039-3>.
- [13] K.P. Karey, D.A. Sirbasku, Glutaraldehyde fixation increases retention of low molecular weight proteins (growth factors) transferred to nylon membranes for western blot analysis, *Anal. Biochem.* 178 (1989) 255–259, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90634-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90634-9).
- [14] H. Yoshida, ER stress and diseases, *FEBS J.* 274 (2007) 630–658, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x>.

3. Discussion de l'article 3

La performance des moyens de détection des protéines d'intérêt par les techniques classiques telles que l'immunoblot, est fondamentale pour mener à bien nos recherches. Mes travaux ont montré que la détection de la protéine CHOP peut s'avérer difficile. C'est peut être ce qui a conduit les auteurs des publications décrivant l'activation de CHOP à n'analyser que la transcription du gène ou à limiter leur analyse protéique (“(3) How to detect CHOP (GADD153) with Western Blot?,” n.d.; Haataja et al., 2008; Gladwyn-Ng et al., 2018). Cette mise au point technique sur laquelle j'ai eu l'opportunité de réfléchir permettra à la communauté de disposer d'une astuce pour améliorer l'analyse de protéines de caractéristiques biochimiques similaires à CHOP en passant par une simple étape de fixation chimique au glutaraldéhyde 0.5% de la membrane. Elle offre la possibilité, lors de la caractérisation de la régulation de l'expression de gènes, de lever la limite due aux interprétations exclusives des niveaux transcriptionnels et d'appréhender de potentielles régulations traductionnelles souvent occultées.

4. ZIKV inhibe la traduction de CHOP et limite le programme pro-apoptotique normalement induit par le stress du RE (**article 4**)

Une fois la contrainte technique levée, nous avons pu nous atteler à la caractérisation de la réponse CHOP lors de l'infection par ZIKV.

Nos premiers résultats nous avaient montré que la voie PERK conduisant à l'expression du gène CHOP était bien fonctionnelle, avec une augmentation de la quantité de transcrits révélée par qRT-PCR (article 2, figure 2). Nous avons vérifié que le facteur de transcription ATF4 issu de l'activation de la branche PERK de l'UPR et responsable de l'expression de CHOP, était bien présent, localisé dans les noyaux des cellules et actif lors l'infection par ZIKV, tout comme l'épissage de XBP1 traduisant l'activité de la branche IRE1.

Nous avons logiquement également souhaité caractériser la localisation cellulaire de CHOP et poursuivi par sa détection par immunofluorescence. Nous avons alors découvert que les cellules infectées ne présentaient aucun signal CHOP visible en microscopie.

En induisant un stress du RE additionnel via la thapsigargine (TG) post infection par ZIKV, nous avons observé que seules les cellules non infectées étaient positives à un signal nucléaire de CHOP. La séquestration cytoplasmique ou la dégradation de CHOP ont été exclues car nous n'avons pas détecté de signal CHOP en western blot et l'ajout d'un inhibiteur de protéasome n'a conduit à aucune accumulation détectable de la protéine. Enfin, nous avons observé un défaut d'activation du programme transcriptionnel dépendant du

facteur CHOP impliqué dans la mise en place de l'apoptose lors de l'UPR confirmant indirectement l'absence de CHOP dans les cellules infectées par ZIKV (**Article 4**).

Article

CHOP Pro-Apoptotic Transcriptional Program in Response to ER Stress Is Hacked by Zika Virus

Jonathan Turpin [†], Daed El-Safadi [†], Grégoire Lebeau [†], Etienne Frumence [†], Philippe Desprès [†], Wildriss Viranaïcken ^{*} and Pascale Krejbich-Trotot ^{*}

PIMIT, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme CYROI, 2, rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France; jonathan.turpin@univ-reunion.fr (J.T.); daedalsafadi@gmail.com (D.E.-S.); greg.lebeau@live.fr (G.L.); etienne.frumence@univ-reunion.fr (E.F.); philippe.despres@univ-reunion.fr (P.D.)

^{*} Correspondence: wildriss.viranaïcken@univ-reunion.fr (W.V.); pascale.krebich@univ-reunion.fr (P.K.-T.)

[†] Contributed equally to the work.

Abstract: Zika virus (ZIKV) is an emerging mosquito-borne flavivirus considered as a threat to human health due to large epidemics and serious clinical outcomes such as microcephaly in newborns. Like all flaviviruses, ZIKV relies on the cellular machinery to complete its viral cycle, with the endoplasmic reticulum (ER) being the critical site of viral replication factories. The sudden high protein load in the ER induces an ER stress to which the cell responds with an appropriate unfolded protein response (UPR) in an attempt to restore its disturbed homeostasis. When the restoration fails, the cell signalling leads to a programmed cell death by apoptosis with the upregulation of the UPR-induced C/EBP homologous protein (CHOP) which acts as the main trigger for this fatal outcome. Our previous studies have shown the ability of ZIKV to manipulate various cellular responses in order to optimize virus production. ZIKV is able to delay apoptosis to its benefit and although ER stress is induced, the UPR is not complete. Here we discovered that ZIKV impairs the expression of CHOP/DDIT3, the main factor responsible of ER-stress driven apoptosis. Surprisingly, the mechanism does not take place at the transcriptional level but at the translational level.

Keywords: Zika virus; ER stress; unfolded protein response; apoptosis; CHOP



Citation: Turpin, J.; El-Safadi, D.; Lebeau, G.; Frumence, E.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. CHOP Pro-Apoptotic Transcriptional Program in Response to ER Stress Is Hacked by Zika Virus. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3750. <https://doi.org/10.3390/ijms22073750>

Academic Editor: Nuno C. Santos

Received: 12 February 2021

Accepted: 30 March 2021

Published: 3 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus that belongs to the *Flaviviridae* family including more than 50 distinct species of enveloped viruses, several of which are pathogenic to humans such as Yellow fever virus (YFV), Dengue virus (DENV) and West Nile virus (WNV). In the last ten years, ZIKV almost ignored so far, became a serious threat for human health due to the explosive Brazilian outbreak in 2015 with a number of cases that reached almost one million. During these epidemics, several thousand cases have been recorded with serious neurological complications in adults and congenital malformations like microcephaly in newborns [1]. This led the World Health Organization to declare ZIKV as a public health emergency of international concern and mobilized the scientific community to address the lack of data on this virus, its interactions with its hosts and its pathogenic mechanisms.

ZIKV is an arbovirus, transmitted by mosquitoes mainly of the *Aedes* genus. ZIKV can also be sexually transmitted which increases the risk of propagation [2]. Like other flaviviruses, ZIKV enters the cells by endocytosis and once its genome is released into the cytoplasm, it is translated to initiate the viral multiplication. Replication of ZIKV-RNA and synthesis of its corresponding viral polypeptide occur in the Endoplasmic Reticulum (ER) invaginations. This results in an ultra-structural modification of the ER with an increased overall size and formation of convoluted membranes [3,4]. It has been reported that ZIKV cycle of multiplication is dependent on several ER proteins including ER membrane complex proteins that are essential for the replication of ZIKV and DENV [5]. The ER

is involved in post-translational modifications and folding of secreted and membrane cellular proteins. Like cellular proteins, ZIKV proteins are processed and folded in the ER. Folding requires a constant supply of ATP and a stable concentration of Ca^{2+} necessary for the activity of chaperone proteins like calreticulin, calnexin, Bip/GRP78 and GRP94. These chaperones stabilize protein folding intermediates. They provide a balanced redox environment promoting the formation of disulfide bonds and the tridimensional protein conformation [6].

Multiple conditions are able to disturb the ER homeostasis like glucose starvation, hypoxia, calcium dysregulation or protein accumulation which will in turn induce ER stress [7]. Pharmacological ER stress inducers can mimic these functional defects, such as thapsigargin (TG), a Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase pump (SERCA) inhibitor that promotes calcium stock depletion in the ER, Tunicamycin (TM) an inhibitor of N-linked glycosylation and reducing agents like dithiothreitol (DTT) that block disulfide-bond formation and promote protein retention in ER. In response to the ER stress and in order to restore the ER homeostasis, the Unfolded Protein Response (UPR) is activated [8]. Three signalling pathways will help to relieve the cell from ER congestion and stress [9]. The first pathway mediated by the protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), is based on attenuating the translation process in order to reduce the influx of newly synthesized proteins in the ER. The second one is the activating transcription factor 6 (ATF6) pathway, which leads to an increase in the ER protein-folding capacity by enhancing the translation of chaperone proteins like Bip/GRP78 and GRP94 [10]. The third pathway depends on the Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1), favouring the ER-associated degradation (ERAD) process to eliminate the unfolded or misfolded proteins by the ubiquitin-proteasome system [11]. When the stress is prolonged or not properly resolved, cells activate their death program [12,13]. Under these circumstances, the transcription factors (TF): ATF4, ATF6f and the spliced form of the X-box binding protein 1 (Xbp-1(s)), activated respectively by the three UPR branches PERK, ATF6 and IRE1, lead to the upregulation of the C/EBP homologous protein (CHOP) expression. CHOP's upregulation is the pivotal event that drives to the initiation of cell suicide [14] (Figure 1).

CHOP also known as GADD153 (Growth Arrest and DNA Damage inducible gene 153) and *DDIT3* (DNA-damage-inducible transcript 3), is a transcription factor mainly involved in the ER stress-induced apoptosis. CHOP is known to promote apoptosis in several ways. It induces the upregulation of the Bcl-2 like protein 11 (BIM) which in turn activates the pro-apoptotic mitochondrial factors BAX and BAK [15]. Its overexpression induces the upregulation of several genes promoting cell death by apoptosis and cell cycle arrest, like Tribbles homolog 3 (TRB3), NOXA, p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) and others [16,17]. Studies have shown that CHOP expression is followed by the suppression of the Bcl-2 anti-apoptotic protein expression through dimerization with c-AMP responsive element binding protein (CREB) [18] but it is still unclear if Bcl-2 expression is directly or indirectly regulated by CHOP.

Under normal conditions, CHOP is ubiquitously expressed at a very low level [18]. Under ER stress and UPR activation, CHOP's expression increases. Indeed, the transcription of CHOP (*Chop/DDIT3*) encoding gene is under the control of specific UPR inducible TFs mostly ATF4 and Xbp-1(s) [19]. Furthermore, a translational control is also carried out by a phosphorylated alpha subunit of eukaryotic initiation factor (eIF2 α) dependent initiation, conditioned by the activated PERK pathway of the UPR system [20]. CHOP is a factor whose expression is highly controlled through transcriptional and translational regulation, probably because of its involvement in cell death.

Many studies have shown that the three branches of the UPR (PERK, ATF6 and IRE1) are activated in cells infected with flaviviruses like DENV, WNV and YFV [21]. Like other flaviviruses, ZIKV infection has been shown to trigger ER stress and UPR activation [22–25]. For several viruses, the mechanism underlying UPR activation has been extensively explored with a particular focus on identifying the viral determinant that drives it. Thus, it has been shown that the Hepatitis C virus (HCV) Envelope protein

is able to promote UPR and control CHOP expression [26]. Concerning DENV, it is reported that Xbp-1 splicing is induced by NS2B/3 [27]. This indicates that specific proteins have the ability to support UPR activation during the flaviviruses cycle of replication. Their action in UPR signalling would thus contribute to the development of a suitable environment for the virus replication, notably through the overexpression of chaperone proteins [28]. However, by promoting several modes of cell defence including antiviral programs, immune responses and involvement in autophagy or apoptosis, the UPR also contributes to thwart the virus [29]. Our team recently reported that ZIKV induces a partial transduction of ER stress by activating only two UPR's pathways, PERK and IRE1 [25]. We also showed that the virus-induced apoptosis was delayed regarding the virus multiplication cycle [30]. Moreover, we found that ZIKV was not only able to interfere with apoptosis but could even provide protection against an exogenous induction of cell death. This anti-apoptotic activity of ZIKV was shown to be dependent on Bcl-2 protein [30].

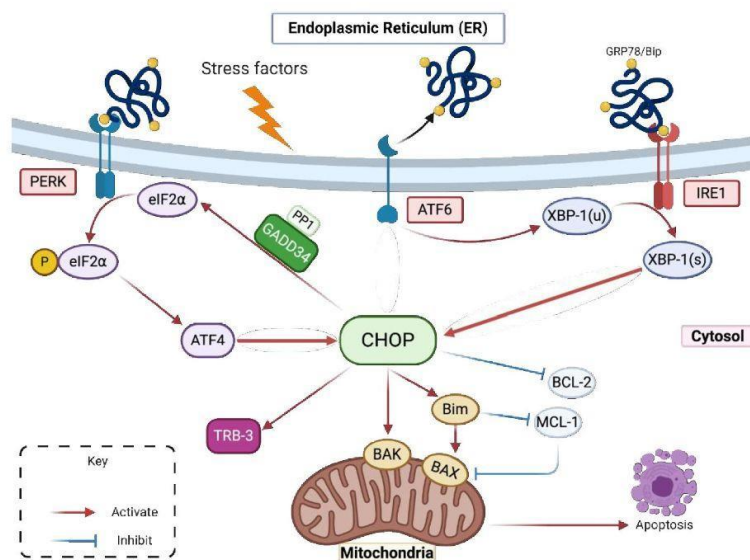


Figure 1. CHOP activation during ER stress and UPR (adapted from [18]).

As aforementioned, UPR signalling is ultimately deleterious for viral replication. Since CHOP is the main pro-apoptotic transcription factor activated by UPR, we hypothesized that ZIKV might regulate the expression of CHOP protein during the virally induced ER stress. This could be one of the explanations of the delayed apoptosis observed in ZIKV-infected cells.

In a normal state, the chaperone protein GRP78/BiP, the sensor of accumulated or misfolded proteins in the ER, is associated with the luminal domain of three different ER transmembrane proteins to prevent their activation. These three proteins, PERK, ATF6 and IRE1, are stress transducers [12]. In case of ER homeostasis disturbance and during ER stress, GRP78/BiP is dissociated from these proteins activating their stress-signal transducing capacity [31]. (i) Activated PERK phosphorylates eIF2 α and leads to a general lowering in mRNA translation and protein influx in the ER [32]. Conversely, phosphorylated eIF2 α is required for the translation of ATF4 mRNA. ATF4 protein is a transcription activator of many UPR target genes including *Chop/DDIT3* and DNA damage protein (*GADD34*) [33]. (ii) Activated ATF6 moves to Golgi apparatus where

it is cleaved by site 1 and site 2 proteases generating ATF6f [34]. ATF6f is an activated basic leucine zipper (b-ZIP) factor that reaches the nucleus to promote the transcription of *Chop/DDIT3* and different genes involved in protein re-folding. (iii) IRE1 is a kinase which is auto-phosphorylated in response to ER stress. It is involved in the Xbp-1'(s) unconventional splicing due to its endonuclease activity, leading to a 26 nucleotide-introns removal from Xbp-1 mRNA [35]. Spliced Xbp-1 (Xbp-1(s)) encodes a b-ZIP transcription factor that contributes to the expression of genes involved in the ERAD and genes involved in protein folding [36]. CHOP triggers apoptosis by inhibiting the Bcl-2 proteins family like BCL-2, MCL-1 and by upregulating Bim, which in turn regulates the mitochondrial outer membrane permeabilization mediated by BAX and BAK. CHOP can induce the upregulation of TRB-3 gene which can also induce apoptosis. In addition, it can directly activate GADD34 that induces the dephosphorylation of eIF2 α by combining with protein phosphatase 1 (PP1) [18]. This deregulation with an increase in protein translation and ER stress ends by cell apoptosis.

2. Results

2.1. Despite an Incomplete UPR, the Factors That Govern the Transcriptional Activation of CHOP Are Present in ZIKV-Infected Cells

The increase of the CHOP gene transcription in response to ER stress may be the result of activation of all three UPR branches and may be due to PERK/ATF4, ATF6 or IRE1/Xbp-1(s) activities (Figure 1). We have recently reported that ZIKV was responsible for inducing an ER stress in A549 cells due to the accumulation of viral proteins [25] and that ZIKV-induced UPR was characterized by PERK and IRE1 activation but not the ATF6 UPR pathway [25]. In order to confirm these results, we measured the expression of UPR-inducible TFs, ATF4 and Xbp-1(s), involved in CHOP expression in ZIKV-infected cells.

During UPR, PERK activation and eIF2 α phosphorylation are responsible for a general attenuation of the mRNA translation, except specific genes, like ATF4 that escapes this silencing and requires a phosphorylated eIF2 α to be translated. We then performed immunofluorescence imaging of ATF4 in order to determine if it was expressed and translocated into the cell nuclei in ZIKV infected A549 cells. ATF4 was clearly detected in nuclei of cells infected 24 h with ZIKV or incubated with ER stress/UPR pharmacological inducer TG as a positive control (Figure 2a).

During UPR, the activated IRE-1 is involved in the unconventional splicing of Xbp-1 with Xbp-1(s) being important for *Chop/DDIT3* upregulation. We performed RT-PCR and qRT-PCR to follow the Xbp-1 splicing and mRNA levels in cells infected with ZIKV at several MOI for 24 and 48 h. The results indicate that an Xbp-1 splicing takes place in the infected cells. It depends on the MOI and it is more pronounced at 48 h. (Figure 2b,c).

2.2. Upregulation of CHOP Transcriptional Activity in A549 Cells Infected by ZIKV

The nuclear localization of ATF4 and the splicing of Xbp-1 suggest that these UPR-induced TFs may be sufficient to upregulate *Chop/DDIT3* transcription in ZIKV infected cells. We performed qRT-PCR analysis of CHOP mRNA. We found a 2- and 4-fold increase in ZIKV-infected cells at MOI 5 and MOI 10 respectively, compared to the uninfected cells (Figure 3a). If we follow the evolution of this upregulation over time, we can see that the increase in CHOP mRNA levels is significant 24 and 48 h post-infection, although modest compared to that obtained with the ER stress/UPR pharmacological inducer TG (Figure 3b). The amounts of CHOP mRNA detected depend on the MOI and they increase during the time course of infection. We conclude that, although ZIKV triggers an incomplete UPR, the infection still leads to an upregulation of CHOP at the transcriptional level.

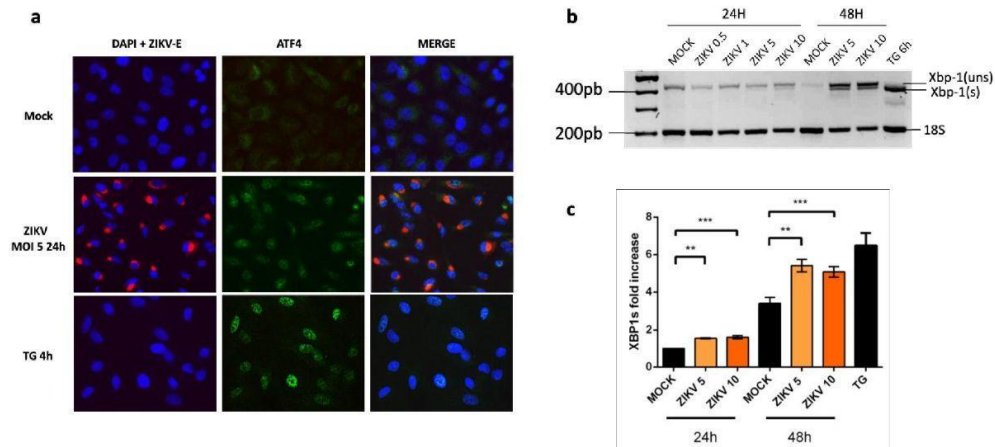


Figure 2. UPR inducible Transcription Factors, ATF4 and Xbp-1(s) are up-regulated in A549 cells infected with ZIKV. (a) Cells were infected with ZIKV at MOI = 5 for 24 h or treated with TG for 4 h. Cells were immunostained for ZIKV envelope (ZIKV-E, red) and ATF4 protein (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). (b) RT-PCR of total Xbp-1 (spliced and unspliced) was performed in A549 cells infected with ZIKV at MOI 1, 5 or 10 for 24 h and 5 and 10 for 48 h post infection. Products were migrated on 2.0% agarose gel and compared to the one obtained in mock-infected cells and in cells treated with TG, the ER stress/UPR pharmacological inducer. (c) qRT-PCR analysis of Xbp-1(s) mRNA was performed in A549 cells infected or not with ZIKV at MOI 10 for different times as indicated. Our positive control cells have been treated with TG for 6 h. Data were presented as mean SEM ($n = 3$). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, vs. mock.

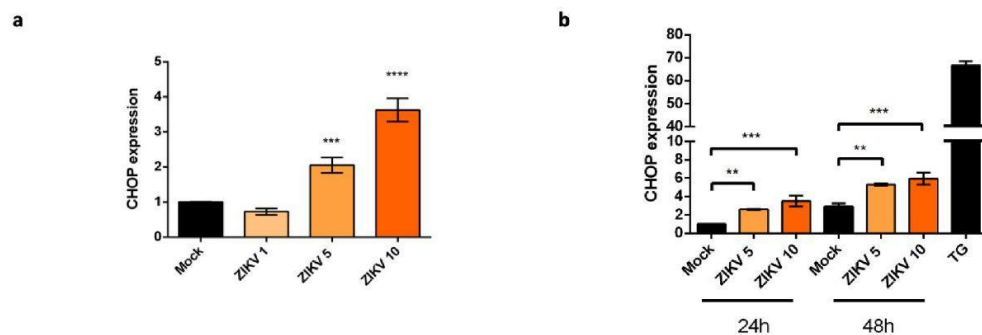


Figure 3. CHOP expression is upregulated at the transcriptional level in ZIKV infected cells. (a): qRT-PCR analysis of CHOP mRNA was performed in A549 cells harvested 24 h after being infected with ZIKV at different MOI (1, 5 and 10). CHOP mRNA expression was normalized to the GAPDH mRNA level. Data were presented as mean SEM ($n = 3$). **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$ vs. mock. (b): qRT-PCR analysis of CHOP mRNA was performed in A549 cells harvested at 24 h and 48 h after being infected or not with ZIKV at MOI 5 and MOI 10 or treated with TG for 6 h. CHOP mRNA expression was normalized to the GAPDH mRNA level. Data were presented as mean and SEM ($n = 3$). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs. mock.

2.3. ZIKV Inhibits CHOP Protein Expression

To gain insight into the regulation of CHOP protein expression and its localization during ZIKV infection, we used immunofluorescence imaging. A549 cells were infected with ZIKV at MOI 5 for 24 h. Stressed cells, treated with TG for 4 h, were used as an UPR positive control regarding upregulation of CHOP synthesis. ZIKV-E detection allowed the

monitoring of the infected cells 24 h after ZIKV addition at MOI 5. Unlike TG treated cells, which showed a strong CHOP signal in their nuclei, no CHOP protein could be detected in the nucleus of ZIKV infected cells (Figure 4a). Despite the ER stress and UPR induction triggered by ZIKV as previously shown and despite a transcriptional activation of CHOP gene, CHOP protein seems to be lacking in the infected cells.

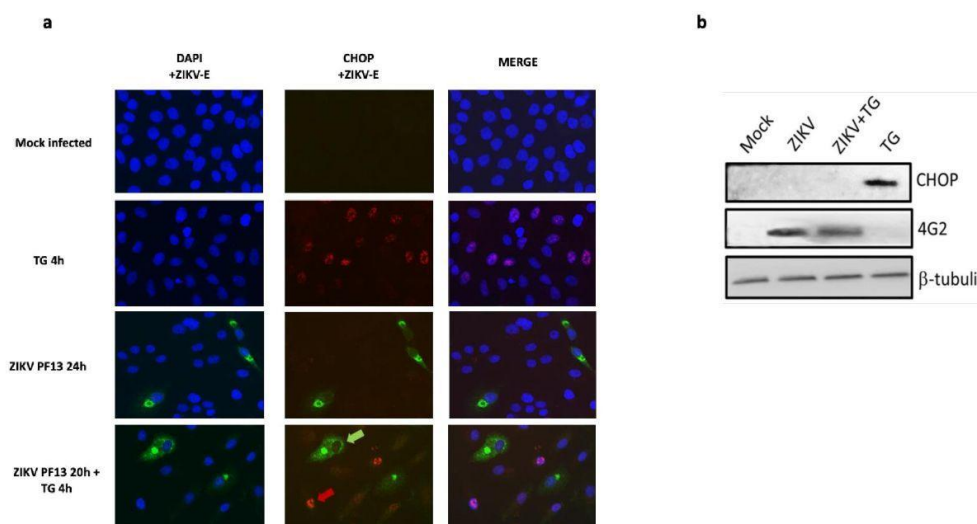


Figure 4. ZIKV inhibits CHOP protein expression in the infected cells. (a) Immunofluorescence detection of ZIKV envelope (ZIKV-E, green) expressing cells and CHOP protein (red) in A549 cells infected or not with ZIKV at MOI = 5 for 24 h, further treated or not with TG for 4 h at 20 h.p.i and cells treated with TG for 4 h. Nuclei were stained with DAPI (blue). h.p.i: hours post-infection. In the microscopic field of cells infected with ZIKV and treated with TG for 4 h at 20 h.p.i, the green arrow points a cell stained for ZIKV-E without CHOP staining in the nucleus and the red arrow points a cell which is not stained for ZIKV-E but has a CHOP stain in the nucleus. (b) A549 cells were infected or not with ZIKV at MOI 5 for 24 h, treated 20 h.p.i with TG for 4 h or only treated with TG for 4 h. The cells were harvested at the different conditions indicated above and subjected to western blot analysis using antibodies against CHOP and ZIKV envelope protein (4 G2). β -Tubulin was used as a loading control.

To understand whether ZIKV was able to control the expression or the localization of CHOP protein, an exogenous UPR inducer (TG) was added to the infected cells 20 h post infection for a treatment of 4 h. Again, CHOP signal was undetectable in the infected cells, immunostained for ZIKV-E. In contrast, in the same microscopic fields, uninfected cells without any ZIKV-E immunostaining, do express CHOP protein with a staining being clearly nuclear (Figure 4a). These observations suggest that ZIKV infected cells lack a nuclear CHOP protein, despite an exogenous induction of UPR by TG addition 20 h after the virus.

We further performed Western Blotting (WB) analysis to compare CHOP protein patterns in the different conditions. A technical adaptation of the classical WB with a glutaraldehyde prefixation step of the blotted membranes was necessary to allow a clear immunodetection of CHOP. This step improves the retention of low molecular weight acidic proteins such as CHOP on the membrane and we followed exactly the same steps as mentioned [37]. Firstly, the immunoblot confirmed that CHOP protein was undetectable in the control cells that are uninfected and unstressed. This was not surprising and has already been documented [37]. Indeed, despite a basal level of transcription (Figure 3), CHOP protein is not produced in cells in normal conditions, due to a lack of translation

of the transcripts. Secondly, as previously revealed by immunofluorescence, CHOP protein was detectable in extracts from TG-treated cells, indicating that its expression was induced under ER stress conditions. Finally, the WB analysis confirmed that CHOP was undetectable in ZIKV infected cells, whether they have been treated additionally with TG or not (Figure 4b).

We wondered whether the lack of CHOP detection was related to a direct effect of ZIKV infection on the conformation of the protein, resulting in a loss of antigenic reactivity. To rule out this hypothesis, we performed immunofluorescence using several anti-CHOP antibodies including a polyclonal one. We obtained the same images with CHOP missing in the infected cells in contrast to the TG treated cells (Supplementary Materials, Figure S1).

We then examined whether a lack of CHOP expression was a characteristic of the cell line used and/or a specificity associated with the viral strain of ZIKV. We therefore replicated the experiment with HuH7 cell line and with the ZIKV-MR766 molecular clone, corresponding to the historical African lineage of the virus. The same observations were achieved on HuH7 and with ZIKV-MR766 (Figure S2).

In addition to the exogenous stress inducer, we also added a proteasome inhibitor, as we could not exclude the possibility that CHOP was synthesised and rapidly degraded in the infected cells, thus explaining the inability to detect it. Again, we were able to verify that even in the presence of this inhibitor and while CHOP was detectable and localised in the nuclei of uninfected cells, it was not detectable in cells with ZIKV-E labelling (Figure S2).

Together, these results support the hypothesis that ZIKV, although inducing ER stress, UPR and upregulation of CHOP transcription, inhibits the production of the CHOP protein. Moreover, ZIKV has the capacity to prevent CHOP protein expression in infected cells even in the presence of the UPR inducer TG.

2.4. ZIKV Controls the Transcriptional Activity of CHOP-Dependent Genes

To ensure that the lack of CHOP observation in infected cells was not due to a loss of sensitivity in the detection system, we investigated whether we could have an evidence of a biological activity that could attest for the presence of CHOP, even though we could not detect it.

As a transcription factor, CHOP regulates the expression of several pro-apoptotic genes, including TRB-3, BIM, PUMA and NOXA as previously mentioned [16,17]. We checked the transcriptional levels of these genes in different conditions: ER stress/UPR pharmacological induction with TG, ZIKV infection or both.

Compared to the mock, the expression of TRB-3, BIM, PUMA and NOXA mRNA showed a slight to no increase in ZIKV infected cells (Figure 5a–d). The increase factors are not comparable to those obtained in UPR conditions induced by the TG treatment, which is associated with a nuclear detection of CHOP protein.

In A549 cells infected 20 h with ZIKV, TG was poorly efficient for inducing transcriptional activity of the CHOP-stimulating genes TRB3, BIM, NOXA and PUMA as compared to mock, infected cells. A such result suggests that ZIKV has ability to prevent the ER stress-mediated activation of pro-apoptotic genes in relation with CHOP factor.

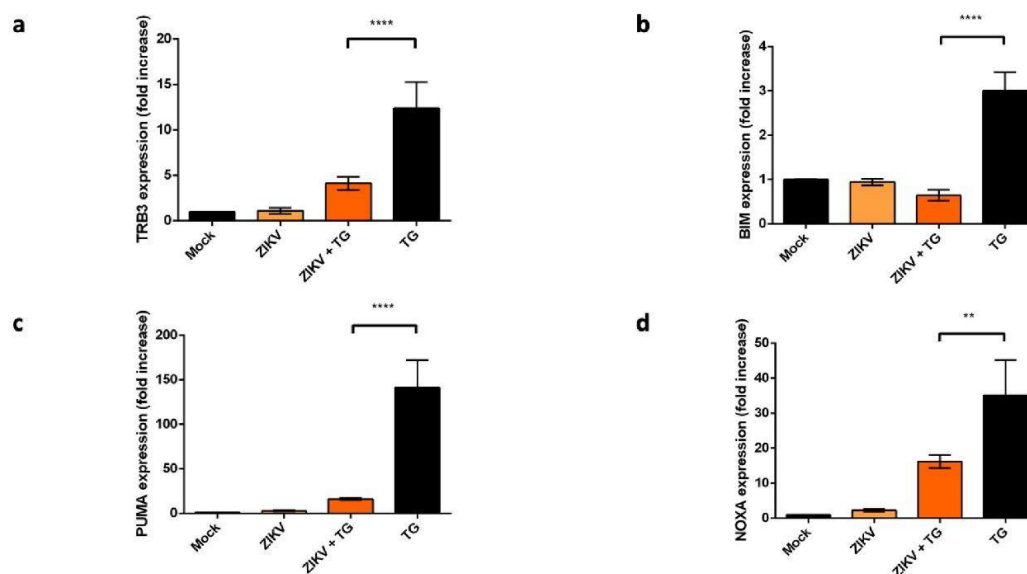


Figure 5. Transcriptional activity of CHOP-dependent genes. qRT-PCR analysis of TRB3 (a), BIM (b), PUMA (c) and NOXA (d) mRNAs were performed in A549 cells. The cells were harvested 24 h after being or not infected with ZIKV at MOI = 5 or treated 4 h with TG 20 h.p.i with ZIKV. Our positive control cells were treated with TG for 4 h. Data were presented as mean SEM ($n = 3$). **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ vs. mock.

3. Discussion

The ER is an intracellular compartment that plays a major role in cell biological activities. More than a third of the total proteins produced in the cells, especially those destined for residence in ER, Golgi apparatus, lysosomes or cytoplasmic membrane are synthesized, folded and processed in the ER [38]. Several factors can break the ER homeostasis, trigger ER stress and further induce an accumulation of misfolded or unfolded proteins. In order to cope with the ER stress, the cells activate UPR. This response is in principle cytoprotective, reestablish the ER features and prevent the cytotoxic effect of the unfolded accumulated proteins. If the ER stress is severe, prolonged and not properly resolved, the UPR ends up with cellular apoptosis [39]. The C/EBP homologous protein CHOP is a transcription factor induced by UPR system and considered as a pivotal trigger for ER stress-induced apoptosis. A convergence and persistence of UPR pathways govern the expression of CHOP, as Chop/DDIT3 transcriptional activation is known to be under the control of the stress transcription factors ATF4, ATF6f and Xbp-1(s). Several studies have shown that a partial UPR activation does not affect CHOP expression with PERK/ATF4 and IRE1 pathways remaining the main pathways responsible for the induction of CHOP expression [40]. CHOP expression is also conditioned by the shift between unphosphorylated and phosphorylated forms of eIF2 α during UPR, shift also required for ATF4 translation [33]. Once expressed and translocated in the nucleus, CHOP is a transcriptional activator of several genes among which are pro-apoptotic genes (Figure 1). Apoptosis that follows CHOP upregulation is thus due to CHOP's ability to tip the balance between anti- and pro-apoptotic factors towards a dominant pro-apoptotic activity.

During their replication, flaviviruses induce ER remodelling with membrane proliferation and ER lumen expansion related to accumulation of viral structural and non-structural proteins [41]. An excessive folding activity is then prone to induce an ER stress in the infected cells and lead to apoptosis in the face of an impossible return to normality. The acti-

vation of the apoptosis promoting transcription factor CHOP during UPR is then emerging as a general response to ER-tropic viruses, replicating in the ER [42,43].

Given that a relative cell health is the guarantee that drives efficient viral multiplication and that, symmetrically, UPR and apoptosis can be effective antiviral responses, it is not surprising that viruses interfere with the crosstalk between ER stress, UPR and apoptosis responses. The flavivirus family is no exception to the rule. Several, like DENV and WNV have been shown to activate the three UPR branches [44,45]. Other modulates the host UPR signalling pathways in order to promote viral replication and maintain their persistence in infected cells [28]. Our recent study has shown that only the PERK and IRE1 branches are activated by ZIKV with the ATF6 branch that seems to be inhibited in A549 infected cells [25]. Concerning the issues related to the ER stress outcome, many viruses have shown their capacity to trigger an UPR that upregulates the expression of CHOP protein and leads to cell death. HCV activates UPR and induces apoptosis by upregulating GADD153/CHOP expression [46]. Both WNV and Japanese encephalitis virus (JEV) elicit UPR and initiate apoptosis by the induction of CHOP [43,47]. On the other hand, other studies showed that some viruses do not induce the expression of CHOP protein despite their induction of ER stress and activation of the UPR system. One of these viruses is the murine coronavirus, mouse hepatitis virus (MHV) that activates only a part of the PERK UPR branch with ATF4 expression but without its downstream genes GADD153/CHOP and GADD34 [46].

Given that ZIKV induces ER stress but leads to incomplete UPR [25], we focused on the expression of CHOP in order to understand the mechanism that delays apoptosis in ZIKV-infected A549 cells [30]. We found that although *Chop/DDIT3* transcription was upregulated (Figure 3), we could not detect the CHOP protein in ZIKV infected cells (Figure 4). This was coherent with an UPR leading to increasing amounts of spliced Xbp-1 and nuclear translocation of ATF4 (Figure 2). As CHOP transcripts were detectable, a non-detectable CHOP at the protein level raised several questions. CHOP could have been expressed in the presence of ZIKV but at a level below the threshold of immunodetection. A quantitative check by Western Blotting, after a fixation step of the transferred proteins on the NC membrane [37] confirmed the lack of CHOP in infected cells. More surprisingly, ZIKV was able to induce a missing CHOP despite addition of an exogenous UPR inducer. Analysis of the transcripts of pro-apoptotic genes, whose expression is 'CHOP-dependent', like TRB3, BIM, PUMA and NOXA, shows no activation of their transcription. The lack of CHOP target genes upregulation reinforces the fact that CHOP protein is absent. In addition, a defect in the CHOP protein may also explain why we previously found that ZIKV-infected cells exhibited an increased amount of the anti-apoptotic protein Bcl-2. The upkeep of Bcl-2, normally down-regulated by CHOP can be a significant advantage in maintaining an anti-apoptotic environment during the time of viral replication [30].

The total lack of a CHOP protein signal in ZIKV infected cells or in cells infected and treated with a pharmacological inducer of UPR does not support the hypothesis that CHOP protein synthesis took place and was followed by its rapid degradation. The most likely reason for the absence of CHOP is a lack of protein synthesis due to a translational defect. Therefore, we hypothesize that ZIKV interferes with a complete UPR activation [25] to ensure persistent ER stress which will be useful to the virus to increase its replication. This leads to CHOP transcriptional activation, but to escape the pro-apoptotic effects of CHOP protein, ZIKV is able to inhibit the translation of CHOP messengers.

The translation of CHOP is known to be dependent on phosphorylated eIF2 α . Since we have shown that the PERK pathway is active in ZIKV infected cells, with an effective production of the ATF4 factor (under the same translational control), the lack of CHOP translation cannot be attributed to an eIF2 α phosphorylation defect. The way in which ZIKV leads to an inability of CHOP mRNAs to be translated requires further investigation. It will be interesting to identify which specific ZIKV determinants are involved in UPR induction and CHOP regulation. To decipher which viral determinant is able to interfere with CHOP expression, experiments in which each viral protein could be individually expressed need to be conducted. If ZIKV interferes with UPR through the binding of a

viral factor to a host protein, identification of the partners could further be achieved using mass spectrometry or nuclear magnetic resonance, following co-immunoprecipitation. This will provide insights into the mechanistic details of ER stress-mediated cell survival and apoptosis during ZIKV infection. Interestingly, it will make it possible to identify how to disrupt a key mechanism of the cell suicide in situations of persistent and pathological ER stress. It is of note that some research has been conducted on other viruses and might guide our future work on such a topic. Depending on the virus, structural or non-structural proteins have been identified as being able to act on the UPR pathways leading to apoptosis. The capsid protein and its import into the cell nucleus have been shown to be a major player in the control of these cellular responses [48–51]. A viral non-structural protein NSP2-mediated mechanism has been reported for Chikungunya virus ability to shut-off UPR pathways [52]. In addition, American Swine Fever virus was shown to inhibit CHOP induction through recruitment of protein phosphatase 1 by its DP71L protein, leading to dephosphorylation of eIF2 α [53]. Concerning the Cytomegalovirus, a M50-dependent proteasomal degradation of IRE1 has been observed, inhibiting the UPR fatal outcomes in infected cells [54]. Surprisingly, such interaction between ZIKV viral factors and UPR-related proteins remains poorly documented, except recently for E protein and GRP78/BiP [55], and represents a crucial scope for future investigations.

It might also be interesting to study how ZIKV deals with the presence of a functional CHOP protein, as there are no studies that establish the effect of CHOP on viral replication. Infectious Bronchitis Virus (IBV)-induced apoptosis is attenuated in CHOP-deficient cells and virus replication is inhibited [56]. In contrast, in CHOP-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs), WNV infection increases significantly compared to wild-type MEFs [44]. These studies suggest that CHOP-induced apoptosis is beneficial to IBV replication but not to WNV replication. It would be interesting to know what is going on with ZIKV.

4. Materials and Methods

4.1. Virus, Cell Culture, Antibodies and Reagents

For ZIKV we used the clinical isolate PF13 (French Polynesia, 2013) which is the epidemic strain of Asian origin [57] and a molecular clone of MR766 which is the historical strain of African origin [58]. A549 cells (ATCC, CCL-185) and HuH7 were cultured at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere in MEM medium supplemented with 10% of heat-inactivated foetal bovine serum (FBS).

Immunodetection of the viral envelope protein was performed using either the rabbit anti-EDIII ZIKV or the mouse anti-pan flavivirus envelope E protein monoclonal antibody (4G2), produced by RD Biotech. To detect ATF4 and CHOP proteins expression, we used the monoclonal rabbit anti-ATF4 and the mouse monoclonal anti-CHOP, 9C8 (in Figure 4) from ThermoFisher and the rabbit polyclonal anti-CHOP/GAD153 from BioVision (Figure S1). For the secondary antibodies, donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 594 IgG antibodies were obtained from Invitrogen (ThermoFisher, Les Ulis, France). To induce ER stress and activate the UPR, Thapsigargin (TG), an endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase inhibitor was used at 1 μ M for an incubation time of 4 h. TG was purchased from Sigma-aldrich (Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France). To induce proteasome inhibition, we used bortezomib/Velcade purchased from Janssen-Cilag, Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA USA, and Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C., Raritan, NJ, USA.

4.2. RNA Extraction and qRT-PCR

Total RNA has been extracted from cells by using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, GERMANY cat. nos. 74134 and 74136). The total cDNA was obtained by RT using E reverse primer (5'-TTCACCTTGTGTTGGGC-3') and M-MLV reverse transcriptase enzyme at 42 °C for 50 min. cDNA was subjected to a quantitative PCR, using a CFX96 Real Time Detection System (BioRad, Hercule, CA, USA). For amplification, GoTaq Master Mix (Promega, Charbonnières-les-bains, France) and different specific primers were used

to follow ATF4, Xbp-1(s), GRP78, CHOP, TRB3, BIM, PUMA, NOXA and GAPDH gene transcripts. A threshold cycle (Ct) was calculated for each single sample amplification reaction using the CFX96 program (Bio-Rad) in the exponential phase of amplification. CHOP was normalized to the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) reference.

4.3. Immunofluorescence Assay

A549 cells were grown, infected with ZIKV at MOI 5 or treated with TG on glass coverslips. They were further fixed with 3.7% paraformaldehyde at room temperature for 10 min. Fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. Coverslips were incubated with primary antibodies (1:1000 dilution) in 1% BSA-PBS 1X for two hours to block nonspecific binding of the antibodies and then with Alexa Fluor-conjugated (Alexa 488 and Alexa 594) secondary antibodies (1:1000, Invitrogen) for one hour. 4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride (DAPI) staining (1:500) was used to reveal the nucleus morphology. Cells were washed 3 times with PBS for 5 min between each incubation. VECTASHIELD® purchased from Vector Lab, Eurobio scientific, Les Ulis, France, was used to mount the coverslips. Slides were kept at 4 °C and fluorescence was then visualized using a Nikon Eclipse E2000-U microscope. By using a Hamamatsu ORCA2 ER camera and the imaging software NIS-Element AR, images were captured and processed.

4.4. Cell Extracts Preparation and Western Blotting Optimization

Cells were infected with ZIKV at MOI 5, treated only with TG or treated with TG post-infection and harvested at the indicated time points as presented in the legend of the Figures 3 and 4. To lyse the cells, they were rapidly washed before with Phosphate buffer saline (PBS) and lysed at the concentration of 1×10^4 cells. μL^{-1} with the RIPA (radioimmunoprecipitation assay) lysis buffer added drop by drop while keeping the tubes containing the cells on ice. The lysates were then collected in tubes, sonicated and centrifuged for 20 min at 12,000 rpm. The supernatant was collected and treated with BCA for the protein dosage. These fractions were next used for western blots. The proteins were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane.

In order to improve the detection of CHOP protein, an additional glutaraldehyde (GA) fixing step has been added to the conventional protocol as previously indicated [37]. The nitrocellulose membrane was fixed with glutaraldehyde (GA) 0.5% in PBS 1X for 5 min. The membrane was next washed three times with PBS-Tween (0.1%) and blocked using 5% non-fat dry milk in PBS-Tween for 1 h at room temperature. Then it was incubated with the mouse anti-CHOP antibody (1:1000 dilutions in PBS-Tween) over night (ON) at 4 °C. Anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugated was used as secondary antibody (1:2000 dilutions in PBS-Tween). The membrane was washed three times for 5 min each with PBS-Tween and then incubated for 1 h with the secondary antibody. The blots were detected using chemiluminescence detection kit (Amersham ECL Select) and exposed on an Amersham imager 680.

4.5. Statistical Analysis

Our results were statistically analyzed using the software Graph-Pad Prism 7.0. One-way ANOVA test and Student *t*-test were performed to compare between the different experimental conditions. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant for Student *t*-test. The degrees of significance are indicated on the figure. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

5. Conclusions

Together, the results allowed us to conclude that ZIKV, even though responsible for ER stress and associated UPR, impaired the expression of CHOP and consequently the upregulation of its proapoptotic targets. Surprisingly, ZIKV did not affect the expected upregulation of CHOP mRNA transcripts in the A549 infected cells but prevented the CHOP protein expression, also in presence of an exogenous UPR inducer. Ultimately,

our research reveals that ZIKV regulates CHOP expression at either translational or post-translational level (Figure 6).

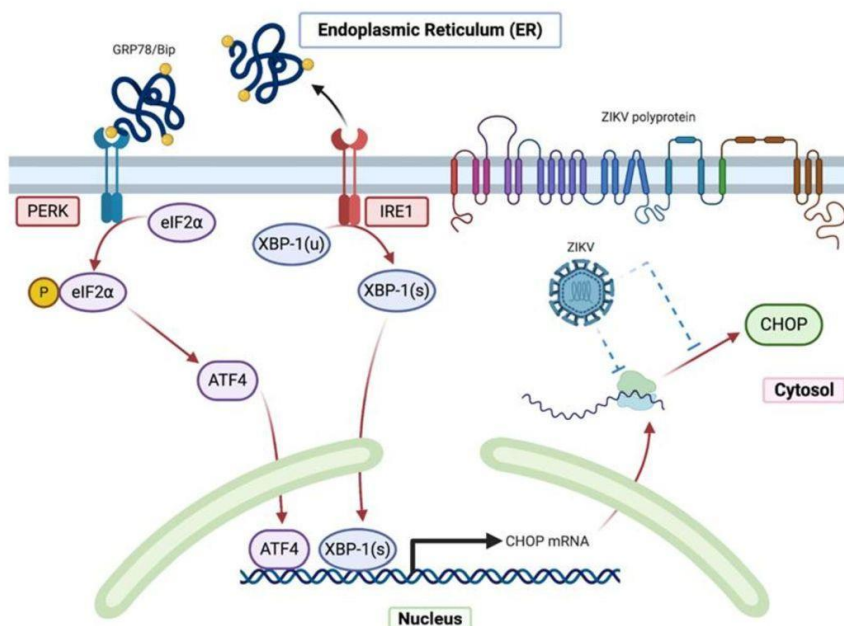


Figure 6. Graphical overview of the impaired expression of CHOP during ZIKV infection.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22073750/s1>, Figure S1: Immunofluorescence detection of ZIKV envelope (ZIKV-E, DIII, green) expressing cells and CHOP protein (red) in HuH7 cells infected or not with ZIKV-MR766 at MOI = 5 for 24h, further treated or not with TG and treated or not with Bortezomib for 4 h at 20 h.p.i. CHOP nuclear localization was controlled with the panel of cells treated with TG for 4 h. Nuclei were stained with DAPI (blue). h.p.i: hours post-infection, Figure S2: Immunofluorescence detection of ZIKV envelope (ZIKV-E, DIII, green) expressing cells and CHOP protein (red) in HuH7 cells infected or not with ZIKV-MR766 at MOI = 5 for 24 h, further treated or not with TG and treated or not with Bortezomib for 4 h at 20 h.p.i. CHOP nuclear localization was controlled with the panel of cells treated with TG for 4 h. Nuclei were stained with DAPI (blue). h.p.i: hours post-infection.

Author Contributions: Conceptualization, J.T., D.E.-S., W.V. and P.K.-T.; methodology, J.T., D.E.-S., G.L.; E.F., W.V. and P.K.-T.; formal analysis, J.T., D.E.-S., G.L.; E.F., W.V. and P.K.-T.; investigation, resources, data curation, P.D.; W.V. and P.K.-T.; writing—original draft preparation, J.T., D.E.-S., W.V. and P.K.-T.; writing—review and editing, J.T., D.E.-S., G.L.; supervision, W.V. and P.K.-T.; funding acquisition, P.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the ZIKAlert project (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0001902). E.F. holds a fellowship from the Regional Council of Reunion Island (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0012406). J.T. has a Ph.D. degree scholarship from La Réunion Island University (Ecole Doctorale STS), funded by the French ministry MEESR.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this paper and Supplementary Materials.

Acknowledgments: We thank the members of PIMIT and DÉTROIT laboratories for helpful discussions. We are grateful to Steeve Bourane for the critical review of the manuscript and for the English spelling. We also thank Valérie Choumet for providing us the rabbit anti-ZIKV EDIII antibodies. Figures 1 and 6 were created with Biorender.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Faria, N.R.; da Silva Azevedo, R.D.; Kraemer, M.U.G.; Souza, R.; Cunha, M.S.; Hill, S.C.; Théze, J.; Bonsall, M.B.; Bowden, T.A.; Rissanan, I.; et al. Zika Virus in the Americas: Early Epidemiological and Genetic Findings. *Science* **2016**, *352*, 345–349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Sakkas, H.; Bozidis, P.; Giannakopoulos, X.; Sofikitis, N.; Papadopoulou, C. An Update on Sexual Transmission of Zika Virus. *Pathogens* **2018**, *7*, 66. [\[CrossRef\]](#)
3. Sager, G.; Gabaglio, S.; Sztul, E.; Belov, G.A. Role of Host Cell Secretory Machinery in Zika Virus Life Cycle. *Viruses* **2018**, *10*, 559. [\[CrossRef\]](#)
4. Ropidi, M.I.M.; Khazali, A.S.; Rashid, N.N.; Yusof, R. Endoplasmic reticulum: A focal point of Zika virus infection. *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 27. [\[CrossRef\]](#)
5. Lin, D.L.; Inoue, T.; Chen, Y.-J.; Chang, A.; Tsai, B.; Tai, A.W. The ER Membrane Protein Complex Promotes Biogenesis of Dengue and Zika Virus Non-Structural Multi-Pass Transmembrane Proteins to Support Infection. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 1666–1674. [\[CrossRef\]](#)
6. Schwarz, D.S.; Blower, M.D. The Endoplasmic Reticulum: Structure, Function and Response to Cellular Signaling. *Cell Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 79–94. [\[CrossRef\]](#)
7. Xu, C.; Bailly-Maitre, B.; Reed, J.C. Endoplasmic Reticulum Stress: Cell Life and Death Decisions. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2656–2664. [\[CrossRef\]](#)
8. Schröder, M.; Kaufman, R.J. ER Stress and the Unfolded Protein Response. *Mutat. Res.* **2005**, *569*, 29–63. [\[CrossRef\]](#)
9. Corazzari, M.; Gagliardi, M.; Fimia, G.M.; Piacentini, M. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front. Oncol.* **2017**, *7*. [\[CrossRef\]](#)
10. Zhu, G.; Lee, A.S. Role of the Unfolded Protein Response, GRP78 and GRP94 in Organ Homeostasis: UPR and GRPs regulate organ homeostasis. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230*, 1413–1420. [\[CrossRef\]](#)
11. Smith, M.H.; Ploegh, H.L.; Weissman, J.S. Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Science* **2011**, *334*, 1086–1090. [\[CrossRef\]](#)
12. Bergmann, T.J.; Molinari, M. Three Branches to Rule Them All? UPR Signalling in Response to Chemically versus Misfolded Proteins-Induced ER Stress. *Biol. Cell* **2018**, *110*, 197–204. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Iurlaro, R.; Muñoz-Pinedo, C. Cell Death Induced by Endoplasmic Reticulum Stress. *FEBS J.* **2016**, *283*, 2640–2652. [\[CrossRef\]](#)
14. Marciniak, S.J.; Yun, C.Y.; Oyadomari, S.; Novoa, I.; Zhang, Y.; Jungreis, R.; Nagata, K.; Harding, H.P.; Ron, D. CHOP Induces Death by Promoting Protein Synthesis and Oxidation in the Stressed Endoplasmic Reticulum. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 3066–3077. [\[CrossRef\]](#)
15. Kim, H.; Tu, H.-C.; Ren, D.; Takeuchi, O.; Jeffers, J.R.; Zambetti, G.P.; Hsieh, J.J.-D.; Cheng, E.H.-Y. Stepwise Activation of BAX and BAK by TBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. *Mol. Cell* **2009**, *36*, 487–499. [\[CrossRef\]](#)
16. Ohoka, N.; Yoshii, S.; Hattori, T.; Onozaki, K.; Hayashi, H. TRB3, a Novel ER Stress-Inducible Gene, Is Induced via ATF4-CHOP Pathway and Is Involved in Cell Death. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1243–1255. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Li, J.; Lee, B.; Lee, A.S. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis: Multiple Pathways and Activation of P53-up-Regulated Modulator of Apoptosis (PUMA) and NOXA by P53. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 7260–7270. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Hu, H.; Tian, M.; Ding, C.; Yu, S. The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Front. Immunol.* **2019**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Han, J.; Kaufman, R.J. Physiological/Pathological Ramifications of Transcription Factors in the Unfolded Protein Response. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 1417–1438. [\[CrossRef\]](#)
20. DuRose, J.B.; Scheuner, D.; Kaufman, R.J.; Rothblum, L.I.; Niwa, M. Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 α Coordinates rRNA Transcription and Translation Inhibition during Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 4295–4307. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Blázquez, A.-B.; Escribano-Romero, E.; Merino-Ramos, T.; Saiz, J.-C.; Martín-Acebes, M.A. Stress Responses in Fla-Virus-Infected Cells: Activation of Unfolded Protein Response and Autophagy. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*. [\[CrossRef\]](#)
22. Zhang, L.; Wang, A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Gladwyn-Ng, I.; Cordon-Barris, L.; Alfano, C.; Creppe, C.; Couderc, T.; Morelli, G.; Thelen, N.; America, M.; Bessières, B.; Encha-Razavi, F.; et al. Stress-Induced Unfolded Protein Response Contributes to Zika Virus-Associated Microcephaly. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 63–71. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Tan, Z.; Zhang, W.; Sun, J.; Fu, Z.; Ke, X.; Zheng, C.; Zhang, Y.; Li, P.; Liu, Y.; Hu, Q.; et al. ZIKV Infection Activates the IRE1-XBP1 and ATF6 Pathways of Unfolded Protein Response in Neural Cells. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 275. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

25. Turpin, J.; Frumence, E.; Harrabi, W.; Haddad, J.G.; El Kalamouni, C.; Desprès, P.; Krejbich-Trotot, P.; Viranaïcken, W. Zika Virus Subversion of Chaperone GRP78/BiP Expression in A549 Cells during UPR Activation. *Biochimie* **2020**, *175*, 99–105. [\[CrossRef\]](#)
26. Chan, S.-W.; Egan, P.A. Hepatitis C Virus Envelope Proteins Regulate CHOP via Induction of the Unfolded Protein Response. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1510–1512. [\[CrossRef\]](#)
27. Yu, C.-Y.; Hsu, Y.-W.; Liao, C.-L.; Lin, Y.-L. Flavivirus Infection Activates the XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response To Cope with Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Virol.* **2006**, *80*, 11868–11880. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Ambrose, R.L.; Mackenzie, J.M. Flaviviral Regulation of the Unfolded Protein Response: Can Stress Be Beneficial? *Future Virol.* **2013**, *8*, 1095–1109. [\[CrossRef\]](#)
29. Benbrook, D.M.; Long, A. Integration of Autophagy, Proteasomal Degradation, Unfolded Protein Response and Apoptosis. *Exp. Oncol.* **2012**, *34*, 286–297.
30. Turpin, J.; Frumence, E.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. The ZIKA Virus Delays Cell Death through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. *Cells* **2019**, *8*, 1338. [\[CrossRef\]](#)
31. Gardner, B.M.; Pincus, D.; Gotthardt, K.; Gallagher, C.M.; Walter, P. Endoplasmic Reticulum Stress Sensing in the Un-Folded Protein Response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, 013169. [\[CrossRef\]](#)
32. Rozpędek, W.; Pytel, D.; Mucha, B.; Leszczyńska, H.; Diehl, J.A.; Majsterek, I. The Role of the PERK/EIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression during Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr. Mol. Med.* **2016**, *16*, 533–544. [\[CrossRef\]](#)
33. Han, J.; Back, S.H.; Hur, J.; Lin, Y.-H.; Gildersleeve, R.; Shan, J.; Yuan, C.L.; Krokowski, D.; Wang, S.; Hatzoglou, M.; et al. ER-Stress-Induced Transcriptional Regulation Increases Protein Synthesis Leading to Cell Death. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 481–490. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Lee, K.; Tirasophon, W.; Shen, X.; Michalak, M.; Prywes, R.; Okada, T.; Yoshida, H.; Mori, K.; Kaufman, R.J. IRE1-Mediated Unconventional mRNA Splicing and S2P-Mediated ATF6 Cleavage Merge to Regulate XBP1 in Signaling the Unfolded Protein Response. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 452–466. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Wang, Y.; Xing, P.; Cui, W.; Wang, W.; Cui, Y.; Ying, G.; Wang, X.; Li, B. Acute Endoplasmic Reticulum Stress-Independent Unconventional Splicing of XBP1 mRNA in the Nucleus of Mammalian Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 13302–13321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Urano, F.; Bertolotti, A.; Ron, D. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **2000**, *113 Pt 21*, 3697–3702.
37. Turpin, J.; Frumence, E.; Safadi, D.E.; Meilhac, O.; Krejbich-Trotot, P.; Viranaïcken, W. Improvement of Immunodetection of the Transcription Factor C/EBP Homologous Protein by Western Blot. *Anal. Biochem.* **2020**, *601*, 113775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Anelli, T.; Sitia, R. Protein Quality Control in the Early Secretory Pathway. *EMBO J.* **2008**, *27*, 315–327. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Wärr, A.; Cook, K.L.; Hu, R.; Jin, L.; Zwart, A.; Soto-Pantoja, D.R.; Liu, J.; Finkel, T.; Clarke, R. Autophagy and Unfolded Protein Response (UPR) Regulate Mammary Gland Involution by Restraining Apoptosis-Driven Irreversible Changes. *Cell Death Discov.* **2018**, *4*, 40. [\[CrossRef\]](#)
40. Chen, Y.; Gui, D.; Chen, J.; He, D.; Luo, Y.; Wang, N. Down-Regulation of PERK-ATF4-CHOP Pathway by Astragaloside IV Is Associated with the Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Podocyte Apoptosis in Diabetic Rats. *Cell Physiol. Biochem.* **2014**, *33*, 1975–1987. [\[CrossRef\]](#)
41. Mackenzie, J.M.; Westaway, E.G. Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear to Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and along the Secretory Pathway, Respectively. *J. Virol.* **2001**, *75*, 10787–10799. [\[CrossRef\]](#)
42. Zhao, D.; Yang, J.; Han, K.; Liu, Q.; Wang, H.; Liu, Y.; Huang, X.; Zhang, L.; Li, Y. The Unfolded Protein Response Induced by Tembusu Virus Infection. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Medigeshi, G.R.; Lancaster, A.M.; Hirsch, A.J.; Briesse, T.; Lipkin, W.I.; DeFilippis, V.; Früh, K.; Mason, P.W.; Nikolich-Zugich, J.; Nelson, J.A. West Nile Virus Infection Activates the Unfolded Protein Response, Leading to CHOP Induction and Apoptosis. *J. Virol.* **2007**, *81*, 10849–10860. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Ambrose, R.L.; Mackenzie, J.M. West Nile Virus Differentially Modulates the Unfolded Protein Response To Facilitate Replication and Immune Evasion. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2723–2732. [\[CrossRef\]](#)
45. Peña, J.; Harris, E. Dengue Virus Modulates the Unfolded Protein Response in a Time-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 14226–14236. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Ciccaglione, A.R.; Costantino, A.; Tritarelli, E.; Marcantonio, C.; Equestre, M.; Marziliano, N.; Rapicetta, M. Activation of Endoplasmic Reticulum Stress Response by Hepatitis C Virus Proteins. *Arch. Virol.* **2005**, *150*, 1339–1356. [\[CrossRef\]](#)
47. Su, H.-L.; Liao, C.-L.; Lin, Y.-L. Japanese Encephalitis Virus Infection Initiates Endoplasmic Reticulum Stress and an Un-Folded Protein Response. *J. Virol.* **2002**, *76*, 4162–4171. [\[CrossRef\]](#)
48. Bhuvanankantham, R.; Chong, M.-K.; Ng, M.-L. Specific Interaction of Capsid Protein and Importin- α/β Influences West Nile Virus Production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *389*, 63–69. [\[CrossRef\]](#)
49. Goh, G.; Dunker, A.; Foster, J.; Uversky, V. Zika and Flavivirus Shell Disorder: Virulence and Fetal Morbidity. *Biomolecules* **2019**, *9*, 710. [\[CrossRef\]](#)
50. Zhou, Y.; Gu, Y.; Qi, B.; Zhang, Y.; Li, X.; Fang, W. Porcine Circovirus Type 2 Capsid Protein Induces Unfolded Protein Response with Subsequent Activation of Apoptosis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2017**, *18*, 316–323. [\[CrossRef\]](#)
51. Airo, A.M.; Urbanowski, M.D.; Lopez-Orozco, J.; You, J.H.; Skene-Arnold, T.D.; Holmes, C.; Yamshchikov, V.; Malik-Soni, N.; Frappier, L.; Hobman, T.C. Expression of Flavivirus Capsids Enhance the Cellular Environment for Viral Replication by Activating Akt-Signalling Pathways. *Virology* **2018**, *516*, 147–157. [\[CrossRef\]](#)

52. Fros, J.J.; Major, L.D.; Scholte, F.E.M.; Gardner, J.; van Hemert, M.J.; Suhrbier, A.; Pijlman, G.P. Chikungunya Virus Non-Structural Protein 2-Mediated Host Shut-off Disables the Unfolded Protein Response. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 580–589. [\[CrossRef\]](#)
53. Zhang, F.; Moon, A.; Childs, K.; Goodbourn, S.; Dixon, L.K. The African Swine Fever Virus DP71L Protein Recruits the Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit to Dephosphorylate EIF2alpha and Inhibits CHOP Induction but Is Dispensable for These Activities during Virus Infection. *J. Virol.* **2010**, *84*, 10681–10689. [\[CrossRef\]](#)
54. Hinte, F.; Müller, J.; Brune, W. Viral Mediated Tethering to SEL1L Facilitates ER-Associated Degradation of IRE1. *J. Virol.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
55. Khongwicht, S.; Sornjai, W.; Jitobaom, K.; Greenwood, M.; Greenwood, M.P.; Hitakarun, A.; Wikan, N.; Murphy, D.; Smith, D.R. A Functional Interaction between GRP78 and Zika Virus E Protein. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 393. [\[CrossRef\]](#)
56. Liao, Y.; Fung, T.S.; Huang, M.; Fang, S.G.; Zhong, Y.; Liu, D.X. Upregulation of CHOP/GADD153 during Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Infection Modulates Apoptosis by Restricting Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *J. Virol.* **2013**, *87*, 8124–8134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Cao-Lormeau, V.-M.; Roche, C.; Teissier, A.; Robin, E.; Berry, A.-L.; Mallet, H.-P.; Sall, A.A.; Musso, D. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1084–1086. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Gadea, G.; Bos, S.; Krejbich-Trotot, P.; Clain, E.; Viranaicken, W.; El-Kalamouni, C.; Mavingui, P.; Desprès, P. A Robust Method for the Rapid Generation of Recombinant Zika Virus Expressing the GFP Reporter Gene. *Virology* **2016**, *497*, 157–162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Supplementary Materials

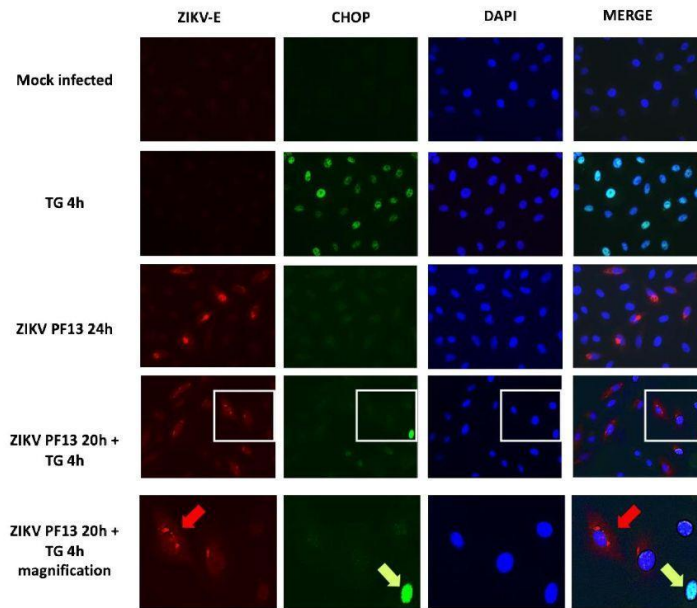


Figure S1.

Immunofluorescence detection of ZIKV envelope (ZIKV-E, 4G2 antibody, red) expressing cells and CHOP protein (green) in A549 cells infected or not with ZIKV at MOI=5 for 24h, further treated or not with TG for 4h at 20 h.p.i and cells treated with TG for 4h. The anti-CHOP used was the polyclonal anti CHOP/GAD153 from BioVision. Nuclei were stained with DAPI (blue). h.p.i: hours post-infection. A square magnification of the microscopic field of cells infected with ZIKV and treated with TG for 4h at 20 h.p.i, indicate with the red arrow a cell stained for ZIKV-E without CHOP staining in the nucleus and with the green arrow a cell which is not stained for ZIKV-E but has a CHOP staining in the nucleus.

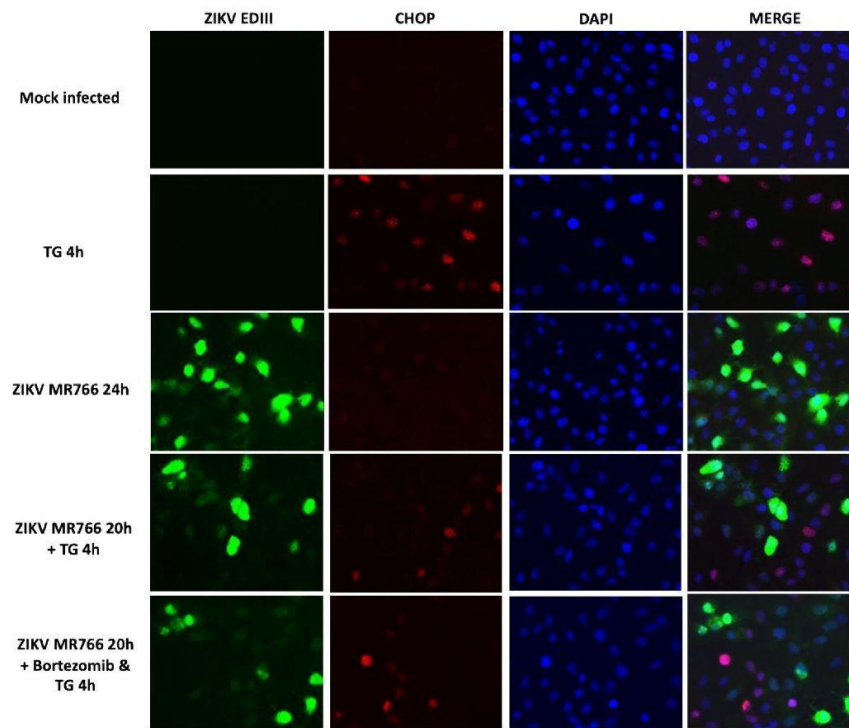


Figure S2.

Immunofluorescence detection of ZIKV envelope (ZIKV-E,DIII, green) expressing cells and CHOP protein (red) in HuH7 cells infected or not with ZIKV-MR766 at MOI=5 for 24h, further treated or not with TG and treated or not with Bortezomib for 4h at 20 h.p.i. CHOP nuclear localization was controlled with the panel of cells treated with TG for 4h. Nuclei were stained with DAPI (blue). h.p.i: hours post-infection.

5. Discussion de l'article 4

Nous avons observé que lors de la mise en place de l'UPR pour répondre au stress du RE provoqué par ZIKV, la cellule infectée tente de répondre en activant les voies PERK et IRE1. Cependant, la voie PERK semble partiellement active, car même si le facteur de transcription ATF4 conduit à l'expression du gène CHOP, l'absence de la protéine CHOP suggère qu'une régulation traductionnelle pourrait intervenir dans les cellules infectées par ZIKV. La capacité révélée de ZIKV à interférer avec l'axe PERK-ATF4-CHOP-Apoptose aboutit à une réduction de l'expression de facteurs pro-apoptotiques et *in fine* participe au maintien d'une balance intracellulaire favorable aux anti-apoptotiques. Pour ZIKV, cela constitue un nouveau levier pour aboutir à un délai supplémentaire avant l'induction de la mort par apoptose. Cette observation corrèle avec la stabilité de Bcl-2 observée dans mon premier article, car CHOP conduit normalement indirectement à la régulation à la baisse de cette protéine (**figure 31**).

En supprimant expérimentalement l'expression de CHOP, d'autres équipes ont mis en évidence un rôle pro-viral de CHOP pour certains virus comme le Infectious Bronchitis Virus (IBV) (Liao et al., 2013). Ce constat n'est pas surprenant car la suppression de CHOP conduit à une suppression de l'expression de GADD34 impliqué dans la déphosphorylation de eIF2 α , ce qui doit favoriser la traduction des ARN viraux et la synthèse des protéines virales. Il en est de même lors de l'utilisation du salubrinal (inhibiteur de la déphosphorylation de eIF2 α) qui exerce une activité anti-ZIKV en inhibant la traduction eIF2 α dépendante et en impactant directement la production de protéines virales (Amorim et al., 2017).

Les résultats que nous apportons nous conduisent cependant à penser que, pour l'accomplissement optimal du cycle viral, le bénéfice apporté par le délai d'entrée en apoptose serait supérieur à celui produit par l'augmentation de l'efficacité de la traduction des ARN viraux.

Le mécanisme du contrôle de l'axe UPR-Apoptose via CHOP est une donnée importante dans la compréhension des stratégies d'optimisation de sa multiplication par ZIKV et de sa capacité à manipuler des réponses de l'hôte. De futurs travaux devront identifier le mécanisme permettant d'inhiber sélectivement la traduction de CHOP. Nous savons que l'ARNm de CHOP contient un μ ORF avant l'ORF principale, laquelle conditionne la régulation traductionnelle en fonction du facteur eIF2 α . Il serait donc intéressant de vérifier cette régulation en condition d'infection. Des analyses par spectrométrie de masse devraient nous éclairer sur le devenir précis de CHOP et l'existence ou non du peptide synthétisé à partir de la μ ORF lors de l'infection. Les données actuellement disponibles suggèrent un maintien de eIF2 α dans un état non phosphorylé, propice à une inhibition de la traduction de CHOP (Amorim et al., 2017). Il est possible que ZIKV séquestre ce facteur d'initiation de la traduction à son propre profit, via une protéine comportant une séquence orthologue à des protéines impliquées dans des activités phosphatases, comme GADD34, lui permettant de produire une progénie plus conséquente tout en limitant la mort cellulaire par apoptose qui passe par CHOP (Rojas et al., 2015). Ainsi ATF4 serait traduit dans les premiers temps de l'infection via la réponse UPR de phosphorylation de eIF2 α . L'UPR conduirait à une transcription de CHOP via ATF4/XBP1s mais un mécanisme à identifier de subversion par ZIKV de l'état de eIF2 α aboutirait à une absence de traduction de CHOP dans les cellules infectées.

Il est évidemment nécessaire, comme perspectives à ce travail, d'identifier le ou les facteurs viraux impliqués dans le mécanisme d'inhibition sélective de la traduction de CHOP par ZIKV.

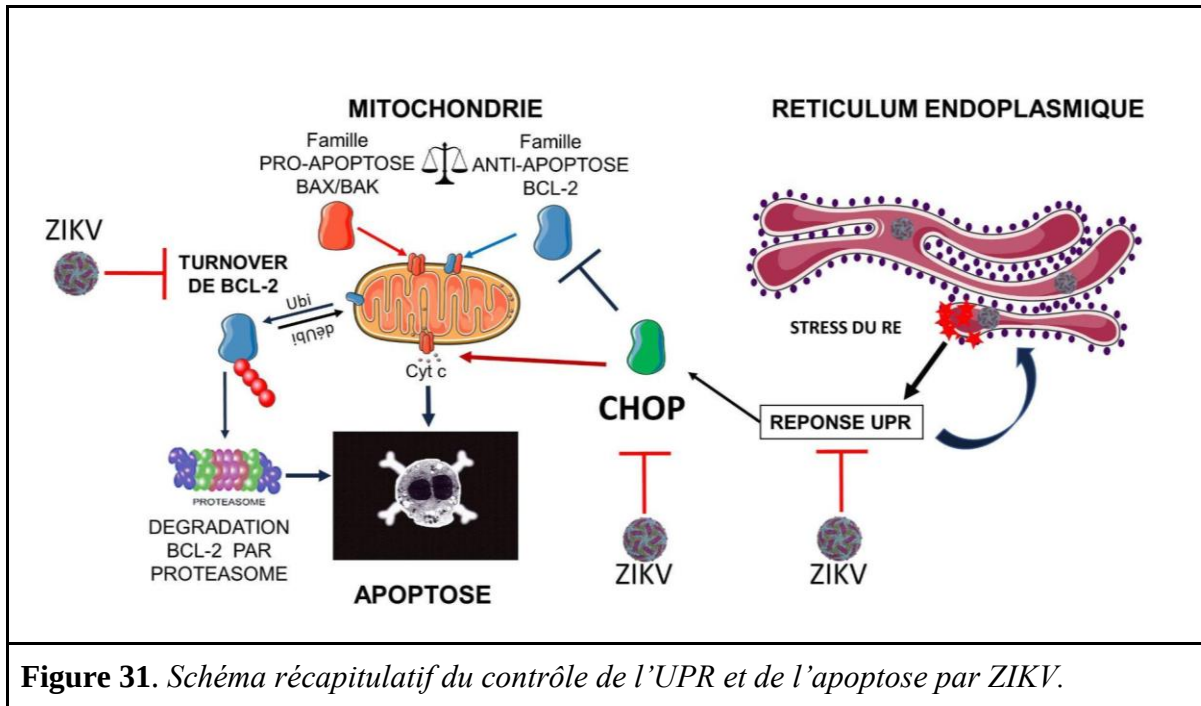


Figure 31. Schéma récapitulatif du contrôle de l'UPR et de l'apoptose par ZIKV.

IV. Discussion générale et perspectives

En l'espace d'une décennie, l'émergence de plusieurs épidémies a mis en danger la santé humaine à l'échelle mondiale. Cette pression est due à la menace de pathogènes principalement viraux qui n'épargnent aucune région, quels que soient les niveaux économiques ou les capacités médicales des pays, comme on a pu le constater avec la pandémie de SARS-CoV2 et l'épidémie antérieure certes infiniment plus modeste et discrète de Zika entre 2007 et 2019. Dans ce contexte, la connaissance des agents infectieux, de leurs mécanismes de dissémination/transmission dans l'environnement et de leurs interactions avec leurs hôtes en particulier humain est indispensable. Cette accumulation de connaissances est nécessaire pour faire face aux risques d'émergences ou de ré-émergence et aux épidémies et pandémies actuelles et futures. La compréhension de la mécanistique des interactions hôte-pathogène à l'échelle cellulaire et moléculaire est à cet égard primordiale dans la perspective du développement de stratégies préventives et/ou thérapeutiques. Parmi les réponses cellulaires et moléculaires déterminantes pour éliminer le pathogène mais susceptibles de participer aux processus pathologiques, il y a la mort cellulaire par apoptose que j'ai choisi d'étudier au cours du processus infectieux du virus Zika. Tout comme l'être humain évalue les bénéfices/risques d'une action, la cellule doit faire un choix entre survie et autodestruction pour résoudre une infection. Pour se faire, l'évolution a sélectionné un programme qui, à l'aide d'une balance entre des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques, permet à la cellule de s'orienter vers le suicide ou la survie. Le processus infectieux de ZIKV semble être un magnifique exemple de manipulation de cette balance pro mort ou survie de la cellule hôte. Mes travaux ont montré que ZIKV, comme d'autres

Flavivirus (comme le JEV, le WNV ou encore le TBEV), est capable d'induire l'apoptose dans divers modèles de cellules infectées *in vitro*, mais que cette mort cellulaire est retardée pour n'intervenir qu'au moment où le virus a atteint le maximum de production de sa progénie. Ce retard dans le déclenchement de la mort cellulaire implique les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou Bcl-xL dont la stabilité et la demi-vie est augmentée par un mécanisme qui reste à définir. Il implique aussi un défaut d'induction de l'expression de facteurs pro-apoptotiques (Bim, PUMA, NOXA,...) qui font cruellement défaut pour faire pencher la balance. Ce défaut provient d'une capacité de ZIKV à 'pirater' la voie de communication entre le stress du RE, l'UPR et l'apoptose en inhibant le facteur CHOP.

L'ensemble des données converge donc vers un modèle de virus qui contrecarre l'apoptose en raison de son effet antiviral. D'autres études décrivent qu'une paraptose est parfois induite par ZIKV, avec une hyper vacuolisation cellulaire sans activation de caspase. Ce phénomène pourrait être mis en place au lieu d'une mort par apoptose et il permettrait apparemment au virus de se répliquer plus abondamment dans la cellule (Monel et al., 2017). Cela confirme que l'apoptose est une réponse qui s'effectue au détriment du virus.

Se pose alors la question de l'impact d'un retard d'apoptose dans les processus physiopathologiques et de clairance virale au cours de l'infection par ZIKV.

Comme déjà évoqué, la littérature fait état de cas de complications neurologiques intervenant post partum et donc post infection (Mulkey et al., 2020; van der Linden et al., 2016). Ces cas qui ne sont pas anecdotiques indiquent que le virus pourrait persister dans le système nerveux central ou produire des effets cytopathiques à distance de l'infection initiale. De plus, une persistance virale extrêmement longue a été observée dans le liquide séminal,

mettant en cause un défaut de la voie apoptotique pour expliquer une clairance imparfaite favorisant le maintien du virus dans l'organisme (Huits et al., 2017; Mead et al., 2018; Winkler et al., 2017). Une étude clinique sur des cas de microcéphalies fatales montre une augmentation de deux fois la quantité de la protéine Bcl-2 dans les parenchymes de nouveaux nés infectés par ZIKV comparé à des microcéphalies Zika indépendantes (Sousa et al., 2018), laissant supposer un rôle des protéines anti apoptotiques comme Bcl-2 dans la persistance virale, lors de l'infection et les complications neurologiques associées. Mes résultats sont donc en cohérence avec ces différentes observations. Le retard et/ou défaut d'apoptose des cellules infectées par ZIKV est très certainement responsable des différentes manifestations consécutives à un défaut de clairance virale en phase aiguë de l'infection et à une persistance virale dans différents tissus. La persistance virale pourrait en effet être responsable des caractéristiques de ZIKV décrites spécifiquement lors des dernières épidémies, comme les syndromes congénitaux observés post-partum ou encore la transmission sexuelle inhabituelle chez les flavivirus.

Mes travaux ont également montré que ZIKV interfère avec une réponse UPR complète induite suite au stress du RE provoqué par sa réplication. La manipulation de l'UPR est une stratégie permettant à ZIKV d'optimiser son cycle de multiplication au sein des endomembranes stressées de la cellule hôte mais surtout, lui fournit un levier pour retarder la mort cellulaire. Nous avons ainsi démontré que ZIKV est capable de limiter l'expression de gènes pro-apoptotiques normalement induits par l'UPR en agissant sur le facteur transcriptionnel CHOP. Ces mécanismes moléculaires de contrôle des voies menant au programme d'autodestruction cellulaire permettent d'apporter une première partie de l'explication de la persistance de ZIKV observée dans plusieurs tissus. La capacité à retarder

l'apoptose semble conservée pour les différents virus que nous avons utilisés (Souche asiatique avec l'isolat clinique de Polynésie Française et le clone moléculaire du virus brésilien ou souche historique africaine avec le clone moléculaire de MR766). Cela suggère que cette caractéristique est intrinsèque à l'espèce plus qu'à une souche en particulier, même si des différences quantitatives (capacité accrue de manipulation de l'apoptose par la souche épidémique brésilienne) pourraient exister, comme c'est le cas pour la manipulation de la réponse interféron (Xia et al., 2018). D'autres mécanismes aboutissant à un retard de la mort cellulaire pourraient être mis en place lors de l'infection par ZIKV. Ainsi, des protéines impliquées dans la remodelisation du réseau endomembranaire, comme la valosin containing protein (VCP) qui participe à la genèse des sites de réplication, semblent limiter les effets cytopathiques (Anton et al., 2021).

Les facteurs viraux impliqués dans le retard d'apoptose n'ont pour le moment pas été clairement identifiés, néanmoins, nos données montrent que les protéines non structurales de ZIKV sont suffisantes pour retarder la mort cellulaire induite, de manière intrinsèque ou extrinsèque. La demi-vie de plusieurs facteurs pro-apoptotiques étant prolongée lors de l'infection par ZIKV, il serait intéressant de vérifier le statut et les activités enzymatiques du protéasome lors de l'infection. De plus, si nous avons réussi à déterminer la région non-structurale comme étant impliquée dans ce retard d'apoptose, il serait intéressant d'identifier le ou les facteurs viraux jouant un rôle dans ce mécanisme. Nous n'excluons ni la possibilité qu'il s'agisse d'une des protéines non structurales, ni qu'il puisse s'agir d'un ARN subgénomique viral qui pourrait agir sur des miRNA cellulaires. De même, si nous avons mis en évidence une absence d'activation de l'expression de gènes pro-apoptotiques via l'inhibition de l'activité de CHOP, le ou les facteurs viraux impliqués restent à identifier. De

récentes données impliqueraient la protéine prM dans le mécanisme, avec un lien entre la glycosylation des protéines prM et la présence de CHOP dans le noyau (Gwon et al., 2020). Comme dit précédemment la persistance virale pourrait être expliquée par un défaut d'apoptose dans certains tissus. Cette hypothèse soulève des pistes thérapeutiques, avec des candidats antiviraux qui pourraient être des sensibilisateurs à l'apoptose, tels que des inhibiteurs de la famille Bcl-2 ou encore des molécules imitant les suppresseurs d'inhibiteurs de l'apoptose (protéines SMAC/DIABLO synthétiques). Basée sur cette théorie, une stratégie antivirale a fait sensation en 2011. En fusionnant le domaine de reconnaissance des ARNs double brin de la protéine PKR et le domaine d'interaction avec les caspases (CARD) de la protéine Apaf1 (Rider et al., 2011) Double-stranded RNA (dsRNA) Activated Caspase Oligomerizer (DRACO) a montré une activité antivirale à large spectre et une absence de toxicité dans les cellules murines, humaines et chez les primates non humains. Il a permis une réduction de 80% de mortalité dans un modèle murin d'infection par le virus H1N1 A/PR/8/34. Cette technologie semble avoir été reprise en 2020 et est en développement par une start-up pharmaceutique ("Our Work," n.d.). L'approfondissement des connaissances académiques pourrait servir ainsi à améliorer les dispositifs tel que celui-ci pour enrayer l'émergence de plusieurs pathogènes.

V. Conclusion

Toutes les observations et données que j'ai pu obtenir convergent vers une capacité de ZIKV à manipuler l'apoptose et la réponse UPR au cours du processus infectieux. Cette manipulation se fait évidemment au profit du virus, de manière à contrer les effets antiviraux produits par la mort cellulaire. Les résultats obtenus durant ma thèse ont pu mettre en évidence un retard de l'apparition des effets cytopathiques consécutifs à l'infection par ZIKV dans de nombreux types cellulaires, cellules épithéliales pulmonaires humaines A549, cellules astrocytaires humaines (U251MG), cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293) et cellules épithéliales de rein d'un singe vert africain (Vero). Ces résultats sont en accord avec plusieurs autres études sur le défaut ou le délai de mort cellulaire observé dans plusieurs modèles d'infection *in vitro*, mais aussi *in vivo*. Le retard de l'apoptose est dû au maintien dans les premiers temps de l'infection d'un fort contexte anti-apoptotique dans les cellules. Cet effet cytoprotecteur dominant est imputable à une stabilisation et/ou une absence de dégradation des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-xL) et à un défaut de dérégulation de l'expression de gènes codant les facteurs pro-apoptotiques (Bim, Puma, Noxa) en raison de l'absence du facteur transcriptionnel pro-apoptotique CHOP. La défaillance de ce système de contrôle qui doit normalement aboutir à l'élimination des cellules infectées et du pathogène est un facteur de risque de persistance du virus sur des périodes plus longues que celle de la phase aiguë de l'infection. Des données cliniques sur des cerveaux microcéphaliques de nouveau nés infectés ou non par ZIKV ont montré une augmentation de la protéine Bcl-2 dans les microcéphalies ZIKV positives, ouvrant justement l'hypothèse d'une persistance virale médiée par une surexpression des protéines anti-apoptotiques (Sousa et al., 2018). Nos résultats montrent aussi que la réponse

UPR est partielle lors de l'infection par ZIKV et qu'elle conduit à une persistance du stress du RE sans pour autant aboutir à l'autodestruction cellulaire. Premièrement la réponse ATF6 semble inexistante dans notre modèle A549, limitant l'expression de protéines chaperonnes telles que BiP ou GRP94, ce qui semble bénéfique au cycle viral. Ensuite, mes résultats montrent que ZIKV inhibe sélectivement l'activité transcriptionnelle dépendante de CHOP qui aboutit en principe à la mise en place d'un programme pro-apoptotique. Cette inhibition repose sur l'absence totale de CHOP, via un mécanisme post transcriptionnel à identifier. L'interférence de l'axe UPR-ATF4-CHOP-Apoptose appuie le retard d'apoptose observé et caractérisé dans mon premier article. Maintenant les causes qui conduisent finalement à l'apoptose dans certains types cellulaires, alors que le virus interfère avec cette réponse pour la retarder sont à identifier. Certaines pistes ont été explorées, comme la perturbation du cycle cellulaire et l'activation du facteur suppresseur de tumeur p53. Cette protéine conduit à un statut pro-apoptotique dominant, qui prendrait le dessus sur la réponse anti-apoptotique apportée par la stabilisation de Bcl-2. Parmi les protéines pro-apoptotiques qui pourraient finir par dominer la situation, Bax pourrait jouer un rôle dans l'induction de la mort consécutive au stress du RE en perméabilisant la membrane du réticulum. Cette activité de Bax est décrite comme pouvant conduire à des mouvements calciques au niveau du RE, lesquels activeraient une mort cellulaire plus tardive que via CHOP, soit par la voie intrinsèque classique, soit par l'activation de la caspase 12 qui est déjà connue pour être une voie antivirale chez d'autres virus comme le WNV (Wang et al., 2010, p. 12). Ces données expliquent donc pour partie le retard de l'apoptose observé dans plusieurs modèles et ouvrent surtout de nouvelles pistes sur l'étiologie de la pathogenèse et la persistance virale

(figure 32), ainsi que sur les risques associées à une réémergence épidémique de ZIKV plus que probable pour les raisons citées dans l'introduction.

Enfin, deux résultats majeurs de ma thèse montrent une inhibition d'une part de la réponse adaptative dite de compensation (GRP78/BiP) et d'autre part de la réponse de décompensation (CHOP). Ces altérations des réponses de compensation et décompensation vont conduire à une persistance du stress du RE avec un déséquilibre de l'état redox provoquant la formation d'agrégats protéiques tel que nous l'avons observé *in vitro*. Nous pensons que ce déséquilibre pourrait participer aux pathologies neurologiques observées dans le cadre d'infection par ZIKV. Il pourrait également être à l'origine de complications neurologiques qui pourraient apparaître à plus long terme.

Outre les complications observées chez les nouveau-nés, la mise en évidence de neuropathologies apparues chez les enfants après la naissance (van der Linden et al., 2016) interroge en effet sur les mécanismes impliqués à distance de l'infection aiguë. Il a également été mis en évidence des complications neurologiques associées au ZIKV chez les adultes ainsi que la présence du virus au niveau du liquide céphalo-rachidien et du cerveau (da Silva et al., 2017). Des données révèlent que le virus peut atteindre les neurones matures chez l'adulte et produire des effets néfastes sur le fonctionnement neuronal (Cp et al., 2019). Finalement, des travaux récents suggèrent qu'en raison de l'induction de marqueurs moléculaires identiques, l'exposition à ZIKV pourrait contribuer à plus long terme au développement de pathologies neurodégénératives chez les adultes (Alfano et al., 2019; Beys-da-Silva et al., 2020). Le repliement inadéquat et l'agrégation de protéines particulières constituent les mécanismes sous-jacents aux principales maladies neurodégénératives

associées au vieillissement humain. La formation de ces agrégats intervient de nombreuses années avant que les symptômes ne deviennent visibles. Nos travaux révèlent qu'une formation et potentielle accumulation d'agrégats protéiques intervient au cours de l'infection *in vitro* par ZIKV (Turpin et al., 2019). Nous formulons ainsi une nouvelle hypothèse selon laquelle l'infection par ZIKV génère des agrégats de protéines virales mal repliées et oligomérisées en raison d'un stress du reticulum mal résolu et que ces agrégats pourraient contribuer à un processus neurodégénératif. Cette hypothèse de travail constitue un nouveau paradigme pour la compréhension des neuropathies associée aux infections par le virus Zika (**Figure 32**).

Il me semble donc que Zika continue de rester une menace qu'il ne faudrait pas négliger, en raison des risques de la ré-émergence du virus mais également si des effets à long terme se vérifient en raison de sa persistance ou de sa capacité à produire une neuropathogénèse à distance de l'infection. Toutes ces données justifient de continuer une recherche fondamentale sur les interactions de ce virus avec ses différents hôtes afin de mieux comprendre les mécanismes infectieux et pathogéniques.

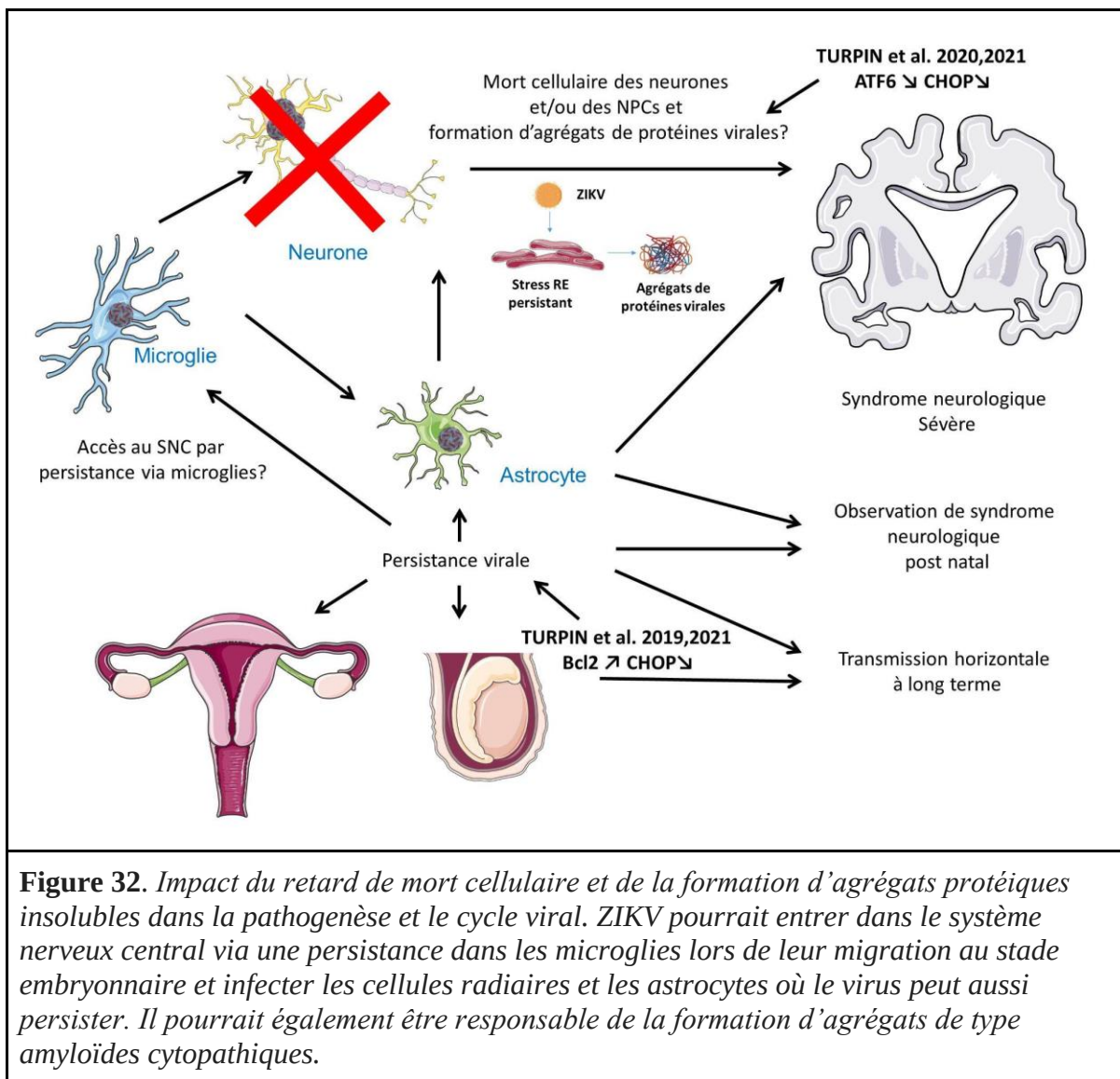


Figure 32. Impact du retard de mort cellulaire et de la formation d'agrégats protéiques insolubles dans la pathogenèse et le cycle viral. ZIKV pourrait entrer dans le système nerveux central via une persistance dans les microglies lors de leur migration au stade embryonnaire et infecter les cellules radiaires et les astrocytes où le virus peut aussi persister. Il pourrait également être responsable de la formation d'agrégats de type amyloïdes cytopathiques.

Références:

- (3) How to detect CHOP (GADD153) with Western Blot? [WWW Document], n.d. . ResearchGate. URL https://www.researchgate.net/post/How_to_detect_CHOP_GADD153_with_Western_Blot (accessed 5.18.21).
- Abbink, P., Stephenson, K.E., Barouch, D.H., 2018. Zika virus vaccines. *Nat Rev Microbiol* 16, 594–600. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0039-7>
- 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. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix171>
- Alfano, C., Gladwyn-Ng, I., Couderc, T., Lecuit, M., Nguyen, L., 2019. The Unfolded Protein Response: A Key Player in Zika Virus-Associated Congenital Microcephaly. *Front Cell Neurosci* 13, 94. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00094>
- Ali, M.G., Zhang, Z., Gao, Q., Pan, M., Rowan, E.G., Zhang, J., 2020. Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview. *Immunol Res* 68, 325–339. <https://doi.org/10.1007/s12026-020-09159-z>
- Ali, S., Gugliemini, O., Harber, S., Harrison, A., Houle, L., Ivory, J., Kersten, S., Khan, R., Kim, J., LeBoa, C., Nez-Whitfield, E., O'Marr, J., Rothenberg, E., Segnitz, R.M., Sila, S., Verwillow, A., Vogt, M., Yang, A., Mordecai, E.A., 2017. Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11, e0005135. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005135>
- Almasy, K.M., Davies, J.P., Lisy, S.M., Tirgar, R., Tran, S.C., Plate, L., 2021. Small-molecule endoplasmic reticulum proteostasis regulator acts as a broad-spectrum inhibitor of dengue and Zika virus infections. *PNAS* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2012209118>
- Al-Qattan, M.M., 2019. A Review of the Genetics and Pathogenesis of Syndactyly in Humans and Experimental Animals: A 3-Step Pathway of Pathogenesis. *Biomed Res Int* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9652649>
- Amara, A., Mercer, J., 2015. Viral apoptotic mimicry. *Nature Reviews Microbiology* 13, 461–469. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3469>
- Amaral, M.P., Apostolico, J. de S., Tomita, N., Coirada, F.C., Lunardelli, V.A.S., Fernandes, E.R., Souza, H.F.S., Astray, R.M., Boscardin, S.B., Rosa, D.S., 2020. Homologous prime-boost with Zika virus envelope protein and poly (I:C) induces robust specific humoral and cellular immune responses. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.03.037>

- Amorim, R., Temzi, A., Griffin, B.D., Mouland, A.J., 2017. Zika virus inhibits eIF2 α -dependent stress granule assembly. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11, e0005775. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005775>
- Anfasa, F., Siegers, J.Y., van der Kroeg, M., Mumtaz, N., Stalin Raj, V., de Vrij, F.M.S., Widagdo, W., Gabriel, G., Salinas, S., Simonin, Y., Reusken, C., Kushner, S.A., Koopmans, M.P.G., Haagmans, B., Martina, B.E.E., van Riel, D., 2017. Phenotypic Differences between Asian and African Lineage Zika Viruses in Human Neural Progenitor Cells. *mSphere* 2. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00292-17>
- Annamalai, A.S., Pattnaik, A., Sahoo, B.R., Guinn, Z.P., Bullard, B.L., Weaver, E.A., Steffen, D., Natarajan, S.K., Petro, T.M., Pattnaik, A.K., 2019. An Attenuated Zika Virus Encoding Non-Glycosylated Envelope (E) and Non-Structural Protein 1 (NS1) Confers Complete Protection against Lethal Challenge in a Mouse Model. *Vaccines (Basel)* 7. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030112>
- Anton, A., Mazeaud, C., Freppel, W., Gilbert, C., Tremblay, N., Sow, A.A., Roy, M., Rodrigue-Gervais, I.G., Chatel-Chaix, L., 2021. Valosin-containing protein ATPase activity regulates the morphogenesis of Zika virus replication organelles and virus-induced cell death. *Cellular Microbiology* 23, e13302. <https://doi.org/10.1111/cmi.13302>
- Aragao, M.F.V.V., Holanda, A.C., Brainer-Lima, A.M., Petribu, N.C.L., Castillo, M., Linden, V. van der, Serpa, S.C., Tenório, A.G., Travassos, P.T.C., Cordeiro, M.T., Sarteschi, C., Valenca, M.M., Costello, A., 2017. Nonmicrocephalic Infants with Congenital Zika Syndrome Suspected Only after Neuroimaging Evaluation Compared with Those with Microcephaly at Birth and Postnatally: How Large Is the Zika Virus “Iceberg”? *American Journal of Neuroradiology* 38, 1427–1434. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5216>
- Atieh, T., Baronti, C., de Lamballerie, X., Nougairède, A., 2016. Simple reverse genetics systems for Asian and African Zika viruses. *Sci Rep* 6, 39384. <https://doi.org/10.1038/srep39384>
- Atyame, C.M., Pasteur, N., Dumas, E., Tortosa, P., Tantely, M.L., Pocquet, N., Licciardi, S., Bheecarry, A., Zumbo, B., Weill, M., Duron, O., 2011. Cytoplasmic Incompatibility as a Means of Controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* Mosquito in the Islands of the South-Western Indian Ocean. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5, e1440. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001440>
- Au, W.C., Moore, P.A., Lowther, W., Juang, Y.T., Pitha, P.M., 1995. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *PNAS* 92, 11657–11661. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11657>

- Aubrey, B.J., Kelly, G.L., Janic, A., Herold, M.J., Strasser, A., 2018. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death & Differentiation* 25, 104–113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>
- Aubry, F., Jacobs, S., Darmuzey, M., Lequime, S., Delang, L., Fontaine, A., Jupatanakul, N., Miot, E.F., Dabo, S., Manet, C., Montagutelli, X., Baidaliuk, A., Gámbaro, F., Simon-Lorière, E., Gilsoul, M., Romero-Vivas, C.M., Cao-Lormeau, V.-M., Jarman, R.G., Diagne, C.T., Faye, Oumar, Faye, Ousmane, Sall, A.A., Neyts, J., Nguyen, L., Kaptein, S.J.F., Lambrechts, L., 2021. Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nature Communications* 12, 916. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21199-z>
- Au-Yeung, N., Mandhana, R., Horvath, C.M., 2013. Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. *JAKSTAT* 2. <https://doi.org/10.4161/jkst.23931>
- Avril, T., Vauléon, E., Chevet, E., 2017. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis* 6, e373–e373. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.72>
- Ayers, J.B., Coatsworth, H.G., Kang, S., Dinglasan, R.R., Zhou, L., 2021. Clustered rapid induction of apoptosis limits ZIKV and DENV-2 proliferation in the midguts of *Aedes aegypti*. *Communications Biology* 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01614-9>
- Baek, J.-H., Mamula, D., Tingstam, B., Pereira, M., He, Y., Svenningsson, P., 2019. GRP78 Level Is Altered in the Brain, but Not in Plasma or Cerebrospinal Fluid in Parkinson's Disease Patients. *Front. Neurosci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00697>
- Bagasra, O., Addanki, K.C., Goodwin, G.R., Hughes, B.W., Pandey, P., McLean, E., 2017. Cellular Targets and Receptor of Sexual Transmission of Zika Virus. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 25, 679–686. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000580>
- Bailey, M.J., Broecker, F., Duehr, J., Arumemi, F., Krammer, F., Palese, P., Tan, G.S., 2019. Antibodies Elicited by an NS1-Based Vaccine Protect Mice against Zika Virus. *mBio* 10. <https://doi.org/10.1128/mBio.02861-18>
- Barbosa, S., Kay, K., Chitnis, N., Hastings, I.M., 2018. Modelling the impact of insecticide-based control interventions on the evolution of insecticide resistance and disease transmission. *Parasites & Vectors* 11, 482. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3025-z>
- Barnard, T.R., Rajah, M.M., Sagan, S.M., 2017. Zika virus infection: induction, restriction and evasion of host interferon responses. *Future Virology* 12, 627–630. <https://doi.org/10.2217/fvl-2017-0099>

- Baz, M., Boivin, G., 2019. Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections. *Pharmaceuticals (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/ph12030101>
- Beaver, J.T., Lelutiu, N., Habib, R., Skountzou, I., 2018. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Front Immunol* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01640>
- Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., Carrieri, M., 2013. Pilot Field Trials With *Aedes albopictus* Irradiated Sterile Males in Italian Urban Areas. *Journal of Medical Entomology* 50, 317–325. <https://doi.org/10.1603/ME12048>
- Berger, A., 2000. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 321, 424. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.424>
- Bernatchez, J.A., Tran, L.T., Li, J., Luan, Y., Siqueira-Neto, J.L., Li, R., 2020. Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. *J. Med. Chem.* 63, 470–489. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00775>
- Beys-da-Silva, W.O., Quincozes-Santos, A., Tureta, E.F., Rosa, R.L., Berger, M., Bobermin, L.D., Souza, D.O., Guimarães, J.A., Santi, L., 2020. Association between Zika virus and future neurological diseases. *Journal of the Neurological Sciences* 409. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.116617>
- Bhagat, R., Prajapati, B., Narwal, S., Agnihotri, N., Adlakha, Y.K., Sen, J., Mani, S., Seth, P., 2018. Zika virus E protein alters the properties of human fetal neural stem cells by modulating microRNA circuitry. *Cell Death Differ* 25, 1837–1854. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0163-y>
- Bialik, S., Dasari, S.K., Kimchi, A., 2018. Autophagy-dependent cell death – where, how and why a cell eats itself to death. *J Cell Sci* 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.215152>
- Billen, L.P., Shamas-Din, A., Andrews, D.W., 2008. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* 27, S93–S104. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.47>
- Bode, L., Vraga, E.K., 2018. See Something, Say Something: Correction of Global Health Misinformation on Social Media. *Health Communication* 33, 1131–1140. <https://doi.org/10.1080/10410236.2017.1331312>
- Bos, S., Viranaicken, W., Turpin, J., El-Kalamouni, C., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., Desprès, P., Gadea, G., 2018. The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells. *Virology* 516, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.003>
- Bouchecareilh, M., Chevet, E., 2009. Stress du réticulum endoplasmique - Une réponse pour éviter le pIRE. *Med Sci (Paris)* 25, 281–287. <https://doi.org/10.1051/medsci/2009253281>

- Bowie, A.G., Unterholzner, L., 2008. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 8, 911–922. <https://doi.org/10.1038/nri2436>
- Boyer, S., Calvez, E., Chouin-Carneiro, T., Diallo, D., Failloux, A.-B., 2018. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and Infection, Focus on Zika* 20, 646–660. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>
- Braakman, I., Hebert, D.N., 2013. Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013201>
- Brasil, P., Pereira, J.P., Moreira, M.E., Ribeiro Nogueira, R.M., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R.S., Valderramos, S.G., Halai, U.-A., Salles, T.S., Zin, A.A., Horovitz, D., Daltro, P., Boechat, M., Raja Gabaglia, C., Carvalho de Sequeira, P., Pilotto, J.H., Medialdea-Carrera, R., Cotrim da Cunha, D., Abreu de Carvalho, L.M., Pone, M., Machado Siqueira, A., Calvet, G.A., Rodrigues Baião, A.E., Neves, E.S., Nassar de Carvalho, P.R., Hasue, R.H., Marschik, P.B., Einspieler, C., Janzen, C., Cherry, J.D., Bispo de Filippis, A.M., Nielsen-Saines, K., 2016. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine* 375, 2321–2334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>
- Brent, C., Dunn, A., Savage, H., Faraji, A., Rubin, M., Risk, I., Garcia, W., Cortese, M., Novosad, S., Krow-Lucal, E.R., Crain, J., Hill, M., Atkinson, A., Peterson, D., Christensen, K., Dimond, M., Staples, J.E., Nakashima, A., 2016. Preliminary Findings from an Investigation of Zika Virus Infection in a Patient with No Known Risk Factors - Utah, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65, 981–982. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6536e4>
- Brush, M.H., Weiser, D.C., Shenolikar, S., 2003. Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 α to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the α Subunit of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2. *Mol Cell Biol* 23, 1292–1303. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.4.1292-1303.2003>
- Byrne, A.B., Talarico, L.B., 2021. Role of the complement system in antibody-dependent enhancement of flavivirus infections. *International Journal of Infectious Diseases* 103, 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.039>
- Campos, G.S., Bandeira, A.C., Sardi, S.I., 2015. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21, 1885–1886. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>
- Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A.-L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S.K., Willison, H.J., Musset, L., Manuguerra, J.-C., Despres, P., Fournier, E., Mallet, H.-P., Musso, D., Fontanet, A., Neil, J., Ghawché, F., 2016. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a

- case-control study. *The Lancet* 387, 1531–1539. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
- Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A.-L., Mallet, H.-P., Sall, A.A., Musso, D., 2014. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 20, 1085–1086. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140138>
- Carrillo-Hernández, M.Y., Ruiz-Saenz, J., Villamizar, L.J., Gómez-Rangel, S.Y., Martínez-Gutierrez, M., 2018. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC Infectious Diseases* 18, 61. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-2976-1>
- Cavalcanti, M.G., Cabral-Castro, M.J., Gonçalves, J.L.S., Santana, L.S., Pimenta, E.S., Peralta, J.M., 2017. Zika virus shedding in human milk during lactation: an unlikely source of infection? *International Journal of Infectious Diseases* 57, 70–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.042>
- CDC, 2020. Congenital Zika Syndrome & Other Birth Defects | CDC [WWW Document]. Centers for Disease Control and Prevention. URL <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html> (accessed 3.7.21).
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J., 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351–2354. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2351>
- Chan, J.F.W., Choi, G.K.Y., Yip, C.C.Y., Cheng, V.C.C., Yuen, K.-Y., 2016. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection* 72, 507–524. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>
- Chan, M.S., Winneg, K., Hawkins, L., Farhadloo, M., Jamieson, K.H., Albarracín, D., 2018. Legacy and social media respectively influence risk perceptions and protective behaviors during emerging health threats: A multi-wave analysis of communications on Zika virus cases. *Social Science & Medicine* 212, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2018.07.007>
- Chapman, E.G., Costantino, D.A., Rabe, J.L., Moon, S.L., Wilusz, J., Nix, J.C., Kieft, J.S., 2014. The Structural Basis of Pathogenic Subgenomic Flavivirus RNA (sfRNA) Production. *Science* 344, 307–310. <https://doi.org/10.1126/science.1250897>
- Chen, H.-R., Lai, Y.-C., Yeh, T.-M., 2018. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. *Journal of Biomedical Science* 25, 58. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0462-0>
- Chen, L., Flies, D.B., 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>

- Chen, P., Nirula, A., Heller, B., Gottlieb, R.L., Boscia, J., Morris, J., Huhn, G., Cardona, J., Mocherla, B., Stosor, V., Shawa, I., Adams, A.C., Van Naarden, J., Custer, K.L., Shen, L., Durante, M., Oakley, G., Schade, A.E., Sabo, J., Patel, D.R., Klekotka, P., Skovronsky, D.M., 2021. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19. *New England Journal of Medicine* 384, 229–237. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2029849>
- Chiramel, A.I., Best, S.M., 2018. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. *Virus Research, Advances in ZIKA Research* 254, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.006>
- Choi, Y., Bowman, J.W., Jung, J.U., 2018. Autophagy during viral infection — a double-edged sword. *Nature Reviews Microbiology* 16, 341–354. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0003-6>
- Chouin-Carneiro, T., David, M.R., Nogueira, F. de B., Santos, F.B. dos, Lourenço-de-Oliveira, R., 2020. Zika virus transmission by Brazilian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* is virus dose and temperature-dependent. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14, e0008527. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008527>
- Chouin-Carneiro, T., Santos, F.B. dos, 2017. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors. *Biological Control of Pest and Vector Insects*. <https://doi.org/10.5772/66946>
- Chow, J., Franz, K.M., Kagan, J.C., 2015. PRRs are watching you: Localization of innate sensing and signaling regulators. *Virology* 0, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.051>
- Chung, K.M., Liszewski, M.K., Nybakken, G., Davis, A.E., Townsend, R.R., Fremont, D.H., Atkinson, J.P., Diamond, M.S., 2006. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19111–19116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605668103>
- Clain, E., Haddad, J.G., Koishi, A.C., Sinigaglia, L., Rachidi, W., Desprès, P., N. Duarte dos Santos, C., Guiraud, P., Jouvenet, N., El Kalamouni, C., 2019. The Polyphenol-Rich Extract from *Psiloxylon mauritianum*, an Endemic Medicinal Plant from Reunion Island, Inhibits the Early Stages of Dengue and Zika Virus Infection. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20081860>
- Clain, E., Sinigaglia, L., Koishi, A.C., Gorgette, O., Gadea, G., Viranaicken, W., Krejbich-Trotot, P., Mavingui, P., Desprès, P., Nunes Duarte dos Santos, C., Guiraud, P., Jouvenet, N., El Kalamouni, C., 2018. Extract from *Aphloia theiformis*, an edible indigenous plant from Reunion Island, impairs Zika virus attachment to the host cell surface. *Scientific Reports* 8, 10856. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29183-2>
- Clem, R.J., 2016. Arboviruses and apoptosis: the role of cell death in determining vector competence. *J Gen Virol* 97, 1033–1036. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000429>

- Collins, M.H., McGowan, E., Jadi, R., Young, E., Lopez, C.A., Baric, R.S., Lazear, H.M., de Silva, A.M., 2017. Lack of Durable Cross-Neutralizing Antibodies Against Zika Virus from Dengue Virus Infection. *Emerg Infect Dis* 23, 773–781. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161630>
- Conde, J.N., Schutt, W.R., Mladinich, M., Sohn, S.-Y., Hearing, P., Mackow, E.R., 2020. NS5 Sumoylation Directs Nuclear Responses That Permit Zika Virus To Persistently Infect Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *J Virol* 94. <https://doi.org/10.1128/JVI.01086-20>
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E.G., Neufeldt, C.J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., Schorb, M., Pruunsild, P., Schwab, Y., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A., Bartenschlager, R., 2017. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep* 18, 2113–2123. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>
- Counotte, M.J., Kim, C.R., Wang, J., Bernstein, K., Deal, C.D., Broutet, N.J.N., Low, N., 2018. Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. *PLoS Med* 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002611>
- Cp, F., Fgq, B.-A., Rls, N., Ps, F., C, S., Ino, S., Jd, Z., Dc, Z., Vl, de S., As, S., Ala, G., M, B., J, M. de S., Sv, A.-L., Ga, N., Ha, P.-N., Ng, C., Fg, D.F., I, A.-M., Jr, C., At, D.P., St, F., 2019. Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. *Nat Commun* 10, 3890–3890. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11866-7>
- Cugola, F.R., Fernandes, I.R., Russo, F.B., Freitas, B.C., Dias, J.L.M., Guimarães, K.P., Benazzato, C., Almeida, N., Pignatari, G.C., Romero, S., Polonio, C.M., Cunha, I., Freitas, C.L., Brandão, W.N., Rossato, C., Andrade, D.G., Faria, D. de P., Garcez, A.T., Buchpigel, C.A., Braconi, C.T., Mendes, E., Sall, A.A., Zanotto, P.M. de A., Peron, J.P.S., Muotri, A.R., Beltrão-Braga, P.C.B., 2016. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 534, 267–271. <https://doi.org/10.1038/nature18296>
- Cui, W., Li, J., Ron, D., Sha, B., 2011. The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 423–428. <https://doi.org/10.1107/S0907444911006445>
- Cunha, A.J.L.A. da, de Magalhães-Barbosa, M.C., Lima-Setta, F., Medronho, R. de A., Prata-Barbosa, A., 2017. Microcephaly Case Fatality Rate Associated with Zika Virus Infection in Brazil: Current Estimates. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 36, 528–530. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001486>
- Cunha, M.S., Esposito, D.L.A., Rocco, I.M., Maeda, A.Y., Vasami, F.G.S., Nogueira, J.S., Souza, R.P. de, Suzuki, A., Addas-Carvalho, M., Barjas-Castro, M. de L., Resende, M.R., Stucchi, R.S.B., Boin, I. de F.S.F., Katz, G., Angerami, R.N., Fonseca, B.A.L. da, 2016. First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus)

- from an Autochthonous Transmission in Brazil. *Genome Announc.* 4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00032-16>
- da Silva, I.R.F., Frontera, J.A., Bispo de Filippis, A.M., Nascimento, O.J.M. do, RIO-GBS-ZIKV Research Group, 2017. Neurologic Complications Associated With the Zika Virus in Brazilian Adults. *JAMA Neurol* 74, 1190–1198. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.1703>
- Dagan, N., Barda, N., Kepten, E., Miron, O., Perchik, S., Katz, M.A., Hernán, M.A., Lipsitch, M., Reis, B., Balicer, R.D., 2021. BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *New England Journal of Medicine* 0, null. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101765>
- Dang, J., Tiwari, S.K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V.S., Eroshkin, A.M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014>
- Danial, N.N., 2007. BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death. *Clin Cancer Res* 13, 7254–7263. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1598>
- Darnell, J., Kerr, I., Stark, G., 1994. Jak-Stat Pathways and Transcriptional Activation in Response to Ifns and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* 264, 1415–1421. <https://doi.org/10.1126/science.8197455>
- de Almagro, M.C., Vucic, D., 2012. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol* 34, 200–211.
- de Sousa, J.R., Azevedo, R. do S. da S., Quaresma, J.A.S., Vasconcelos, P.F. da C., 2019. Cell Death And Zika Virus: An Integrated Network Of The Mechanisms Of Cell Injury. *Infect Drug Resist* 12, 2917–2921. <https://doi.org/10.2147/IDR.S209213>
- Decuyper, J.-P., Parys, J.B., Bultynck, G., 2012. Regulation of the Autophagic Bcl-2/Beclin 1 Interaction. *Cells* 1, 284–312. <https://doi.org/10.3390/cells1030284>
- Depraetere, V., 2000. “Eat me” signals of apoptotic bodies. *Nature Cell Biology* 2, E104–E104. <https://doi.org/10.1038/35014098>
- Diarra, I., Nurtop, E., Sangaré, A.K., Sagara, I., Pastorino, B., Sacko, S., Zeguimé, A., Coulibaly, D., Fofana, B., Gallian, P., Priet, S., Drexler, J.F., Failloux, A.-B., Dabo, A., Thera, M.A., Djimdé, A., Kouriba, B., Cauchemez, S., de Lamballerie, X., Hozé, N., Doumbo, O.K., 2020. Zika Virus Circulation in Mali. *Emerg Infect Dis* 26, 945–952. <https://doi.org/10.3201/eid2605.191383>

- Dick, G.W.A., Kitchen, S.F., Haddow, A.J., 1952. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46, 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Dikic, I., Elazar, Z., 2018. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
- Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A.M., 1999. Dephosphorylation Targets Bcl-2 for Ubiquitin-dependent Degradation: A Link between the Apoptosome and the Proteasome Pathway. *J Exp Med* 189, 1815–1822.
- Dong, H., Ray, D., Ren, S., Zhang, B., Puig-Basagoiti, F., Takagi, Y., Ho, C.K., Li, H., Shi, P.-Y., 2007. Distinct RNA Elements Confer Specificity to Flavivirus RNA Cap Methylation Events. *Journal of Virology* 81, 4412–4421. <https://doi.org/10.1128/JVI.02455-06>
- Dörner, T., Radbruch, A., 2007. Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity* 27, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.002>
- Drappier, M., Michiels, T., 2015. Inhibition of the OAS/RNase L pathway by viruses. *Curr Opin Virol* 15, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.07.002>
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., 2000. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* 102, 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00008-8)
- 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., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M., Hayes, E.B., 2009. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine* 360, 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., 1999. Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 68, 383–424. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.383>
- Echavarria-Consuegra, L., Smit, J.M., Reggiori, F., 2019. Role of autophagy during the replication and pathogenesis of common mosquito-borne flavi- and alphaviruses. *Open Biol* 9. <https://doi.org/10.1098/rsob.190009>
- Eguchi, K., 2001. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 40, 275–284. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.40.275>

- Eisenstein, E.M., Williams, C.B., 2009. The T reg /Th17 Cell Balance: A New Paradigm for Autoimmunity. *Pediatric Research* 65, 26–31. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e76c7>
- El Sahly, H.M., Gorchakov, R., Lai, L., Natrajan, M.S., Patel, S.M., Atmar, R.L., Keitel, W.A., Hoft, D.F., Barrett, J., Bailey, J., Edupuganti, S., Raabe, V., Wu, H.M., Fairley, J., Roupheal, N., Murray, K.O., Mulligan, M.J., 2018. Clinical, Virologic, and Immunologic Characteristics of Zika Virus Infection in a Cohort of US Patients: Prolonged RNA Detection in Whole Blood. *Open Forum Infect Dis* 6. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy352>
- El-Bacha, T., Midlej, V., Pereira da Silva, A.P., Silva da Costa, L., Benchimol, M., Galina, A., Da Poian, A.T., 2007. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772, 1158–1166. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.08.003>
- Evans, A.S., Lennemann, N.J., Coyne, C.B., 2020. BPIFB3 Regulates Endoplasmic Reticulum Morphology To Facilitate Flavivirus Replication. *J Virol* 94. <https://doi.org/10.1128/JVI.00029-20>
- Falcao, M.B., Cimerman, S., Luz, K.G., Chebabo, A., Brigido, H.A., Lobo, I.M., Timerman, A., Angerami, R.N., da Cunha, C.A., Bacha, H.A., Alves, J.R., Barbosa, A.N., Teixeira, R.F., Weissmann, L., Oliveira, P.R., Cyrillo, M.A., Bandeira, A.C., 2016. Management of infection by the Zika virus. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 15, 57. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0172-y>
- Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S., Megeney, L.A., 2002. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11025–11030. <https://doi.org/10.1073/pnas.162172899>
- Ferraris, P., Cochet, M., Hamel, R., Gladwyn-Ng, I., Alfano, C., Diop, F., Garcia, D., Talignani, L., Montero-Menei, C.N., Nougairède, A., Yssel, H., Nguyen, L., Couplier, M., Missé, D., 2019. Zika virus differentially infects human neural progenitor cells according to their state of differentiation and dysregulates neurogenesis through the Notch pathway. *Emerg Microbes Infect* 8, 1003–1016. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1637283>
- Février, M., Dorgham, K., Rebollo, A., 2011. CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis. *Viruses* 3, 586–612. <https://doi.org/10.3390/v3050586>
- Fibriansah, G., Ng, T.-S., Kostyuchenko, V.A., Lee, J., Lee, S., Wang, J., Lok, S.-M., 2013. Structural Changes in Dengue Virus When Exposed to a Temperature of 37°C. *J Virol* 87, 7585–7592. <https://doi.org/10.1128/JVI.00757-13>

- Fink, S.L., Cookson, B.T., 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun* 73, 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- Fontes-Garfias, C.R., Shan, C., Luo, H., Muruato, A.E., Medeiros, D.B.A., Mays, E., Xie, X., Zou, J., Roundy, C.M., Wakamiya, M., Rossi, S.L., Wang, T., Weaver, S.C., Shi, P.-Y., 2017. Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein. *Cell Rep* 21, 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.016>
- Fradin, M.S., Day, J.F., 2002. Comparative Efficacy of Insect Repellents against Mosquito Bites. *New England Journal of Medicine* 347, 13–18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011699>
- Franco, E.D., Lytrivi, M., Ibrahim, H., Montaser, H., Wakeling, M.N., Fantuzzi, F., Patel, K., Demarez, C., Cai, Y., Igoillo-Esteve, M., Cosentino, C., Lithovius, V., Vihinen, H., Jokitalo, E., Laver, T.W., Johnson, M.B., Sawatani, T., Shakeri, H., Pachera, N., Haliloglu, B., Ozbek, M.N., Unal, E., Yıldırım, R., Godbole, T., Yildiz, M., Aydin, B., Bilheu, A., Suzuki, I., Flanagan, S.E., Vanderhaeghen, P., Senée, V., Julier, C., Marchetti, P., Eizirik, D.L., Ellard, S., Saarimäki-Vire, J., Otonkoski, T., Cnop, M., Hattersley, A.T., 2020. *YIPF5* mutations cause neonatal diabetes and microcephaly through endoplasmic reticulum stress. *J Clin Invest* 130, 6338–6353. <https://doi.org/10.1172/JCI141455>
- Frumence, E., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., El-Kalamouni, C., Nativel, B., Rondeau, P., Missé, D., Gadea, G., Viranaicken, W., Desprès, P., 2016. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology* 493, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.006>
- Fu, Q., Fu, T.-M., Cruz, A.C., Sengupta, P., Thomas, S.K., Wang, S., Siegel, R.M., Wu, H., Chou, J.J., 2016. Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor. *Mol Cell* 61, 602–613. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.009>
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D.W., Fasano, A., Miller, G.W., Miller, A.H., Mantovani, A., Weyand, C.M., Barzilai, N., Goronzy, J.J., Rando, T.A., Effros, R.B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., Slavich, G.M., 2019. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine* 25, 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
- Gabriel, E., Ramani, A., Karow, U., Gottardo, M., Natarajan, K., Gooi, L.M., Goranci-Buzhala, G., Krut, O., Peters, F., Nikolic, M., Kuivanen, S., Korhonen, E., Smura, T., Vapalahti, O., Papantonis, A., Schmidt-Chanasit, J., Riparbelli, M., Callaini, G., Krönke, M., Utermöhlen, O., Gopalakrishnan, J., 2017. Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell* 20, 397–406.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.005>

- Gadea, G., Bos, S., Krejbich-Trotot, P., Clain, E., Viranaicken, W., El-Kalamouni, C., Mavingui, P., Desprès, P., 2016. A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology* 497, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.015>
- Gal-Ben-Ari, S., Barrera, I., Ehrlich, M., Rosenblum, K., 2019. PKR: A Kinase to Remember. *Front. Mol. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00480>
- García, C.C., Vázquez, C.A., Giovannoni, F., Russo, C.A., Cordo, S.M., Alaimo, A., Damonte, E.B., 2020. Cellular Organelles Reorganization During Zika Virus Infection of Human Cells. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01558>
- Garcia, M., Wehbe, M., Lévêque, N., Bodet, C., 2017. Skin innate immune response to flaviviral infection. *European Cytokine Network* 28, 41–51. <https://doi.org/10.1684/ecn.2017.0394>
- Garg, H., Mehmetoglu-Gurbuz, T., Joshi, A., 2020. Virus Like Particles (VLP) as multivalent vaccine candidate against Chikungunya, Japanese Encephalitis, Yellow Fever and Zika Virus. *Sci Rep* 10, 4017. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61103-1>
- Garg, H., Mehmetoglu-Gurbuz, T., Joshi, A., 2018. Recent Advances in Zika Virus Vaccines. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10110631>
- Gass, J.N., Gunn, K.E., Sriburi, R., Brewer, J.W., 2004. Stressed-out B cells? Plasma-cell differentiation and the unfolded protein response. *Trends in Immunology* 25, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.11.004>
- Gebiola, M., Giorgini, M., Kelly, S.E., Doremus, M.R., Ferree, P.M., Hunter, M.S., 2017. Cytological analysis of cytoplasmic incompatibility induced by *Cardinium* suggests convergent evolution with its distant cousin *Wolbachia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284, 20171433. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1433>
- Geoghegan, J.L., Duchêne, S., Holmes, E.C., 2017. Comparative analysis estimates the relative frequencies of co-divergence and cross-species transmission within viral families. *PLOS Pathogens* 13, e1006215. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006215>
- Ghouzzi, V.E., Bianchi, F.T., Molineris, I., Mounce, B.C., Berto, G.E., Rak, M., Lebon, S., Aubry, L., Tocco, C., Gai, M., Chiotto, A.M., Sgrò, F., Pallavicini, G., Simon-Loriere, E., Passemard, S., Vignuzzi, M., Gressens, P., Di Cunto, F., 2016. ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly and p53. *Cell Death & Disease* 7, e2440–e2440. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.266>

- Giam, M., Huang, D.C.S., Bouillet, P., 2008. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* 27, S128–S136. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.50>
- Gim, E., Shim, D.-W., Hwang, I., Shin, O.S., Yu, J.-W., 2019. Zika Virus Impairs Host NLRP3-mediated Inflammasome Activation in an NS3-dependent Manner. *Immune Netw* 19. <https://doi.org/10.4110/in.2019.19.e40>
- Giron, S., Franke, F., Decoppet, A., Cadiou, B., Travaglini, T., Thirion, L., Durand, G., Jeannin, C., L'Ambert, G., Grard, G., Noël, H., Fournet, N., Auzet-Caillaud, M., Zandotti, C., Aboukaïs, S., Chaud, P., Guedj, S., Hamouda, L., Naudot, X., Ovize, A., Lazarus, C., de Valk, H., Paty, M.-C., Leparç-Goffart, I., 2019. Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. *Euro Surveill.* 24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.45.1900655>
- Gladwyn-Ng, I., Cordon-Barris, L., Alfano, C., Creppe, C., Couderc, T., Morelli, G., Thelen, N., America, M., Bessières, B., Encha-Razavi, F., Bonnière, M., Suzuki, I.K., Flamand, M., Vanderhaeghen, P., Thiry, M., Lecuit, M., Nguyen, L., 2018. Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nat. Neurosci.* 21, 63–71. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0038-4>
- Göertz, G.P., Abbo, S.R., Fros, J.J., Pijlman, G.P., 2018. Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Res.* 254, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.015>
- Gomard, Y., Lebon, C., Mavingui, P., Atyame, C.M., 2020. Contrasted transmission efficiency of Zika virus strains by mosquito species *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Reunion Island. *Parasites & Vectors* 13, 398. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04267-z>
- Gouagna, L.C., Damiens, D., Oliva, C.F., Boyer, S., Le Goff, G., Brengues, C., Dehecq, J.-S., Raude, J., Simard, F., Fontenille, D., 2020. Strategic Approach, Advances, and Challenges in the Development and Application of the SIT for Area-Wide Control of *Aedes albopictus* Mosquitoes in Reunion Island. *Insects* 11, 770. <https://doi.org/10.3390/insects11110770>
- Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., Dupont-Rouzeyrol, M., 2015. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis* 21, 84–86. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894>
- 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., García-Sastre, A., 2016. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host & Microbe* 19, 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009>
- Gratton, R., Agrelli, A., Tricarico, P.M., Brandão, L., Crovella, S., 2019. Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20051048>

- Gregory, C.D., Devitt, A., 2004. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology* 113, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01959.x>
- Griffin, I., Martin, S.W., Fischer, M., Chambers, T.V., Kosoy, O., Falise, A., Ponomareva, O., Gillis, L.D., Blackmore, C., Jean, R., 2019. Zika Virus IgM Detection and Neutralizing Antibody Profiles 12–19 Months after Illness Onset. *Emerg Infect Dis* 25, 299–303. <https://doi.org/10.3201/eid2502.181286>
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899–1911. <https://doi.org/10.1101/gad.13.15.1899>
- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J.E., Salmon, J., d’Alayer, J., Ermonval, M., Larquet, E., Charneau, P., Krey, T., Mégret, F., Guittet, E., Rey, F.A., Flamand, M., 2011. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *PNAS* 108, 8003–8008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017338108>
- Guzman, M.G., Alvarez, M., Halstead, S.B., 2013. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol* 158, 1445–1459. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1645-3>
- Gwon, Y.-D., Zusinaite, E., Merits, A., Överby, A.K., Evander, M., 2020. N-glycosylation in the Pre-Membrane Protein Is Essential for the Zika Virus Life Cycle. *Viruses* 12. <https://doi.org/10.3390/v12090925>
- Haataja, L., Gurlo, T., Huang, C., Butler, P.C., 2008. Many Commercially Available Antibodies for Detection of CHOP Expression as a Marker of Endoplasmic Reticulum Stress Fail Specificity Evaluation. *Cell Biochem Biophys* 51, 105–107. <https://doi.org/10.1007/s12013-008-9019-2>
- Haby, M.M., Pinart, M., Elias, V., Reveiz, L., 2018. Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bull World Health Organ* 96, 402–413D. <https://doi.org/10.2471/BLT.17.201541>
- Hackett, B.A., Cherry, S., 2018. Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 4246–4251. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720032115>
- Haddad, J.G., Grauzdytė, D., Koishi, A.C., Viranaicken, W., Venskutonis, P.R., Nunes Duarte dos Santos, C., Desprès, P., Diotel, N., El Kalamouni, C., 2020. The Geraniin-Rich Extract from Reunion Island Endemic Medicinal Plant *Phyllanthus phillyreifolius* Inhibits Zika and Dengue Virus Infection at Non-Toxic Effect Doses in Zebrafish. *Molecules* 25, 2316. <https://doi.org/10.3390/molecules25102316>

- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombatpattana, P., Talignani, L., Thomas, F., Cao-Lormeau, V.-M., Choumet, V., Briant, L., Desprès, P., Amara, A., Yssel, H., Missé, D., 2015. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology* 89, 8880–8896. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>
- Han, Y., Mesplède, T., 2018. Investigational drugs for the treatment of Zika virus infection: a preclinical and clinical update. *Expert Opin Investig Drugs* 27, 951–962. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1548609>
- Haramboure, M., Labbé, P., Baldet, T., Damiens, D., Gouagna, L.C., Bouyer, J., Tran, A., 2020. Modelling the control of *Aedes albopictus* mosquitoes based on sterile males release techniques in a tropical environment. *Ecological Modelling* 424, 109002. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2020.109002>
- He, C., Levine, B., 2010. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol* 22, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.01.001>
- He, Z., An, S., Chen, J., Zhang, S., Tan, C., Yu, J., Ye, H., Wu, Y., Yuan, J., Wu, J., Zhu, X., Li, M., 2020. Neural progenitor cell pyroptosis contributes to Zika virus-induced brain atrophy and represents a therapeutic target. *PNAS* 117, 23869–23878. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007773117>
- He, Z., Chen, J., Zhu, X., An, S., Dong, X., Yu, J., Zhang, S., Wu, Y., Li, G., Zhang, Y., Wu, J., Li, M., 2018. NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Zika Virus-Associated Inflammation. *J Infect Dis* 217, 1942–1951. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy129>
- Hendershot, L.M., 2004. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt. Sinai J. Med.* 71, 289–297.
- Henle, W., 1950. Interference phenomena between animal viruses; a review. *J Immunol* 64, 203–236.
- Hirsch, A.J., Smith, J.L., Haese, N.N., Broeckel, R.M., Parkins, C.J., Kreklywich, C., DeFilippis, V.R., Denton, M., Smith, P.P., Messer, W.B., Colgin, L.M.A., Ducore, R.M., Grigsby, P.L., Hennebold, J.D., Swanson, T., Legasse, A.W., Axthelm, M.K., MacAllister, R., Wiley, C.A., Nelson, J.A., Streblow, D.N., 2017. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLoS Pathog* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006219>
- Houé, V., Gabiane, G., Dauga, C., Suez, M., Madec, Y., Mousson, L., Marconcini, M., Yen, P.-S., de Lamballerie, X., Bonizzoni, M., Failloux, A.-B., 2019. Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Emerg Microbes Infect* 8, 1265–1279. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1657785>

- Huang, Y., Wang, Y., Meng, S., Chen, Z., Kong, H., Pan, T., Lu, G., Li, X., 2020. Autophagy Contributes to Host Immunity and Protection against Zika Virus Infection via Type I IFN Signaling [WWW Document]. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2020/9527147>
- Huits, R., De Smet, B., Ariën, K.K., Van Esbroeck, M., Bottieau, E., Cnops, L., 2017. Zika virus in semen: a prospective cohort study of symptomatic travellers returning to Belgium. *Bull World Health Organ* 95, 802–809. <https://doi.org/10.2471/BLT.17.181370>
- Iani, F.C. de M., Caldas, S., Duarte, M.M., Cury, A.L.F., Cecílio, A.B., Costa, P.A.C., Antonelli, L.R., Gollob, K.J., 2016. Dengue Patients with Early Hemorrhagic Manifestations Lose Coordinate Expression of the Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 with the Inflammatory Cytokines IL-6 and IL-8. *Am J Trop Med Hyg* 95, 193–200. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0537>
- Isaacs, A., Lindenmann, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147, 258–267. <https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048>
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., O' Neill, S.L., 2011. Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep* 12, 508–518. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>
- Ivashkiv, L.B., Donlin, L.T., 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14, 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Jensen, S., Thomsen, A.R., 2012. Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *J Virol* 86, 2900–2910. <https://doi.org/10.1128/JVI.05738-11>
- Johnston, L.J., Halliday, G.M., King, N.J., 2000. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol* 114, 560–568. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00904.x>
- Jordan, T.X., Randall, G., 2016. Flavivirus Modulation of Cellular Metabolism. *Curr Opin Virol* 19, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.05.007>
- Jorgensen, I., Rayamajhi, M., Miao, E.A., 2017. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol* 17, 151–164. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.147>
- Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prévost, M.-C., Pierre, P., Tangy, F., Zimmer, C., Vidalain, P.-O., Couderc, T., Lecuit, M., 2013. Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO reports* 14, 534–544. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.51>

- Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., Tang, D., 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18, 571–580. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
- Katze, M.G., He, Y., Gale, M., 2002. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature Reviews Immunology* 2, 675–687. <https://doi.org/10.1038/nri888>
- Katzelnick, L.C., Narvaez, C., Arguello, S., Mercado, B.L., Collado, D., Ampie, O., Elizondo, D., Miranda, T., Carillo, F.B., Mercado, J.C., Latta, K., Schiller, A., Segovia-Chumbez, B., Ojeda, S., Sanchez, N., Plazaola, M., Coloma, J., Halloran, M.E., Premkumar, L., Gordon, A., Narvaez, F., Silva, A.M. de, Kuan, G., Balmaseda, A., Harris, E., 2020. Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science* 369, 1123–1128. <https://doi.org/10.1126/science.abb6143>
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Kesari, A.S., Heintz, V.J., Poudyal, S., Miller, A.S., Kuhn, R.J., LaCount, D.J., 2020. Zika virus NS5 localizes at centrosomes during cell division. *Virology* 541, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.11.018>
- Khandia, R., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Malik, Y.S., Singh, R.K., Chaicumpa, W., 2018. Modulation of Dengue/Zika Virus Pathogenicity by Antibody-Dependent Enhancement and Strategies to Protect Against Enhancement in Zika Virus Infection. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00597>
- Khongwichit, S., Sornjai, W., Jitobaom, K., Greenwood, M., Greenwood, M.P., Hitakarun, A., Wikan, N., Murphy, D., Smith, D.R., 2021. A functional interaction between GRP78 and Zika virus E protein. *Scientific Reports* 11, 393. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79803-z>
- Khromykh, A.A., Meka, H., Guyatt, K.J., Westaway, E.G., 2001. Essential Role of Cyclization Sequences in Flavivirus RNA Replication. *Journal of Virology* 75, 6719–6728. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6719-6728.2001>
- Kim, C.R., Counotte, M., Bernstein, K., Deal, C., Mayaud, P., Low, N., Broutet, N., 2018. Investigating the sexual transmission of Zika virus. *Lancet Glob Health* 6, e24–e25. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30419-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30419-9)
- Kim, H., Ellis, V.D., Woodman, A., Zhao, Y., Arnold, J.J., Cameron, C.E., 2019. RNA-Dependent RNA Polymerase Speed and Fidelity are not the Only Determinants of the Mechanism or Efficiency of Recombination. *Genes (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/genes10120968>
- Kim, J.-A., Seong, R.-K., Son, S.W., Shin, O.S., 2019. Insights into ZIKV-Mediated Innate Immune Responses in Human Dermal Fibroblasts and Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 139, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.07.038>

- Kim, M.-K., Kim, H.-S., Lee, I.-K., Park, K.-G., 2012. Endoplasmic Reticulum Stress and Insulin Biosynthesis: A Review. *Exp Diabetes Res* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/509437>
- Kim, S.Y., Zhao, J., Liu, X., Fraser, K., Lin, L., Zhang, X., Zhang, F., Dordick, J.S., Linhardt, R.J., 2017. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry* 56, 1151–1162. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01056>
- Kitchen, A., Shackelton, L.A., Holmes, E.C., 2011. Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *PNAS* 108, 238–243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011090108>
- Kolpikova, E.P., Tronco, A.R., Hartigh, A.B. den, Jackson, K.J., Iwawaki, T., Fink, S.L., 2020. IRE1 α Promotes Zika Virus Infection via XBP1. *Viruses* 12. <https://doi.org/10.3390/v12030278>
- Kraemer, M.U., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A.Q., Shearer, F.M., Barker, C.M., Moore, C.G., Carvalho, R.G., Coelho, G.E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I.R., Teng, H.-J., Brady, O.J., Messina, J.P., Pigott, D.M., Scott, T.W., Smith, D.L., Wint, G.W., Golding, N., Hay, S.I., 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Krejlich-Trotot, P., Denizot, M., Hoarau, J.-J., Jaffar-Bandjee, M.-C., Das, T., Gasque, P., 2011a. Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. *FASEB J.* 25, 314–325. <https://doi.org/10.1096/fj.10-164178>
- Krejlich-Trotot, P., Gay, B., Li-Pat-Yuen, G., Hoarau, J.-J., Jaffar-Bandjee, M.-C., Briant, L., Gasque, P., Denizot, M., 2011b. Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virology* 432. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.11.018>
- Kumar, A., Jovel, J., Lopez-Orozco, J., Limonta, D., Airo, A.M., Hou, S., Stryapunina, I., Fibke, C., Moore, R.B., Hobman, T.C., 2018. Human Sertoli cells support high levels of Zika virus replication and persistence. *Scientific Reports* 8, 5477. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23899-x>
- Kumar, N., Sharma, S., Kumar, R., Tripathi, B.N., Barua, S., Ly, H., Rouse, B.T., 2020. Host-Directed Antiviral Therapy. *Clinical Microbiology Reviews* 33. <https://doi.org/10.1128/CMR.00168-19>
- Kumar, V., Sami, N., Kashav, T., Islam, A., Ahmad, F., Hassan, Md.I., 2016. Protein aggregation and neurodegenerative diseases: From theory to therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* 124, 1105–1120. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.054>

- Labeau, A., 2019. Identification and characterization of cellular factors required for zika virus and dengue virus infection. (These de doctorat). Université de Paris (2019-....).
- Lai, L., Roupheal, N., Xu, Y., Natrajan, M.S., Beck, A., Hart, M., Feldhammer, M., Feldpausch, A., Hill, C., Wu, H., Fairley, J.K., Lankford-Turner, P., Kasher, N., Rago, P., Hu, Y.-J., Edupuganti, S., Patel, S.M., Murray, K.O., Mulligan, M.J., Emory Zika Patient Study Team, 2018. Innate, T-, and B-Cell Responses in Acute Human Zika Patients. *Clin Infect Dis* 66, 1–10. <https://doi.org/10.1093/cid/cix732>
- Lappala, A., Nishima, W., Miner, J., Fenimore, P., Fischer, W., Hraber, P., Zhang, M., McMahon, B., Tung, C.-S., 2018. Structural Transition and Antibody Binding of EBOV GP and ZIKV E Proteins from Pre-Fusion to Fusion-Initiation State. *Biomolecules* 8, 25. <https://doi.org/10.3390/biom8020025>
- Lee, I., Bos, S., Li, G., Wang, S., Gadea, G., Desprès, P., Zhao, R.Y., 2018. Probing Molecular Insights into Zika Virus–Host Interactions. *Viruses* 10, 233. <https://doi.org/10.3390/v10050233>
- Legros, V., Jeannin, P., Burlaud-Gaillard, J., Chaze, T., Gianetto, Q.G., Butler-Browne, G., Mouly, V., Zoladek, J., Afonso, P.V., González, M.-N., Matondo, M., Riederer, I., Roingeard, P., Gessain, A., Choumet, V., Ceccaldi, P.-E., 2020. Differentiation-dependent susceptibility of human muscle cells to Zika virus infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14, e0008282. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008282>
- Lei, V., Petty, A.J., Atwater, A.R., Wolfe, S.A., MacLeod, A.S., 2020. Skin Viral Infections: Host Antiviral Innate Immunity and Viral Immune Evasion. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.593901>
- Lennemann, N.J., Coyne, C.B., 2017. Dengue and Zika viruses subvert reticulophagy by NS2B3-mediated cleavage of FAM134B. *Autophagy* 13, 322–332. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1265192>
- Li, A., Wang, W., Wang, Y., Chen, K., Xiao, F., Hu, D., Hui, L., Liu, W., Feng, Y., Li, G., Tan, Q., Liu, Y., Wu, K., Wu, J., 2020. NS5 Conservative Site Is Required for Zika Virus to Restrict the RIG-I Signaling. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00051>
- Li, A., Yu, J., Lu, M., Ma, Y., Attia, Z., Shan, C., Xue, M., Liang, X., Craig, K., Makadiya, N., He, J.J., Jennings, R., Shi, P.-Y., Peeples, M.E., Liu, S.-L., Boyaka, P.N., Li, J., 2018. A Zika virus vaccine expressing premembrane-envelope-NS1 polyprotein. *Nature Communications* 9, 3067. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05276-4>
- Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y., Liu, X., Zhang, N., Shi, L., Qin, C.-F., Xu, Z., 2016. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 19, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017>

- Li, M., Zhang, D., Li, C., Zheng, Z., Fu, M., Ni, F., Liu, Y., Du, T., Wang, H., Griffin, G.E., Zhang, M., Hu, Q., 2020. Characterization of Zika Virus Endocytic Pathways in Human Glioblastoma Cells. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00242>
- Li, P., Wei, Y., Mei, M., Tang, L., Sun, L., Huang, W., Zhou, J., Zou, C., Zhang, S., Qin, C.-F., Jiang, T., Dai, J., Tan, X., Zhang, Q.C., 2018. Integrative Analysis of Zika Virus Genome RNA Structure Reveals Critical Determinants of Viral Infectivity. *Cell Host & Microbe* 24, 875-886.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.011>
- Liao, Y., Fung, T.S., Huang, M., Fang, S.G., Zhong, Y., Liu, D.X., 2013. Upregulation of CHOP/GADD153 during Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Infection Modulates Apoptosis by Restricting Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *J Virol* 87, 8124–8134. <https://doi.org/10.1128/JVI.00626-13>
- Lim, S.-K., Lim, J.K., Yoon, I.-K., 2017. An Update on Zika Virus in Asia. *Infect Chemother* 49, 91–100. <https://doi.org/10.3947/ic.2017.49.2.91>
- Limonta, D., Jovel, J., Kumar, A., Airo, A.M., Hou, S., Saito, L., Branton, W., Ka-Shu Wong, G., Mason, A., Power, C., Hobman, T.C., 2018. Human Fetal Astrocytes Infected with Zika Virus Exhibit Delayed Apoptosis and Resistance to Interferon: Implications for Persistence. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10110646>
- Limonta, D., Jovel, J., Kumar, A., Lu, J., Hou, S., Airo, A.M., Lopez-Orozco, J., Wong, C.P., Saito, L., Branton, W., Wong, G.K.-S., Mason, A., Power, C., Hobman, T.C., 2019. Fibroblast Growth Factor 2 Enhances Zika Virus Infection in Human Fetal Brain. *J. Infect. Dis.* 220, 1377–1387. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz073>
- Lin, D.L., Inoue, T., Chen, Y.-J., Chang, A., Tsai, B., Tai, A.W., 2019. The ER Membrane Protein Complex Promotes Biogenesis of Dengue and Zika Virus Non-structural Multi-pass Transmembrane Proteins to Support Infection. *Cell Rep* 27, 1666-1674.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.051>
- Lin, S., Yang, S., He, J., Guest, J.D., Ma, Z., Yang, L., Pierce, B.G., Tang, Q., Zhang, Y.-J., 2019. Zika virus NS5 protein antagonizes type I interferon production via blocking TBK1 activation. *Virology* 527, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.11.009>
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., Liu, Z., 1999. Cleavage of the death domain kinase RIP by Caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13, 2514–2526.
- Lindqvist, L.M., Heinlein, M., Huang, D.C.S., Vaux, D.L., 2014. Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak. *PNAS* 111, 8512–8517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406425111>
- Liu, J., Li, Q., Li, X., Qiu, Z., Li, A., Liang, W., Chen, Huangyao, Cai, X., Chen, X., Duan, X., Li, Jingjing, Wu, W., Xu, M., Mao, Y., Chen, Huiying, Li, Jinlong, Gu, W., Li, H., 2018. Zika Virus Envelope Protein induces G2/M Cell Cycle Arrest and

- Apoptosis via an Intrinsic Cell Death Signaling Pathway in Neuroendocrine PC12 Cells. *Int J Biol Sci* 14, 1099–1108. <https://doi.org/10.7150/ijbs.26400>
- Liu, J., Liu, Y., Nie, K., Du, S., Qiu, J., Pang, X., Wang, P., Cheng, G., 2016. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nature Microbiology* 1, 1–11. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.87>
- Liu, Q., Clem, R.J., 2011. Defining the core apoptosis pathway in the mosquito disease vector *Aedes aegypti*: The roles of iap1, ark, dronc, and effector caspases. *Apoptosis* 16, 105–113. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0558-9>
- Liu, R., Wang, X., Ma, Y., Wu, J., Mao, C., Yuan, L., Lu, J., 2019. Prevalence of Zika virus in blood donations: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases* 19, 590. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4226-6>
- Liu, T., Tang, L., Tang, H., Pu, J., Gong, S., Fang, D., Zhang, H., Li, Y.-P., Zhu, X., Wang, W., Wu, M., Liao, Y., Li, C., Zhou, H., Huang, X., 2019. Zika Virus Infection Induces Acute Kidney Injury Through Activating NLRP3 Inflammasome Via Suppressing Bcl-2. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01925>
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V.G., Wu, H., Lieberman, J., 2016. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535, 153–158. <https://doi.org/10.1038/nature18629>
- Long, K.M., Heise, M.T., 2015. Protective and Pathogenic Responses to Chikungunya Virus Infection. *Curr Trop Med Rep* 2, 13–21. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0037-z>
- Long, X., Li, Y., Qi, Y., Xu, J., Wang, Z., Zhang, X., Zhang, D., Zhang, L., Huang, J., 2013. XAF1 contributes to dengue virus-induced apoptosis in vascular endothelial cells. *FASEB J* 27, 1062–1073. <https://doi.org/10.1096/fj.12-213967>
- Luo, S., Mao, C., Lee, B., Lee, A.S., 2006. GRP78/BiP Is Required for Cell Proliferation and Protecting the Inner Cell Mass from Apoptosis during Early Mouse Embryonic Development. *Molecular and Cellular Biology* 26, 5688–5697. <https://doi.org/10.1128/MCB.00779-06>
- M, A., Mug, K., Lm, G., 2019. A dynamic neural network model for predicting risk of Zika in real time. *BMC Med* 17, 171–171. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1389-3>
- Ma, J., Ketkar, H., Geng, T., Lo, E., Wang, L., Xi, J., Sun, Q., Zhu, Z., Cui, Y., Yang, L., Wang, P., 2018. Zika Virus Non-structural Protein 4A Blocks the RLR-MAVS Signaling. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01350>
- Macdonald, J., Tonry, J., Hall, R.A., Williams, B., Palacios, G., Ashok, M.S., Jabado, O., Clark, D., Tesh, R.B., Briese, T., Lipkin, W.I., 2005. NS1 Protein Secretion during the Acute Phase of West Nile Virus Infection. *Journal of Virology* 79, 13924–13933. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13924-13933.2005>

- Magnani, D.M., Rogers, T.F., Beutler, N., Ricciardi, M.J., Bailey, V.K., Gonzalez-Nieto, L., Briney, B., Sok, D., Le, K., Strubel, A., Gutman, M.J., Pedreño-Lopez, N., Grubaugh, N.D., Silveira, C.G.T., Maxwell, H.S., Domingues, A., Martins, M.A., Lee, D.E., Okwuazi, E.E., Jean, S., Strobert, E.A., Chahroudi, A., Silvestri, G., Vanderford, T.H., Kallas, E.G., Desrosiers, R.C., Bonaldo, M.C., Whitehead, S.S., Burton, D.R., Watkins, D.I., 2017. Neutralizing human monoclonal antibodies prevent Zika virus infection in macaques. *Science Translational Medicine* 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan8184>
- Malekshahi, Z., Schiela, B., Bernklau, S., Banki, Z., Würzner, R., Stoiber, H., 2020. Interference of the Zika Virus E-Protein With the Membrane Attack Complex of the Complement System. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.569549>
- Malladi, S., Challa-Malladi, M., Fearnhead, H.O., Bratton, S.B., 2009. The Apaf-1•procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *The EMBO Journal* 28, 1916. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.152>
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E.Z., Tan, H.C., Sessions, O.M., Ward, A.M., Gubler, D.J., Harris, E., Garcia-Blanco, M.A., Ooi, E.E., 2015. Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science* 350, 217–221. <https://doi.org/10.1126/science.aab3369>
- Mansuy, J.M., Suberbielle, E., Chapuy-Regaud, S., Mengelle, C., Bujan, L., Marchou, B., Delobel, P., Gonzalez-Dunia, D., Malnou, C.E., Izopet, J., Martin-Blondel, G., 2016. Zika virus in semen and spermatozoa. *The Lancet Infectious Diseases* 16, 1106–1107. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30336-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30336-X)
- Marchette, N.J., Garcia, R., Rudnick, A., 1969. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18, 411–415. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.411>
- Masel, J., McCracken, M.K., Gleeson, T., Morrison, B., Rutherford, G., Imrie, A., Jarman, R.G., Koren, M., Pollett, S., 2019. Does prior dengue virus exposure worsen clinical outcomes of Zika virus infection? A systematic review, pooled analysis and lessons learned. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13, e0007060. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007060>
- Massad, E., Burattini, M.N., Khan, K., Struchiner, C.J., Coutinho, F. a. B., Wilder-Smith, A., 2017. On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. *Epidemiol Infect* 145, 2303–2312. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001200>
- Mateo, R., Nagamine, C.M., Spagnolo, J., Méndez, E., Rahe, M., Gale, M., Yuan, J., Kirkegaard, K., 2013. Inhibition of Cellular Autophagy Deranges Dengue Virion Maturation. *Journal of Virology* 87, 1312–1321. <https://doi.org/10.1128/JVI.02177-12>

- Matheron, S., d’Ortenzio, E., Leparç-Goffart, I., Hubert, B., de Lamballerie, X., Yazdanpanah, Y., 2016. Long-Lasting Persistence of Zika Virus in Semen. *Clin Infect Dis* 63, 1264. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw509>
- Mattson, M.P., 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 120–130. <https://doi.org/10.1038/35040009>
- Mavigner, M., Raper, J., Kovacs-Balint, Z., Gumber, S., O’Neal, J.T., Bhaumik, S.K., Zhang, X., Habib, J., Mattingly, C., McDonald, C.E., Avanzato, V., Burke, M.W., Magnani, D.M., Bailey, V.K., Watkins, D.I., Vanderford, T.H., Fair, D., Earl, E., Feczko, E., Styner, M., Jean, S.M., Cohen, J.K., Silvestri, G., Johnson, R.P., O’Connor, D.H., Wrammert, J., Suthar, M.S., Sanchez, M.M., Alvarado, M.C., Chahroudi, A., 2018. Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure, function, and behavior in infant macaques. *Sci Transl Med* 10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao6975>
- Maximova, O.A., Faucette, L.J., Ward, J.M., Murphy, B.R., Pletnev, A.G., 2009. Cellular Inflammatory Response to Flaviviruses in the Central Nervous System of a Primate Host. *J Histochem Cytochem* 57, 973–989. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954180>
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., Holbrook, N.J., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1249–1259. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001>
- McKenzie, B.A., Wilson, A.E., Zohdy, S., 2019. Aedes albopictus is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PLOS ONE* 14, e0216794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216794>
- Mead, P.S., Duggal, N.K., Hook, S.A., Delorey, M., Fischer, M., Olzenak McGuire, D., Becksted, H., Max, R.J., Anishchenko, M., Schwartz, A.M., Tzeng, W.-P., Nelson, C.A., McDonald, E.M., Brooks, J.T., Brault, A.C., Hinckley, A.F., 2018. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *New England Journal of Medicine* 378, 1377–1385. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1711038>
- Medigeschi, G.R., Lancaster, A.M., Hirsch, A.J., Briese, T., Lipkin, W.I., Defilippis, V., Früh, K., Mason, P.W., Nikolich-Zugich, J., Nelson, J.A., 2007. West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *J. Virol.* 81, 10849–10860. <https://doi.org/10.1128/JVI.01151-07>
- Meertens, L., Carnec, X., Lecoine, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., Amara, A., 2012. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host & Microbe* 12, 544–557. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.009>
- Meier, P., Finch, A., Evan, G., 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407, 796–801. <https://doi.org/10.1038/35037734>

- Mercer, J., Helenius, A., 2008. Vaccinia Virus Uses Macropinocytosis and Apoptotic Mimicry to Enter Host Cells. *Science* 320, 531–535. <https://doi.org/10.1126/science.1155164>
- Mesplède, T., Gagnon, D., Bergeron-Labrecque, F., Azar, I., Sénéchal, H., Coutlée, F., Archambault, J., 2012. p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *J Virol* 86, 94–107. <https://doi.org/10.1128/JVI.00751-11>
- Michlmayr, D., Andrade, P., Gonzalez, K., Balmaseda, A., Harris, E., 2017. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol* 2, 1462–1470. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0035-0>
- Mier-y-Teran-Romero, L., Delorey, M.J., Sejvar, J.J., Johansson, M.A., 2018. Guillain–Barré syndrome risk among individuals infected with Zika virus: a multi-country assessment. *BMC Medicine* 16, 67. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1052-4>
- Mimura, N., Yuasa, S., Soma, M., Jin, H., Kimura, K., Goto, S., Koseki, H., Aoe, T., 2008. Altered Quality Control in the Endoplasmic Reticulum Causes Cortical Dysplasia in Knock-In Mice Expressing a Mutant BiP. *Mol Cell Biol* 28, 293–301. <https://doi.org/10.1128/MCB.00473-07>
- Miner, J.J., Diamond, M.S., 2017. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe* 21, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Mizushima, N., Komatsu, M., 2011. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* 147, 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., Vizjak, A., Pižem, J., Petrovec, M., Avšič Županc, T., 2016. Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine* 374, 951–958. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651>
- Mogi, M., Togari, A., 2003. Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. *J Biol Chem* 278, 47477–47482. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307055200>
- Moller-Tank, S., Maury, W., 2014. Phosphatidylserine receptors: Enhancers of enveloped virus entry and infection. *Virology* 468–470, 565–580. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.009>
- Mondotte, J.A., Lozach, P.-Y., Amara, A., Gamarnik, A.V., 2007. Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation. *Journal of Virology* 81, 7136–7148. <https://doi.org/10.1128/JVI.00116-07>

- Monel, B., Compton, A.A., Bruel, T., Amraoui, S., Burlaud-Gaillard, J., Roy, N., Guivel-Benhassine, F., Porrot, F., Génin, P., Meertens, L., Sinigaglia, L., Jouvenet, N., Weil, R., Casartelli, N., Demangel, C., Simon-Lorière, E., Moris, A., Roingeard, P., Amara, A., Schwartz, O., 2017. Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *EMBO J.* 36, 1653–1668. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695597>
- Mulkey, S.B., Arroyave-Wessel, M., Peyton, C., Bulas, D.I., Fourzali, Y., Jiang, J., Russo, S., McCarter, R., Msall, M.E., Plessis, A.J. du, DeBiasi, R.L., Cure, C., 2020. Neurodevelopmental Abnormalities in Children With In Utero Zika Virus Exposure Without Congenital Zika Syndrome. *JAMA Pediatr* 174, 269–276. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2019.5204>
- Muller, D.A., Young, P.R., 2013. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* 98, 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>
- Musso, D., Gubler, D.J., 2016. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* 29, 487–524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>
- Musso, D., Stramer, S.L., AABB Transfusion-Transmitted Diseases Committee, Busch, M.P., International Society of Blood Transfusion Working Party on Transfusion-Transmitted Infectious Diseases, 2016. Zika virus: a new challenge for blood transfusion. *Lancet* 387, 1993–1994. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30428-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30428-7)
- N. Costa, M.C., Cardim, L.L., Teixeira, M.G., Barreto, M.L., Carvalho-Sauer, R. de C.O. de, Barreto, F.R., Carvalho, M.S.I., Oliveira, W.K., França, G.V.A., Carmo, E.H., Andrade, R.F.S., Rodrigues, M.S., Veiga, R.V., Oliveira, J.F., Fernandes, Q.H.R.F., Costa, L.C., Coelho, G.E., Paixao, E.S., 2020. Case Fatality Rate Related to Microcephaly Congenital Zika Syndrome and Associated Factors: A Nationwide Retrospective Study in Brazil †. *Viruses* 12, 1228. <https://doi.org/10.3390/v12111228>
- Netherton, C.L., Parsley, J.C., Wileman, T., 2004. African Swine Fever Virus Inhibits Induction of the Stress-Induced Proapoptotic Transcription Factor CHOP/GADD153. *Journal of Virology* 78, 10825–10828. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10825-10828.2004>
- Ng, W.C., Soto-Acosta, R., Bradrick, S.S., Garcia-Blanco, M.A., Ooi, E.E., 2017. The 5′ and 3′ Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses* 9, 137. <https://doi.org/10.3390/v9060137>
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., Ron, D., 2001. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 α . *J Cell Biol* 153, 1011–1022.

- Oakes, S.A., Papa, F.R., 2015. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annu Rev Pathol* 10, 173–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>
- Ocampo, C.B., Caicedo, P.A., Jaramillo, G., Bedoya, R.U., Baron, O., Serrato, I.M., Cooper, D.M., Lowenberger, C., 2013. Differential Expression of Apoptosis Related Genes in Selected Strains of *Aedes aegypti* with Different Susceptibilities to Dengue Virus. *PLOS ONE* 8, e61187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061187>
- O'Connor, M.A., Tisoncik-Go, J., Lewis, T.B., Miller, C.J., Bratt, D., Moats, C.R., Edlefsen, P.T., Smedley, J., Klatt, N.R., Gale, M., Fuller, D.H., 2018. Early cellular innate immune responses drive Zika viral persistence and tissue tropism in pigtail macaques. *Nat Commun* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05826-w>
- Offerdahl, D.K., Dorward, D.W., Hansen, B.T., Bloom, M.E., 2017. Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. *Virology* 501, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.002>
- Okamoto, T., Suzuki, T., Kusakabe, S., Tokunaga, M., Hirano, J., Miyata, Y., Matsuura, Y., 2017. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses* 9. <https://doi.org/10.3390/v9090243>
- O'Neill, K., Olson, B.J.S.C., Huang, N., Unis, D., Clem, R.J., 2015. Rapid selection against arbovirus-induced apoptosis during infection of a mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E1152–E1161. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424469112>
- Österlund, P., Jiang, M., Westenius, V., Kuivanen, S., Järvi, R., Kakkola, L., Lundberg, R., Melén, K., Korva, M., Županc, T.A.-, Vapalahti, O., Julkunen, I., 2019. Asian and African lineage Zika viruses show differential replication and innate immune responses in human dendritic cells and macrophages. *Scientific Reports* 9, 15710. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52307-1>
- Our Work [WWW Document], n.d. URL <http://www.kimermed.co.nz/our-work> (accessed 4.18.21).
- Painter, J.E., Plaster, A.N., Tjersland, D.H., Jacobsen, K.H., 2017. Zika virus knowledge, attitudes, and vaccine interest among university students. *Vaccine* 35, 960–965. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.050>
- Paixão, E.S., Barreto, F., 2016. History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review 106, 7.
- Palam, L.R., Baird, T.D., Wek, R.C., 2011. Phosphorylation of eIF2 Facilitates Ribosomal Bypass of an Inhibitory Upstream ORF to Enhance CHOP Translation♦. *J Biol Chem* 286, 10939–10949. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216093>

- Palatini, U., Miesen, P., Carballar-Lejarazu, R., Ometto, L., Rizzo, E., Tu, Z., van Rij, R.P., Bonizzoni, M., 2017. Comparative genomics shows that viral integrations are abundant and express piRNAs in the arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *BMC Genomics* 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3903-3>
- Pan, Y., Cheng, A., Wang, M., Yin, Z., Jia, R., 2021. The Dual Regulation of Apoptosis by Flavivirus. *Front. Microbiol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.654494>
- Pardi, N., Hogan, M.J., Pelc, R.S., Muramatsu, H., Andersen, H., DeMaso, C.R., Dowd, K.A., Sutherland, L.L., Searce, R.M., Parks, R., Wagner, W., Granados, A., Greenhouse, J., Walker, M., Willis, E., Yu, J.-S., McGee, C.E., Sempowski, G.D., Mui, B.L., Tam, Y.K., Huang, Y.-J., Vanlandingham, D., Holmes, V.M., Balachandran, H., Sahu, S., Lifton, M., Higgs, S., Hensley, S.E., Madden, T.D., Hope, M.J., Karikó, K., Santra, S., Graham, B.S., Lewis, M.G., Pierson, T.C., Haynes, B.F., Weissman, D., 2017. Zika virus protection by a single low dose nucleoside modified mRNA vaccination. *Nature* 543, 248–251. <https://doi.org/10.1038/nature21428>
- Pardi, N., Hogan, M.J., Porter, F.W., Weissman, D., 2018. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery* 17, 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Pardy, R.D., Richer, M.J., 2019. Protective to a T: The Role of T Cells during Zika Virus Infection. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8080820>
- Parisi, L.R., Sowlati-Hashjin, S., Berhane, I.A., Galster, S.L., Carter, K.A., Lovell, J.F., Chemler, S.R., Karttunen, M., Atilla-Gokcumen, G.E., 2019. Membrane Disruption by Very Long Chain Fatty Acids during Necroptosis. *ACS Chem Biol* 14, 2286–2294. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00616>
- Park, H.H., Lo, Y.-C., Lin, S.-C., Wang, L., Yang, J.K., Wu, H., 2007. The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation. *Annual Review of Immunology* 25, 561–586. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141656>
- Parquet, M.C., Kumatori, A., Hasebe, F., Morita, K., Igarashi, A., 2001. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Lett* 500, 17–24. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02573-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02573-x)
- Paz-Bailey, G., Rosenberg, E.S., Doyle, K., Munoz-Jordan, J., Santiago, G.A., Klein, L., Perez-Padilla, J., Medina, F.A., Waterman, S.H., Adams, L.E., Lozier, M.J., Bertrán-Pasarell, J., Garcia Gubern, C., Alvarado, L.I., Sharp, T.M., 2018. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *New England Journal of Medicine* 379, 1234–1243. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613108>
- Peng, B.-H., Wang, T., 2019. West Nile Virus Induced Cell Death in the Central Nervous System. *Pathogens* 8. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040215>

- Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., Amara, A., 2013. Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses* 6, 69–88. <https://doi.org/10.3390/v6010069>
- Peters, R., Stevenson, M., 2019. Zika virus diagnosis: challenges and solutions. *Clinical Microbiology and Infection* 25, 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.002>
- Pierson, T.C., Diamond, M.S., 2020. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature Microbiology* 5, 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., Rizzuto, R., 2008. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407–6418. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.308>
- Poland, G.A., Ovsyannikova, I.G., Kennedy, R.B., 2019. Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clinic Proceedings* 94, 2572–2586. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.05.016>
- Pollak, M., 1989. Mirko D. Grmek, Histoire du sida. Début et origine d'une pandémie actuelle. *Annales* 44, 1521–1523.
- Polster, B.M., Pevsner, J., Hardwick, J.M., 2004. Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology 1644, 211–227. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.11.001>
- Qian, X., Nguyen, H.N., Song, M.M., Hadiono, C., Ogden, S.C., Hammack, C., Yao, B., Hamersky, G.R., Jacob, F., Zhong, C., Yoon, K., Jeang, W., Lin, L., Li, Y., Thakor, J., Berg, D.A., Zhang, C., Kang, E., Chickering, M., Nauen, D., Ho, C.-Y., Wen, Z., Christian, K.M., Shi, P.-Y., Maher, B.J., Wu, H., Jin, P., Tang, H., Song, H., Ming, G., 2016. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* 165, 1238–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.032>
- Qu, P., Zhang, C., Li, M., Ma, W., Xiong, P., Liu, Q., Zou, G., Lavillette, D., Yin, F., Jin, X., Huang, Z., 2020. A new class of broadly neutralizing antibodies that target the glycan loop of Zika virus envelope protein. *Cell Discovery* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0140-8>
- Rabelo, K., de Souza, L.J., Salomão, N.G., Machado, L.N., Pereira, P.G., Portari, E.A., Basílio-de-Oliveira, R., dos Santos, F.B., Neves, L.D., Morgade, L.F., Provance, D.W., Higa, L.M., Tanuri, A., de Carvalho, J.J., Paes, M.V., 2020. Zika Induces Human Placental Damage and Inflammation. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02146>
- Ravichandran, S., Hahn, M., Belaunzarán-Zamudio, P.F., Ramos-Castañeda, J., Nájera-Cancino, G., Caballero-Sosa, S., Navarro-Fuentes, K.R., Ruiz-Palacios, G., Golding, H., Beigel, J.H., Khurana, S., 2019. Differential human antibody repertoires

- following Zika infection and the implications for serodiagnostics and disease outcome. *Nature Communications* 10, 1943. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09914-3>
- Rehwinkel, J., Gack, M.U., 2020. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology* 20, 537–551. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>
- Rey, F.A., Stiasny, K., Vaney, M.-C., Dellarole, M., Heinz, F.X., 2018. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO reports* 19, 206–224. <https://doi.org/10.15252/embr.201745302>
- Richner, J.M., Himansu, S., Dowd, K.A., Butler, S.L., Salazar, V., Fox, J.M., Julander, J.G., Tang, W.W., Shresta, S., Pierson, T.C., Ciaramella, G., Diamond, M.S., 2017. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell* 168, 1114–1125.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.017>
- Rider, T.H., Zook, C.E., Boettcher, T.L., Wick, S.T., Pancoast, J.S., Zusman, B.D., 2011. Broad-Spectrum Antiviral Therapeutics. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022572>
- Rivera-Correa, J., Siqueira, I.C. de, Mota, S., Rosário, M.S. do, Jesus, P.A.P. de, Alcantara, L.C.J., Ernst, J.D., Rodriguez, A., 2019. Anti-ganglioside antibodies in patients with Zika virus infection-associated Guillain-Barré Syndrome in Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13, e0007695. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007695>
- Rivero, A., Vézilier, J., Weill, M., Read, A.F., Gandon, S., 2010. Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? *PLoS Pathog* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001000>
- Roby, J.A., Setoh, Y.X., Hall, R.A., Khromykh, A.A., 2015. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *J Gen Virol* 96, 1551–1569. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000097>
- Rock, K.L., Kono, H., 2008. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 3, 99–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456>
- Rodrigues, L.C., 2016. Microcephaly and Zika virus infection. *The Lancet* 387, 2070–2072. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00742-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00742-X)
- Rojas, M., Arias, C.F., López, S., 2010. Protein Kinase R Is Responsible for the Phosphorylation of eIF2 α in Rotavirus Infection. *Journal of Virology* 84, 10457–10466. <https://doi.org/10.1128/JVI.00625-10>
- Rojas, M., Vasconcelos, G., Dever, T.E., 2015. An eIF2 α -binding motif in protein phosphatase 1 subunit GADD34 and its viral orthologs is required to promote

- dephosphorylation of eIF2 α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E3466-3475. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501557112>
- Romanov, J., Walczak, M., Ibricu, I., Schüchner, S., Ogris, E., Kraft, C., Martens, S., 2012. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J* 31, 4304–4317. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.278>
- Rompay, K.K.A.V., Keesler, R.I., Ardeshir, A., Watanabe, J., Usachenko, J., Singapuri, A., Cruzen, C., Bliss-Moreau, E., Murphy, A.M., Yee, J.L., Webster, H., Dennis, M., Singh, T., Heimsath, H., Lemos, D., Stuart, J., Morabito, K.M., Foreman, B.M., Burgomaster, K.E., Noe, A.T., Dowd, K.A., Ball, E., Woolard, K., Presicce, P., Kallapur, S.G., Permar, S.R., Foulds, K.E., Coffey, L.L., Pierson, T.C., Graham, B.S., 2019. DNA vaccination before conception protects Zika virus–exposed pregnant macaques against prolonged viremia and improves fetal outcomes. *Science Translational Medicine* 11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay2736>
- Rong, Y.-P., Aromolaran, A.S., Bultynck, G., Zhong, F., Li, X., McColl, K., Matsuyama, S., Herlitze, S., Roderick, H.L., Bootman, M.D., Mignery, G.A., Parys, J.B., De Smedt, H., Distelhorst, C.W., 2008. Targeting Bcl-2-IP3 Receptor Interaction to Reverse Bcl-2's Inhibition of Apoptotic Calcium Signals. *Mol Cell* 31, 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.014>
- Rönblom, L., Leonard, D., 2019. Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Science & Medicine* 6, e000270. <https://doi.org/10.1136/lupus-2018-000270>
- Rouse, B.T., Sehrawat, S., 2010. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nature Reviews Immunology* 10, 514–526. <https://doi.org/10.1038/nri2802>
- Royle, J., Ramírez-Santana, C., Akpunarlieva, S., Donald, C.L., Gestuveo, R.J., Anaya, J.-M., Merits, A., Burchmore, R., Kohl, A., Varjak, M., 2020. Glucose-Regulated Protein 78 Interacts with Zika Virus Envelope Protein and Contributes to a Productive Infection. *Viruses* 12. <https://doi.org/10.3390/v12050524>
- Ryckebusch, F., Berthet, M., Missé, D., Choumet, V., 2017. Infection of a French Population of *Aedes albopictus* and of *Aedes aegypti* (Paea Strain) with Zika Virus Reveals Low Transmission Rates to These Vectors' Saliva. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 2384. <https://doi.org/10.3390/ijms18112384>
- Saiz, J.-C., Oya, N.J. de, Blázquez, A.-B., Escribano-Romero, E., Martín-Acebes, M.A., 2018. Host-Directed Antivirals: A Realistic Alternative to Fight Zika Virus. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10090453>
- Sampieri, C.L., Montero, H., 2019. Breastfeeding in the time of Zika: a systematic literature review. *PeerJ* 7, e6452. <https://doi.org/10.7717/peerj.6452>

- Samson, A.L., Zhang, Y., Geoghegan, N.D., Gavin, X.J., Davies, K.A., Mlodzianoski, M.J., Whitehead, L.W., Frank, D., Garnish, S.E., Fitzgibbon, C., Hempel, A., Young, S.N., Jacobsen, A.V., Cawthorne, W., Petrie, E.J., Faux, M.C., Shield-Artin, K., Lalaoui, N., Hildebrand, J.M., Silke, J., Rogers, K.L., Lessene, G., Hawkins, E.D., Murphy, J.M., 2020. MLKL trafficking and accumulation at the plasma membrane control the kinetics and threshold for necroptosis. *Nature Communications* 11, 3151. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16887-1>
- Sanjuán, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M., Belshaw, R., 2010. Viral Mutation Rates. *J Virol* 84, 9733–9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
- Sarmiento-Ospina, A., Vásquez-Serna, H., Jimenez-Canizales, C.E., Villamil-Gómez, W.E., Rodriguez-Morales, A.J., 2016. Zika virus associated deaths in Colombia. *The Lancet Infectious Diseases* 16, 523–524. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30006-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30006-8)
- Schiela, B., Bernklau, S., Malekshahi, Z., Deutschmann, D., Koske, I., Banki, Z., Thielens, N.M., Würzner, R., Speth, C., Weiss, G., Stiasny, K., Steinmann, E., Stoiber, H., 2018. Active Human Complement Reduces the Zika Virus Load via Formation of the Membrane-Attack Complex. *Front Immunol* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02177>
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., Rice, C.M., 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol* 32, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schnettler, E., Sterken, M.G., Leung, J.Y., Metz, S.W., Geertsema, C., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., Kohl, A., Khromykh, A.A., Pijlman, G.P., 2012. Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells. *Journal of Virology* 86, 13486–13500. <https://doi.org/10.1128/JVI.01104-12>
- Schwartz, D.A., 2018. Clinical Trials and Administration of Zika Virus Vaccine in Pregnant Women: Lessons (that Should Have Been) Learned from Excluding Immunization with the Ebola Vaccine during Pregnancy and Lactation. *Vaccines (Basel)* 6. <https://doi.org/10.3390/vaccines6040081>
- Serna, M., Giles, J.L., Morgan, B.P., Bubeck, D., 2016. Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nature Communications* 7, 10587. <https://doi.org/10.1038/ncomms10587>
- Sevvana, M., Long, F., Miller, A.S., Klose, T., Buda, G., Sun, L., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2018. Refinement and Analysis of the Mature Zika Virus Cryo-EM Structure at 3.1 Å Resolution. *Structure* 26, 1169–1177.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.05.006>

- Shaily, S., Upadhyaya, A., 2019. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. *Reviews in Medical Virology* 29, e2050. <https://doi.org/10.1002/rmv.2050>
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S., 2015. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22, 526–539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
- Sheridan, M.A., Balaraman, V., Schust, D.J., Ezashi, T., Roberts, R.M., Franz, A.W.E., 2018. African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. *PLoS One* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200086>
- Shortt, J., Johnstone, R.W., 2012. *Oncogenes in Cell Survival and Cell Death*. Cold Spring Harb Perspect Biol 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009829>
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y.J., 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835–1837. <https://doi.org/10.1126/science.284.5421.1835>
- Silveira, E.L.V., Rogers, K.A., Gumber, S., Amancha, P., Xiao, P., Woollard, S.M., Byraredy, S.N., Teixeira, M.M., Villinger, F., 2017. Immune Cell Dynamics in Rhesus Macaques Infected with a Brazilian Strain of Zika Virus. *J Immunol* 199, 1003–1011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700256>
- Simizu, S., Tamura, Y., Osada, H., 2004. Dephosphorylation of Bcl-2 by protein phosphatase 2A results in apoptosis resistance. *Cancer Sci.* 95, 266–270. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02214.x>
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., Stapleton, J.T., 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol* 98, 2–3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
- Simon, H.-U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415–418. <https://doi.org/10.1023/A:1009616228304>
- Simoni, M.K., Jurado, K.A., Abrahams, V.M., Fikrig, E., Guller, S., 2017. Zika virus infection of Hofbauer cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 77, e12613. <https://doi.org/10.1111/aji.12613>
- Simonin, Y., Riel, D. van, Perre, P.V. de, Rockx, B., Salinas, S., 2017. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11, e0005821. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005821>

- Simpson, D.I., 1964. ZIKA VIRUS INFECTION IN MAN. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58, 335–338.
- Singh, P., Chakraborty, P., He, D.-H., Mergia, A., 2019. Extract prepared from the leaves of *Ocimum basilicum* inhibits the entry of Zika virus. *Acta Virol* 63, 316–321. https://doi.org/10.4149/av_2019_307
- Sirohi, D., Kuhn, R.J., 2017. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis* 216, S935–S944. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix515>
- Slonchak, A., Hugo, L.E., Freney, M., Amarilla, A.A., Hall-Mendelin, S., Yan, K., Torres, F., Setoh, Y.X., Peng, N., Chaggar, H.K., Hurk, A.V.D., Wolvetang, E., Suhrbier, A., Devine, G.J., Khromykh, A.A., 2020a. Zika Virus sfRNA Plays an Essential Role in the Infection of Insects and Mammals. *Proceedings* 50, 112. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020050112>
- Slonchak, A., Hugo, L.E., Freney, M.E., Hall-Mendelin, S., Amarilla, A.A., Torres, F.J., Setoh, Y.X., Peng, N.Y.G., Sng, J.D.J., Hall, R.A., Hurk, A.F. van den, Devine, G.J., Khromykh, A.A., 2020b. Zika virus noncoding RNA suppresses apoptosis and is required for virus transmission by mosquitoes. *Nat Commun* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16086-y>
- Smithburn, K.C., 1952. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. *J. Immunol.* 69, 223–234.
- Somers, J., Pöyry, T., Willis, A.E., 2013. A perspective on mammalian upstream open reading frame function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 1690–1700. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.020>
- Sommariva, S., Vamos, C., Mantzarlis, A., Đào, L.U.-L., Tyson, D.M., 2018. Spreading the (Fake) News: Exploring Health Messages on Social Media and the Implications for Health Professionals Using a Case Study. *American Journal of Health Education* 49, 246–255. <https://doi.org/10.1080/19325037.2018.1473178>
- Sooknanan, J., Comissiong, D.M.G., 2020. Trending on Social Media: Integrating Social Media into Infectious Disease Dynamics. *Bull Math Biol* 82. <https://doi.org/10.1007/s11538-020-00757-4>
- Sousa, J.R. de, Azevedo, R.S.S., Filho, A.J.M., Araujo, M.T.F., Moutinho, E.R.C., Vasconcelos, B.C.B., Cruz, A.C.R., Oliveira, C.S., Martins, L.C., Vasconcelos, B.H.B., Casseb, L.M.N., Chiang, J.O., Quaresma, J.A.S., Vasconcelos, P.F.C., 2018. Correlation between Apoptosis and in Situ Immune Response in Fatal Cases of Microcephaly Caused by Zika Virus. *The American Journal of Pathology* 188, 2644–2652. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.07.009>
- Souza, B.S.F., Sampaio, G.L.A., Pereira, C.S., Campos, G.S., Sardi, S.I., Freitas, L.A.R., Figueira, C.P., Paredes, B.D., Nonaka, C.K.V., Azevedo, C.M., Rocha, V.P.C.,

- Bandeira, A.C., Mendez-Otero, R., dos Santos, R.R., Soares, M.B.P., 2016. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Scientific Reports* 6, 39775. <https://doi.org/10.1038/srep39775>
- Sperandio, S., Poksay, K., de Belle, I., Lafuente, M.J., Liu, B., Nasir, J., Bredesen, D.E., 2004. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death & Differentiation* 11, 1066–1075. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401465>
- Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D.A., Graham, V., Cassotta, A., Bianchi, S., Vanzetta, F., Minola, A., Jaconi, S., Mele, F., Foglierini, M., Pedotti, M., Simonelli, L., Dowall, S., Atkinson, B., Percivalle, E., Simmons, C.P., Varani, L., Blum, J., Baldanti, F., Cameroni, E., Hewson, R., Harris, E., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Corti, D., 2016. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science* 353, 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8505>
- Stone, M., Bakkour, S., Lanteri, M.C., Brambilla, D., Simmons, G., Bruhn, R., Kaidarova, Z., Lee, T.-H., Alsina, J.O., Williamson, P.C., Galel, S.A., Pate, L.L., Linnen, J.M., Kleinman, S., Busch, M.P., 2020. Zika virus RNA and IgM persistence in blood compartments and body fluids: a prospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases* 0. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30708-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30708-X)
- Suzuki, T., Okamoto, T., Katoh, H., Sugiyama, Y., Kusakabe, S., Tokunaga, M., Hirano, J., Miyata, Y., Fukuhara, T., Ikawa, M., Satoh, T., Yoshio, S., Suzuki, R., Saijo, M., Huang, D.C.S., Kanto, T., Akira, S., Matsuura, Y., 2018. Infection with flaviviruses requires BCLXL for cell survival. *PLOS Pathogens* 14, e1007299. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007299>
- Tabas, I., Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13, 184–190. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>
- Tait, S.W.G., Green, D.R., 2013. Mitochondrial Regulation of Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008706>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tallon, A.K., Lorenzo, M.G., Moreira, L.A., Villegas, L.E.M., Hill, S.R., Ignell, R., 2020. Dengue infection modulates locomotion and host seeking in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14, e0008531. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008531>
- Tan, L.K., Wong, W.Y., Yang, H.T., Huber, R.G., Bond, P.J., Ng, L.C., Maurer-Stroh, S., Hapuarachchi, H.C., 2020. Flavivirus Cross-Reactivity to Dengue Nonstructural Protein 1 Antigen Detection Assays. *Diagnostics* 10, 11. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10010011>

- Tan, M.J.A., Chan, K.W.K., Ng, I.H.W., Kong, S.Y.Z., Gwee, C.P., Watanabe, S., Vasudevan, S.G., 2019. The Potential Role of the ZIKV NS5 Nuclear Spherical-Shell Structures in Cell Type-Specific Host Immune Modulation during ZIKV Infection. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8121519>
- Tan, T.Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V.A., Ng, T.-S., Lim, X.-X., Zhang, S., Lim, X.-N., Wang, J., Shi, J., Morais, M.C., Corti, D., Lok, S.-M., 2020. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>
- Tang, B., Xiao, Y., Sander, B., Kulkarni, M.A., RADAM-LAC Research Team, Wu, J., 2020. Modelling the impact of antibody-dependent enhancement on disease severity of Zika virus and dengue virus sequential and co-infection. *R Soc Open Sci* 7. <https://doi.org/10.1098/rsos.191749>
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S.C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., Shin, J., Zhang, F., Lee, E.M., Christian, K.M., Didier, R.A., Jin, P., Song, H., Ming, G., 2016. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 18, 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>
- Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 445, 77–88. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4
- 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., Schmidt-Chanasit, J., 2016. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to reconvalescent phase. *Med Microbiol Immunol* 205, 269–273. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0445-7>
- Taylor, S.S., Haste, N.M., Ghosh, G., 2005. PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* 122, 823–825. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.007>
- Teng, Y., Liu, Shufeng, Guo, X., Liu, Shuxia, Jin, Y., He, T., Bi, D., Zhang, P., Lin, B., An, X., Feng, D., Mi, Z., Tong, Y., 2017. An Integrative Analysis Reveals a Central Role of P53 Activation via MDM2 in Zika Virus Infection Induced Cell Death. *Front Cell Infect Microbiol* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00327>
- Thaker, S.K., Chapa, T., Garcia, G., Gong, D., Schmid, E.W., Arumugaswami, V., Sun, R., Christofk, H.R., 2019. Differential Metabolic Reprogramming by Zika Virus Promotes Cell Death in Human versus Mosquito Cells. *Cell Metabolism* 29, 1206–1216.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.024>
- Thomson, B.J., 2001. Viruses and apoptosis. *International Journal of Experimental Pathology* 82, 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2001.iep195.x>

- Thyrell, L., Erickson, S., Zhivotovsky, B., Pokrovskaja, K., Sangfelt, O., Castro, J., Einhorn, S., Grandér, D., 2002. Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 21, 1251–1262. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205179>
- Tonnerre, P., Melgaço, J.G., Torres-Cornejo, A., Pinto, M.A., Yue, C., Blümel, J., de Sousa, P.S.F., de Mello, V. da M., Moran, J., de Filippis, A.M.B., Wolski, D., Grifoni, A., Sette, A., Barouch, D.H., Hoogeveen, R.C., Baylis, S.A., Lauer, G.M., Lewis-Ximenez, L.L., 2020. Evolution of the innate and adaptive immune response in women with acute Zika virus infection. *Nature Microbiology* 5, 76–83. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0618-z>
- Tricarico, P.M., Caracciolo, I., Crovella, S., D’Agaro, P., 2017. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 492, 597–602. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.158>
- Tsuchiya, Y., Nakabayashi, O., Nakano, H., 2015. FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 30321–30341. <https://doi.org/10.3390/ijms161226232>
- Tummers, B., Green, D.R., 2017. Caspase-8; regulating life and death. *Immunol Rev* 277, 76–89. <https://doi.org/10.1111/imr.12541>
- Turpin, J., Frumence, E., Harrabi, W., Kalamouni, C.E., Desprès, P., Krejbich-Trotot, P., Viranaïcken, W., 2019. Crosstalk Between Endoplasmic Reticulum Stress and The Unfolded Protein Response During ZIKA Virus Infection. <https://doi.org/10.20944/preprints201910.0024.v1>
- van der Linden, V., Pessoa, A., Dobyns, W., Barkovich, A.J., Júnior, H. van der L., Filho, E.L.R., Ribeiro, E.M., Leal, M. de C., Coimbra, P.P. de A., Aragão, M. de F.V.V., Verçosa, I., Ventura, C., Ramos, R.C., Cruz, D.D.C.S., Cordeiro, M.T., Mota, V.M.R., Dott, M., Hillard, C., Moore, C.A., 2016. Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 1343–1348. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6547e2>
- Van Vlack, E.R., Seeliger, J.C., 2018. Acid Trip: Zika Virus Goes Off-Pathway during pH-Triggered Membrane Fusion. *ACS Cent Sci* 4, 1454–1456. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00706>
- Vasudevan, D., Ryoo, H.D., 2015. Regulation of Cell Death by IAPs and their Antagonists. *Curr Top Dev Biol* 114, 185–208. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.026>
- Vattem, K.M., Wek, R.C., 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11269–11274. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400541101>

- Villordo, S.M., Filomatori, C.V., Sánchez-Vargas, I., Blair, C.D., Gamarnik, A.V., 2015. Dengue Virus RNA Structure Specialization Facilitates Host Adaptation. *PLOS Pathogens* 11, e1004604. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004604>
- Wang, P., Arjona, A., Zhang, Y., Sultana, H., Dai, J., Yang, L., LeBlanc, P.M., Doiron, K., Saleh, M., Fikrig, E., 2010. Caspase-12 controls West Nile virus infection via the viral RNA receptor RIG-I. *Nat Immunol* 11, 912–919. <https://doi.org/10.1038/ni.1933>
- Wang, Q., Xin, X., Wang, T., Wan, J., Ou, Y., Yang, Z., Yu, Q., Zhu, L., Guo, Y., Wu, Y., Ding, Z., Zhang, Y., Pan, Z., Tang, Y., Li, S., Kong, L., 2019. Japanese Encephalitis Virus Induces Apoptosis and Encephalitis by Activating the PERK Pathway. *J Virol* 93. <https://doi.org/10.1128/JVI.00887-19>
- Wang, W., Cheng, J., Sun, A., Lv, S., Liu, H., Liu, X., Guan, G., Liu, G., 2015. TRB3 mediates renal tubular cell apoptosis associated with proteinuria. *Clin Exp Med* 15, 167–177. <https://doi.org/10.1007/s10238-014-0287-4>
- Wang, W., Li, G., De Wu, Luo, Z., Pan, P., Tian, M., Wang, Y., Xiao, F., Li, A., Wu, K., Liu, X., Rao, L., Liu, F., Liu, Y., Wu, J., 2018. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 β secretion. *Nature Communications* 9, 106. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02645-3>
- Watanabe, M., Buth, J.E., Vishlaghi, N., de la Torre-Ubieta, L., Taxidis, J., Khakh, B.S., Coppola, G., Pearson, C.A., Yamauchi, K., Gong, D., Dai, X., Damoiseaux, R., Aliyari, R., Liebscher, S., Schenke-Layland, K., Caneda, C., Huang, E.J., Zhang, Y., Cheng, G., Geschwind, D.H., Golshani, P., Sun, R., Novitsch, B.G., 2017. Self-Organized Cerebral Organoids with Human-Specific Features Predict Effective Drugs to Combat Zika Virus Infection. *Cell Reports* 21, 517–532. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.047>
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., Levine, B., 2008. JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Mol Cell* 30, 678–688. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.001>
- Weiss, R.A., McMichael, A.J., 2004. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nature Medicine* 10, S70–S76. <https://doi.org/10.1038/nm1150>
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., Kluck, R.M., 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mitochondria: The Deadly Organelle* 1813, 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.019>
- WHO | Sexual transmission of Zika Virus: Current status, challenges and research priorities [WWW Document], n.d. . WHO. URL

<http://www.who.int/reproductivehealth/zika/sexual-transmission-experts-meeting/en/>
(accessed 4.6.20).

- Wilkinson, D.A., Marshall, J.C., French, N.P., Hayman, D.T.S., 2018. Habitat fragmentation, biodiversity loss and the risk of novel infectious disease emergence. *Journal of The Royal Society Interface* 15, 20180403. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0403>
- Winkler, C.W., Myers, L.M., Woods, T.A., Messer, R.J., Carmody, A.B., McNally, K.L., Scott, D.P., Hasenkrug, K.J., Best, S.M., Peterson, K.E., 2017. Adaptive Immune Responses To Zika Virus Are Important For Controlling Virus Infection And Preventing Infection In Brain And Testes. *J Immunol* 198, 3526–3535. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601949>
- Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., Yang, H., Cui, J., 2017. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins *in vitro*. *Cell Discovery* 3, 17006. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.6>
- Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A.E., Nunes, B.T.D., Medeiros, D.B.A., Zou, J., Xie, X., Giraldo, M.I., Vasconcelos, P.F.C., Weaver, S.C., Wang, T., Rajsbaum, R., Shi, P.-Y., 2018. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature Communications* 9, 414. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2>
- Xie, X., Zou, J., Wang, Q.-Y., Shi, P.-Y., 2015. Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral Research* 118, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.007>
- Ximenes, R., Ramsay, L.C., Miranda, R.N., Morris, S.K., Murphy, K., Sander, B., 2019. Health outcomes associated with Zika virus infection in humans: a systematic review of systematic reviews. *BMJ Open* 9, e032275. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-032275>
- Xu, M., Lee, E.M., Wen, Z., Cheng, Y., Huang, W.-K., Qian, X., Tcw, J., Kouznetsova, J., Ogden, S.C., Hammack, C., Jacob, F., Nguyen, H.N., Itkin, M., Hanna, C., Shinn, P., Allen, C., Michael, S.G., Simeonov, A., Huang, W., Christian, K.M., Goate, A., Brennand, K.J., Huang, R., Xia, M., Ming, G.-L., Zheng, W., Song, H., Tang, H., 2016. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat Med* 22, 1101–1107. <https://doi.org/10.1038/nm.4184>
- Yadav, P.D., Malhotra, B., Sapkal, G., Nyayanit, D.A., Deshpande, G., Gupta, N., Padinjaremmattathil, U.T., Sharma, H., Sahay, R.R., Sharma, P., Mourya, D.T., 2019. Zika virus outbreak in Rajasthan, India in 2018 was caused by a virus endemic to Asia. *Infect. Genet. Evol.* 69, 199–202. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.026>

- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., 2003. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science* 301, 640–643. <https://doi.org/10.1126/science.1087262>
- Yamaoka, Y., Matsunaga, S., Jeremiah, S.S., Nishi, M., Miyakawa, K., Morita, T., Khatun, H., Shimizu, H., Okabe, N., Kimura, H., Hasegawa, H., Ryo, A., 2021. Zika virus protease induces caspase-independent pyroptotic cell death by directly cleaving gasdermin D. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 534, 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.023>
- Yang, F., Chan, K., Brewster, C.C., Paulson, S.L., 2019. Effects of La Crosse virus infection on the host-seeking behavior and levels of two neurotransmitters in *Aedes triseriatus*. *Parasites & Vectors* 12, 397. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3658-6>
- Yang, Q.-H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L., Du, C., 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 17, 1487–1496. <https://doi.org/10.1101/gad.1097903>
- Yang, W., Wu, Y.-H., Liu, S.-Q., Sheng, Z.-Y., Zhen, Z.-D., Gao, R.-Q., Cui, X.-Y., Fan, D.-Y., Qin, Z.-H., Zheng, A.-H., Wang, P.-G., An, J., 2020. S100A4+ macrophages facilitate zika virus invasion and persistence in the seminiferous tubules via interferon-gamma mediation. *PLOS Pathogens* 16, e1009019. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009019>
- Yang, Y., Liu, L., Naik, I., Braunstein, Z., Zhong, J., Ren, B., 2017. Transcription Factor C/EBP Homologous Protein in Health and Diseases. *Front Immunol* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01612>
- Ye, Q., Liu, Z.-Y., Han, J.-F., Jiang, T., Li, X.-F., Qin, C.-F., 2016. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infection, Genetics and Evolution* 43, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.004>
- Yoshii, K., Igarashi, M., Ichii, O., Yokozawa, K., Ito, K., Kariwa, H., Takashima, I., 2012. A conserved region in the prM protein is a critical determinant in the assembly of flavivirus particles. *Journal of General Virology*, 93, 27–38. <https://doi.org/10.1099/vir.0.035964-0>
- Zaidi, M.B., Cedillo-Barron, L., González y Almeida, M.E., Garcia-Cordero, J., Campos, F.D., Namorado-Tonix, K., Perez, F., 2020. Serological tests reveal significant cross-reactive human antibody responses to Zika and Dengue viruses in the Mexican population. *Acta Tropica* 201, 105201. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105201>

- Zhang, F., Moon, A., Childs, K., Goodbourn, S., Dixon, L.K., 2010. The African Swine Fever Virus DP71L Protein Recruits the Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit To Dephosphorylate eIF2 α and Inhibits CHOP Induction but Is Dispensable for These Activities during Virus Infection. *Journal of Virology* 84, 10681–10689. <https://doi.org/10.1128/JVI.01027-10>
- Zhang, X., Jia, R., Shen, H., Wang, M., Yin, Z., Cheng, A., 2017. Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. *Viruses* 9. <https://doi.org/10.3390/v9110338>
- Zhao, B., Yi, G., Du, F., Chuang, Y.-C., Vaughan, R.C., Sankaran, B., Kao, C.C., Li, P., 2017. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nature Communications* 8, 14762. <https://doi.org/10.1038/ncomms14762>
- Zheng, X., Zhang, D., Li, Y., Yang, C., Wu, Y., Liang, X., Liang, Y., Pan, X., Hu, L., Sun, Q., Wang, X., Wei, Y., Zhu, J., Qian, W., Yan, Z., Parker, A.G., Gilles, J.R.L., Bourtzis, K., Bouyer, J., Tang, M., Zheng, B., Yu, J., Liu, J., Zhuang, J., Hu, Zhigang, Zhang, M., Gong, J.-T., Hong, X.-Y., Zhang, Z., Lin, L., Liu, Q., Hu, Zhiyong, Wu, Z., Baton, L.A., Hoffmann, A.A., Xi, Z., 2019. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature* 572, 56–61. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1407-9>
- Zheng, Y., Liu, Q., Wu, Y., Ma, L., Zhang, Z., Liu, T., Jin, S., She, Y., Li, Y.-P., Cui, J., 2018. Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1-caspase-1 axis. *The EMBO Journal* 37, e99347. <https://doi.org/10.15252/emboj.201899347>
- Zhu, Z., Chan, J.F.-W., Tee, K.-M., Choi, G.K.-Y., Lau, S.K.-P., Woo, P.C.-Y., Tse, H., Yuen, K.-Y., 2016. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerging Microbes & Infections* 5, 1–12. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.48>
- Zulu, M.Z., Martinez, F.O., Gordon, S., Gray, C.M., 2019. The Elusive Role of Placental Macrophages: The Hofbauer Cell. *JIN* 11, 447–456. <https://doi.org/10.1159/000497416>

Brief Report

Crosstalk Between Endoplasmic Reticulum Stress and The Unfolded Protein Response During ZIKA Virus Infection

Jonathan Turpin^a, Etienne Frumence^a, Wissal Harrabi, Chaker El Kalamouni, Philippe Desprès, Pascale Krejbich-Trotot^{*}, Wildriss Viranaïcken^{*}.

PIMIT, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme CYROI, 2, rue Maxime Rivière, 97490 Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France.

* Correspondence: wildriss.viranaïcken@univ-reunion.fr, pascale.krebich@univ-reunion.fr; Tel.: +33-262938829

^a Contribute equally to this work.

Abstract: Flaviviruses replicate in membranous factories associated with the endoplasmic reticulum (ER). The replication rate generates a high polypeptide integration that can contribute to ER stress. Therefore, the host cell can develop an Unfolded Protein Response (UPR) to this protein accumulation which will stimulate appropriate cellular responses in the infectious context (Adaptation, autophagy or cell death). These different stress responses can help to overcome the virus and usually support antiviral strategies initiated by infected cells. In the present study, we investigated the capacity of ZIKA virus (ZIKV) to induce ER stress in epithelial A549 cells with a special focus on the causal factors behind it. We observed that the cells respond to ZIKV infection by implementing an UPR through activation of the IRE1 and PERK pathway but surprisingly without activation of the ATF6 branch. When we examined the effects of modulating the ER stress response we found that UPR inducers significantly inhibit ZIKV replication. Interestingly, our findings provide evidence that ZIKV can alter the UPR in order to escape to the host cell defense system.

Keywords: ZIKA virus; ER stress; Unfolded Protein Response; ATF6



1. Introduction

Endoplasmic reticulum (ER) is an essential cell compartment for several key mechanisms in cell physiology like membrane biosynthesis and calcium storage. These include also incorporation of newly synthesized proteins intended to be addressed or secreted and their post-translational modifications and folding. The correct folding of the proteins allowed to carry on their centrifugal transport in a cell depends on the N-linked protein glycosylation, the oxidative environment in the ER lumen which promotes the formation of disulfide bonds, and the presence of several Ca^{2+} -dependent molecular chaperones (calreticulin, GRP78 also named BiP and GRP94) which stabilize protein folding intermediates [1,2]. ER homeostasis can be perturbed in case of glucose starvation, hypoxia, calcium dysregulation or following a protein accumulation which will in turn provoke ER stress. ER homeostasis is then maintained through a tight association with the Unfolded Protein Response (UPR) that also mediates stress resolution. In cells infected by a virus, the huge and sudden amount of viral proteins that need to be processed usually leads to ER stress and UPR. This cell response was therefore shown to be involved in the implementation of several cell defenses, *i.e.* antiviral programs, immune responses [3] and commitment in autophagy or cell suicide [4,5]. During ER stress, the folding chaperone GRP78/BiP dissociates from three ER-resident transmembrane proteins *i.e.* PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1) and activating transcription factor 6 (ATF6) [6]. Each will act as a stress transducer in three different pathways devoted to stress resolution. Thus, the activated kinase activity of PERK results in phosphorylation of eIF2 α , followed by a transitory translational attenuation and consequently a reduced ER influx of newly synthesized proteins. For the activated IRE1, its endonuclease function produces a spliced form of the x-box binding protein 1(Xbp1) transcript. This spliced Xbp1 encodes a transcription factor in charge of genes coding for several factors aimed at resolving ER stress. Regarding ATF6, the soluble factor can egress from the ER to Golgi apparatus for maturation by S1P or S2P cleavage to generate ATF6f. Then ATF6f reaches the nucleus where it regulates UPR target gene expression. Transcriptional activity of ATF6 and Xbp1 leads to the increased expression of chaperones and proteins implicated in enhanced folding capacity or in ER-associated protein degradation (ERAD). Despite the implementation of an UPR with these adaptive mechanisms, an excessive, unresolved or prolonged ER stress will turn the cell's fate into autophagy or apoptosis. Crosstalks between ER stress, UPR, autophagy and apoptosis are of particular importance in the case of virally infected cells since each of these responses will condition the cell health and the success of the virus in replicating and spreading.

ZIKA virus (ZIKV) is a pathogenic single-stranded RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family like Dengue virus (DENV), Yellow Fever virus (YFV) or West Nile virus (WNV). Among the pathogenic flaviviruses, ZIKV has gained notoriety in the last ten years, due to explosive

outbreaks and serious clinical concerns. Neurological complications have been described, including Guillain-Barré syndrome (GBS) and congenital malformations, prompting specific vigilance for pregnant women in the event of a Zika epidemic [7,8]. Due to these atypical clinical manifestations, the ability of ZIKV to be sexually transmitted and not only by vectorization, and the evidence of its persistence in some tissues, studies have been conducted at molecular and cellular levels to highlight the singularity of ZIKV-host interactions among other flaviviruses. As for other flaviviruses, ZIKV replication occurs in ER invaginations of infected cells and leads to an increasingly important synthesis of viral proteins [9–11]. The genome translation is followed by an incorporation in the ER membrane of a polyprotein further cleaved proteolytically in three structural proteins (C, M, and E) and seven nonstructural proteins NS1, NS2A, NS2B, NS3 (helicase and protease), NS4A, NS4B, and NS5 (RNA-dependent RNA polymerase and methyltransferase). This important protein processing can potentially cause ER stress. It has previously been shown that ZIKV has the ability to instruct an UPR in response to ER stress [12–16] and that infection is accompanied by morphological modification of cell organelles [17].

However, deciphering the initiating modalities of the ER stress, which transducing branches are involved for the UPR implementation and how crosstalks are carried out between ZIKV, ER stress and the cell responses, deserve thorough investigation.

In this present work, using A549 cells as a model, we examined which causal component may trigger ER stress during ZIKV infection. Imaging of infected cells revealed typical ER morphological changes associated with high viral protein density. We then highlighted, for the first time, the production of significant proportions of oligomers with insoluble disulfide bonded viral E proteins (E-ZIKV), indicative of misfolded or unfolded proteins. When we looked at the stress transduction mechanisms, we discovered that the UPR response was initiated by the host cell but with no activation of the ATF6 branch. Considering that a partial or impaired UPR could be beneficial for the virus, we tested the effects of stress inducers on infection. We then confirmed that exogenously-induced UPR was detrimental to ZIKV. We finally conclude that ZIKV has the ability to modulate UPR to its benefits with a mechanism that remains to be discovered.

2. Materials and Methods

Virus, Cell culture, antibodies and reagents

The clinical isolate PF-25013-18 (PF13) of ZIKV has been previously described [18]. A549 cells (ATCC, CCL-185) were cultured at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere in MEM medium

supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS). For viral progeny quantification, plaque forming assay, were done as described before [19].

The mouse anti-pan flavivirus envelope E protein mAb 4G2 was produced by RD Biotech, the rat anti-EDIII ZIKV was described previously [20]. The rabbit anti-Calnexin antibody was purchased from Santa-Cruz Biotechnology (Clinisiences, Nanterre, France). Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 594 IgG antibodies were from Invitrogen (ThermoFisher, Les Ulis, France). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (ab97051) and anti-mouse (ab6789) antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK). GRP78 (#3177) were from cell Signalling Technology (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France).

Thapsigargin (TG), an endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase inhibitor and Tunicamycin (Tm) an inhibitor of N-glycosylation were used to induce ER stress and UPR respectively at 1 μM and 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the indicated time in figure legends. These inhibitors were from Sigma-aldrich (Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France)

Luciferase Reporter assay

Plasmids with GRP94 and GRP78 promoter upstream of F-Luc (pGRP78-Luc and pGRP94-Luc) were from Dr. Kazutoshi Mori [21]. 1×10^6 cells were transfected with indicated plasmids using Lipofectamine 3000 according to manufacturer instructions (Invitrogen, ThermoFisher, Les Ulis, France) and 12h after were separated into three pools, the first one was mock treated, the second one were infected with ZIKV PF13 at MOI of 5 for 24h and the third one was treated with thapsigargin (1 μM) for 6 hours. Luciferase activities were measured using Luciferase Glo assay according to supplier's instructions (Promega, Madison, USA).

Cell fractionation and Western blot

Cells were washed with PBS and lysed at the concentration of 1×10^4 cells. μL^{-1} in buffer A (0.2% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA) as before. The Triton X-100-insoluble fraction was separated by centrifugation at 3,400 g for 10 min. Pellets were enriched in non-folded proteins and supernatant in Triton X-100 soluble proteins. All fractions were proceeding for western blot. All western blot experiments were proceeded as before with only one modification: protein in Laemmli buffer were not reduced by DTT and not boiled at 95°C for 5 min [22].

Total proteins cells extract was prepared by harvest of cells from plate in RIPA buffer after two washes with PBS. Cells were sonicated for 10" at 0.5 cycle with an amplitude of 50% using sonicator. Protein were treated in Laemmli buffer with DTT and boiled at 95°C for 5 min. western blot were perform as above.

Immunofluorescence

A549 cells were grown, infected or treated on glass coverslips and fixed with 3.7% formaldehyde at room temperature for 10 min. Fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 4 min. Coverslips were incubated with primary antibodies (1:1000 dilution) in 1% PBS BSA for two hours and with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000, Invitrogen) for one hour. Nucleus morphology was revealed by DAPI staining. The coverslips were mounted with VECTASHIELD® (Clinisciences, Nanterre, France) and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope. Images were captured and processed using a Hamamatsu ORCA2 ER camera and the imaging software NIS-Element AR (Nikon, Tokyo, Japan).

RT-PCR

Semi quantitative RT-PCR experiments were performed as before [22]. Primers used for RT-PCR were CHOP: F 5'-GCACCTCCCAGAGCCCTCACTCTCC-3', R 5'-GTCTACTCCAAGCCTTCCCCCTGCG-3'; GRP78: F 5'-CATCACGCCGTCCTATGTCG-3', R 5'-CGTCAAAGACCGTGTCTCG-3'; XBP1: F 5'-CCTTGAGTTGAGAACCAGG-3', R 5'-GGGGCTTGGTATATATGTGG-3'; NS1: F 5'-AGAGGACCATCTCTGAGATC-3', R 5'-GGCCTTATCTCCATTCCATACC-3'; GAPDH: F 5'-GGGAGCCAAAAGGGTCATCA-3', R 5'-TGATGGCATGGACTGTGGTC-3'. PCR products were analyzed on a 1.5% agarose gel electrophoresis and stained as described before [19].

Statistical analysis

All values are expressed as mean±SD of at least three independent experiments, as indicated in figure legends. After normality tests, comparisons between different treatments were analyzed by a one-way ANOVA tests. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant for a post-hoc Tukey's test. All statistical tests were done using the software Graph-Pad Prism version 7.01.

Degrees of significance are indicated in the figure captions as follow: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns=not significant.

3. Results and Discussion

3.1. ZIKV infection induces ER morphological changes and oligomerization of viral proteins.

When stressed, ER exhibits morphological characteristics with luminal swelling and membrane expansion [23]. These morphological changes can be observed by fluorescence microscopy. When we compared Calnexin expression, an ER typical marker, between A549 cells infected with the epidemic strain of ZIKV (PF13) and control (mock infected cells), we noticed morphological shape changes of the ER with an obvious swelling aspect (Figure 1A). Imaging of the infected cells also showed a co-staining between the immunodetected viral envelope protein (E-ZIKV) and the calnexin-staining, confirming that viral proteins are present in an enlarged and globe-shaped compartment related to the ER (Figure 1 A).

Accumulation of partially processed or misfolded proteins is known to be responsible for ER stress. In the case of ZIKV infection, we looked for the E-ZIKV protein accumulation and signs of associated misfolding. Using cell fractionation, as described before for ERGIC-53 proteins, we separated soluble and insoluble proteins [22] and observed the repartition of E-ZIKV between these two fractions (Figure 1B). Detection of E-ZIKV with an antibody raised against the domain III of the E protein (EDIII) revealed an accumulation of insoluble forms of E-ZIKV with a high molecular weight instead of the 55 KDa predicted molecular weight of the monomer (M). This high molecular weight is consistent with oligomers of the protein (Oligomer, O). When the western blot membrane was incubated with 4G2, a pan-flavivirus antibody that binds a conformational epitope which overlaps the E protein fusion loop [24], we observed that the antibody recognized E-ZIKV mainly in a monomeric form in the soluble fraction (Figure 1B). These observations suggest that during ZIKV infection, E proteins are produced and accumulated in diverse forms corresponding to a soluble, native and folded form of the protein but also to oligomerized unfolded or misfolded proteins retained in an insoluble fraction.

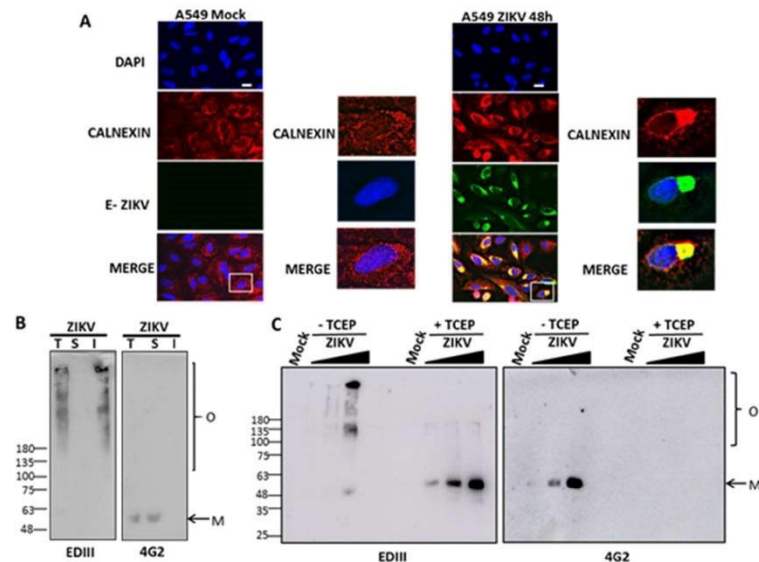


Figure 1. ZIKV infection is associated with morphological changes of ER and accumulation of insoluble disulfide bonded oligomers of E-ZIKV. (A) A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 1 for 48h. Cells were immunostained for calnexin and E-ZIKV. Scale bar: 10 μ m. Right panel series show magnified details of a selected cell from the x200 microscopic field (white square) (B) A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 5. 48h post-infection cells were lysed in TX100 buffer A. An equal volume of total (T), soluble (S) and insoluble (I) fractions were separated under non-reducing conditions and immuno-blotted for E-ZIKV with rat anti-EDIII or 4G2 antibody. (C) A549 cells were infected with increased quantities of ZIKV (MOI 0.5, 1 and 5) and total fraction were treated or not with TCEP before western blotting as in (B). Molecular weight marker was indicated on the left. All experiments were representative of three independent experiments.

As non-native disulfides bonds can prevent correct folding and should be reduced or isomerized to form the correct, native disulfides bonds [25], we hypothesized that oligomers of E-ZIKV could result from non-native disulfide bonds formed between E-ZIKV monomers. To test this hypothesis, we treated cell protein extracts with Tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP), a reducing agent, and performed immunodetection of E-ZIKV as above. With the antibody raised against the EDIII, we were able to detect mainly oligomers under non-reducing conditions and monomers upon reduction with TCEP (Figure 1C). With the 4G2 antibody, only the monomeric form of E-ZIKV could be detected and the signal was lost in the presence of TCEP (Figure 1C).

This observation argues in favour of a native folded E-ZIKV form that depends on intra-disulfide bonds. Conversely, unfolded or misfolded E-ZIKV would have led to disulfide bonded aggregates. Accumulation of this oligomerized forms of E-ZIKV and the morphological deformation of the ER lumen observed during ZIKV infection are concrete elements that support an effective ER stress. To our knowledge this is the first observation reporting an accumulation of this type of aggregate during an infection by flaviviruses. ER stress being settled upon ZIKV infection, one could expect it to be resolved by an appropriate cell response and implementation of UPR pathways.

3.2. Unfolded Protein Response during ZIKV infection in A549 cells

Upon ER stress, cells initiate an UPR to prevent a damaging persistence of the stress and to restore ER homeostasis. In order to decipher the stress transduction mechanisms induced upon ZIKV infection in A549 cells, we analyzed each of the three main UPR pathways. For this purpose, we investigated the expression level of target genes specific of each activated branch.

3.2.1. Effect of ZIKV infection on PERK and IRE1 pathways of UPR.

Activation of the PERK pathway results in eIF2 α phosphorylation which is followed by a reduced translation rate. It also leads to ATF4 upregulation. ATF4 is a transcription factor acting on several targets among which the C/EBP homologous protein (CHOP) encoding gene. This latter transcription factor plays a key role in stress resolution and in relationships between UPR, cell survival or cell death. We therefore followed activation of this PERK/ATF4 branch by a measure of the expression level of CHOP gene by RT-PCR (Figure 2A). Effective upregulation of CHOP at the transcriptional level suggests that the PERK branch of UPR was activated during ZIKV infection of A549 cells. This observation confirms previous findings in a model of ZIKV infected human neural stem cells [10].

The IRE1 pathway is characterized by the splicing of the Xbp1-transcript. The spliced Xbp1 (s-Xbp1) encodes a transcription factor able to transactivate genes mainly involved in ERAD. Splicing of Xbp1 was then followed by RT-PCR as an indicator of IRE1 branch activation. s-Xbp1 was detected upon ZIKV infection like in the thapsigargin (TG)-ER stress induced positive control

(Figure 2A). This result on the IRE branch activation by ZIKV was also in accordance with previous findings [10].

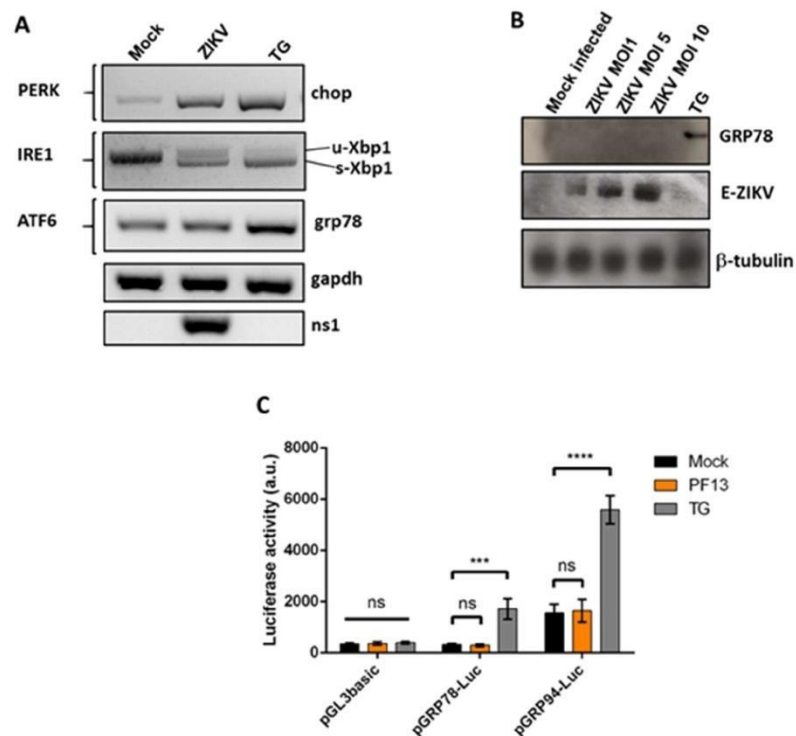


Figure 2. UPR branch activation during ZIKV infection. (A) A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 1 for 24h. RT-PCR were performed to monitor transcriptional regulation of downstream gene targets of the UPR branch, chop (PERK pathway), Xbp1 splicing (IRE1 pathway) and grp78 (ATF6 pathway). u-Xbp1 correspond to unspliced Xbp1 and s-Xbp1 to spliced Xbp1. (B) A549 cells infected with ZIKV at indicated MOI for 48h were lysed in buffer A, total protein extracts, under reducing conditions were immuno-blotted for E-ZIKV with EDIII antibody, GRP78 and β -tubulin as a loading control. (C) A549 cells (1×10^6 cells) were transfected with the indicated reporter constructs. After 12h, transfected cells were plated at a density of 3×10^4 cells per well and infected with ZIKV at MOI of 5. Luciferase activities were measured 24h post infection. For all experiments Thapsigargin-ER stress induced (TG) were used as positive control at $1 \mu\text{M}$ for 6h. RT-PCR and western blot experiments were representative of three independent experiments.

3.2.2 Effect of ZIKV infection on ATF6 branch of UPR

The third branch of UPR is mediated by maturation of ATF6 upon S1P or S2P processing in Golgi apparatus. Once translocated to the nucleus, mature ATF6 upregulates the expression of chaperone encoding genes like GRP78 (Bip) and GRP94. Quantitative increase of these chaperones, involved in the refolding of proteins critically contributes to ER stress resolution. Unlike what was obtained upon thapsigargin treatment of A549 cells, RT-PCR results revealed that *grp78* was not upregulated at the transcriptional level during ZIKV infection (Figure 2A). This observation is new and quite important as it could be a specificity being driven by ZIKV. Indeed, up to now, studies performed on the UPR branches implemented upon flaviviruses infections, like for DENV, do not report any inability of the infected cells to induce GRP78 in this A549 model [26].

We further investigated this lack of GRP78 upregulation by two approaches. We first checked the GRP78 protein levels by western blot in cells that were infected 48h by increased amount of ZIKV (MOI of 1, 5 and 10). Whatever the ZIKV-MOI condition and the related amount of viral protein produced, no expression of GRP78 could be detected (Figure 2B). We can notice that we have not been able to detect the protein GRP78 in the mock infected as in infected cells while a signal is obtained for *grp78* mRNA in RT PCR. We assume that the sensitivity of the immuno-detection with the antibody used (which reveals the presence of GRP78 in TG treated cells) is not sufficient when low levels of protein expression are present.

In a second approach, we monitored ATF6 activity using luciferase reporter constructs. We transfected A549 cells with plasmids encoding a F-Luc reporter gene downstream of GRP78 or GRP94 promoter. These two promoters contain the ER stress response element (ERSE) which is transactivated by ATF6. The UPR inducer thapsigargin induced an expression of the reporter gene under control of ERSE. This was not the case after ZIKV infection (Figure 2C). All together these results suggest that ZIKV infection provides a partial transduction of the ER stress with activation of the PERK/ATF4 and IRE1 pathways of the UPR but without any involvement of the ATF6 branch. The absence of re-folding chaperone induction can have a main consequence, a failure of the adaptive response. This could lead to persistent ER stress or an interplay with programmed cell death by signaling pathway downstream of PERK activation with CHOP regulation of proteins involved in apoptosis like BIM, Bcl-2 and PUMA [27].

3.3 Crosstalk between UPR and ZIKV

Given the implementation of UPR without ATF6 branch activation during ZIKV infection (Figure 2) associated with the accumulation of non-native disulfide bonds oligomers of E-ZIKV (Figure 1B, 1C) and considering that ZIKV can delay apoptosis [18,28,29], we hypothesized that ZIKV infection can lead to a persistent and unresolved ER stress. In light of this, we investigated the crosstalk between ZIKV and UPR by testing the effects of an exogenous induction of UPR on ZIKV infection.

3.3.1 UPR Affects ZIKV infection

ER stress can be induced by the action of tunicamycin (Tm), an inhibitor of N-glycosylation. The resulting UPR can be qualified as 'standard' with activation of the PERK, IRE1 and ATF6 pathways [30]. In order to see the effect of exogenous activation of UPR on ZIKV infection, we added this inducer on infected cells, 2h after ZIKV inoculation. Cells were harvested and cell culture supernatant collected after 16h of treatment with Tm. When we looked at the viral protein expression in cells, as an indicator of viral replication efficiency, we observed a dose dependent reduction of E-ZIKV following Tm treatment (Figure 3A). When we looked at the viral progeny production in cell supernatants, we found that this production was completely abrogated even at low-dose of Tm (Figure 3B). Using thapsigargin (TG), an ER stress and UPR inducer by alteration of Ca^{2+} homeostasis, for a similar 16 h treatment, 2h after ZIKV inoculation, we observed the same inhibition of ZIKV infection (data not shown). These observations suggest that a 'standard' UPR has the ability to interfere with ZIKV replication efficiency, independently of the nature of the UPR inducer.

3.3.2 ZIKV Infection Modulates the UPR in A549 cells

As we found that ZIKV infection in A549 cells led to ER stress and UPR but with an impaired ATF6 branch with no GRP78 induction, we hypothesized that ZIKV could hijack this UPR branch and could take advantage of an unresolved ER stress. To test this hypothesis, we treated ZIKV infected cells with TG for 4h and analyzed GRP78 expression by WB (Figure 3C). As mentioned above, we observed a reduction in E-ZIKV expression, even with a shorter treatment with the UPR inducer (4h of TG instead of 16h of Tm treatment in figure 3A). We also confirmed that ZIKV infection was not able to upregulate GRP78 at the protein level. Furthermore, when we compared the TG treatment alone and in the presence of ZIKV, we found that the virus decreased the level of GRP78 protein induced by TG. All together these data favor our hypothesis that UPR affects

ZIKV replication, but that the virus has acquired the ability to block partially this response. The interference with UPR can lead to unresolved and persistent ER stress.

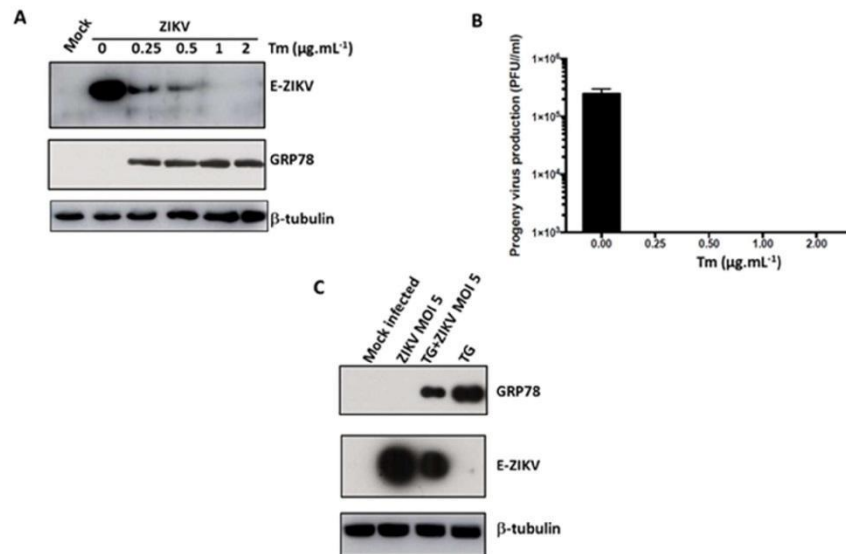


Figure 3. Crosstalk between UPR and ZIKV during infection. (A) A549 cells were infected with ZIKV at MOI of 5 for 18h. 2h post-infection tunicamycin (Tm) was added at the indicated concentration. Total protein extract under reducing conditions were immuno-blotted for E-ZIKV with EDIII antibody, GRP78 and β -tubulin as a loading control. (B) Viral progeny production in cell culture supernatants of cells infected and treated with Tm were determined by PFU assay on Vero cells. (C) A549 cells were infected or not with ZIKV for 16h at MOI of 5, followed by 4h treatment with TG at 1 μ M. Western blot were performed on total extract as in (A). All western blot experiments were representative of three independent experiments.

4. Conclusion

Our study showed that ZIKV infection of epithelial A549 cells could trigger an ER stress through an accumulation of disulfide-bonded oligomers of viral proteins. We confirmed the activation of an UPR in this cell model, however, our observations suggest that ZIKV exhibits some

unconventional specificities in terms of ER stress signaling, compared to other flaviviruses [31]. In addition, we found that an UPR can affect ZIKV efficiency during its infectious process, but that ZIKV has the ability to hijack the ATF6 branch of UPR. Therefore, we hypothesize that a mis-resolved and persistent ER stress is implemented during ZIKV infection and will favor the virus multiplication.

As ER dysfunctions combined with aggregated protein accumulation are responsible for neuronal degeneration in numerous human diseases, especially the ones related to conformational diseases [32,33], we guess that a virally orchestrated persistent ER stress with aggregated proteins accumulated in infected cells may contribute to the congenital complications observed during Zika epidemics, such as microcephaly. Indeed, maintaining a long lasting ER stress can have deleterious effects in the short and medium terms of pregnancy and *post-partum* period on neuronal cell sensitivity to aggregated proteins. This hypothesis could explain the occurrence of microcephaly in new-born babies several months after birth and mother's infection [34]. Further research in this area is needed to state this hypothesis.

Author Contributions: conceptualization, W.V., P.K.-T. ; methodology, J.T., E.F, W.V., P.K.-T.; validation, J.T., E.F, W.V., P.K.-T. ; formal analysis, J.T., E.F, C.E.K., P.D., W.V., P.K.-T. ; investigation, J.T., E.F, C.E.K., W.V., P.K.-T. ; resources, P.D., W.V., P.K.-T.; data curation, J.T., E.F, P.D., W.V., P.K.-T.; writing—original draft preparation, J.T., E.F, P.D., W.V., P.K.-T.; writing—review and editing, J.T., E.F, P.D., W.V., P.K.-T.; visualization, W.V., P.K.-T.; supervision, W.V., P.K.-T.; project administration, P.D., W.V., P.K.-T.; funding acquisition, P.D.

Funding: This work was supported by the ZIKAlert project (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0001902). E.F. holds a fellowship from the Regional Council of Reunion Island (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0012406). J.T. has a PhD degree scholarship from La Réunion Island University (Ecole Doctorale STS), funded by the French ministry MEESR.

Acknowledgments: We thank the members of PIMIT and DÉTROIT laboratories for helpful discussions. We are grateful to Dr. Steeve Bourane for the critical review of the manuscript and English spelling. Dr. Kazutoshi Mori, from Kyoto University, for providing us pGRP78-Luc and pGRP94-Luc plasmids.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sun, Z.; Brodsky, J.L. Protein quality control in the secretory pathway. *J. Cell Biol.* **2019**, jcb.201906047.
2. Hendershot, L.M. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* **2004**, *71*, 289–297.
3. Smith, J.A. A new paradigm: innate immune sensing of viruses via the unfolded protein response. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*.
4. Blázquez, A.-B.; Escribano-Romero, E.; Merino-Ramos, T.; Saiz, J.-C.; Martín-Acebes, M.A. Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*.
5. Sano, R.; Reed, J.C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 3460–3470.
6. Gardner, B.M.; Pincus, D.; Gotthardt, K.; Gallagher, C.M.; Walter, P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a013169.
7. Wen, Z.; Song, H.; Ming, G. How does Zika virus cause microcephaly? *Genes Dev.* **2017**, *31*, 849–861.
8. Miranda, J.; Martín-Tapia, D.; Valdespino-Vázquez, Y.; Alarcón, L.; Espejel-Núñez, A.; Guzmán-Huerta, M.; Muñoz-Medina, J.E.; Shibayama, M.; Chávez-Munguía, B.; Estrada-Gutiérrez, G.; et al. Syncytiotrophoblast of Placentae from Women with Zika Virus Infection Has Altered Tight Junction Protein Expression and Increased Paracellular Permeability. *Cells* **2019**, *8*, 1174.
9. Cortese, M.; Goellner, S.; Acosta, E.G.; Neufeldt, C.J.; Oleksiuk, O.; Lampe, M.; Haselmann, U.; Funaya, C.; Schieber, N.; Ronchi, P.; et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 2113–2123.
10. Miorin, L.; Romero-Brey, I.; Maiuri, P.; Hoppe, S.; Krijnse-Locker, J.; Bartenschlager, R.; Marcello, A. Three-dimensional architecture of tick-borne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA. *J. Virol.* **2013**, *87*, 6469–6481.
11. Romero-Brey, I.; Bartenschlager, R. Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses. *Viruses* **2014**, *6*, 2826–2857.
12. Gladwyn-Ng, I.; Cordon-Barris, L.; Alfano, C.; Creppe, C.; Couderc, T.; Morelli, G.; Thelen, N.; America, M.; Bessières, B.; Encha-Razavi, F.; et al. Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 63–71.
13. Alfano, C.; Gladwyn-Ng, I.; Couderc, T.; Lecuit, M.; Nguyen, L. The Unfolded Protein Response: A Key Player in Zika Virus-Associated Congenital Microcephaly. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 94.
14. Hou, S.; Kumar, A.; Xu, Z.; Airo, A.M.; Stryapunina, I.; Wong, C.P.; Branton, W.; Tchesnokov, E.; Götte, M.; Power, C.; et al. Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. *J. Virol.* **2017**, *91*.
15. Amorim, R.; Temzi, A.; Griffin, B.D.; Moulard, A.J. Zika virus inhibits eIF2 α -dependent stress granule assembly. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005775.
16. Bonenfant, G.; Williams, N.; Netzband, R.; Schwarz, M.C.; Evans, M.J.; Pager, C.T. Zika

- Virus Subverts Stress Granules To Promote and Restrict Viral Gene Expression. *J. Virol.* **2019**, 93, e00520-19.
17. Monel, B.; Compton, A.A.; Bruel, T.; Amraoui, S.; Burlaud-Gaillard, J.; Roy, N.; Guivel-Benhassine, F.; Porrot, F.; Génin, P.; Meertens, L.; et al. Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *EMBO J.* **2017**, 36, 1653–1668.
 18. Frumence, E.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; El-Kalamouni, C.; Nativel, B.; Rondeau, P.; Missé, D.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Desprès, P. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology* **2016**, 493, 217–226.
 19. El Kalamouni, C.; Frumence, E.; Bos, S.; Turpin, J.; Nativel, B.; Harrabi, W.; Wilkinson, D.A.; Meilhac, O.; Gadea, G.; Desprès, P.; et al. Subversion of the Heme Oxygenase-1 Antiviral Activity by Zika Virus. *Viruses* **2018**, 11.
 20. Viranaicken, W.; Nativel, B.; Krejbich-Trotot, P.; Harrabi, W.; Bos, S.; El Kalamouni, C.; Roche, M.; Gadea, G.; Desprès, P. ClearColi BL21(DE3)-based expression of Zika virus antigens illustrates a rapid method of antibody production against emerging pathogens. *Biochimie* **2017**, 142, 179–182.
 21. Nozaki, J.; Ichi, Kubota, H.; Yoshida, H.; Naitoh, M.; Goji, J.; Yoshinaga, T.; Mori, K.; Koizumi, A.; Nagata, K. The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic β cells. *Genes Cells* **2004**, 9, 261–270.
 22. Mattioli, L.; Anelli, T.; Fagioli, C.; Tacchetti, C.; Sitia, R.; Valetti, C. ER storage diseases: a role for ERGIC-53 in controlling the formation and shape of Russell bodies. *J. Cell Sci.* **2006**, 119, 2532–2541.
 23. Saito, A.; Imaizumi, K. Unfolded Protein Response-Dependent Communication and Contact among Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Plasma Membrane. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 3215.
 24. Crill, W.D.; Chang, G.-J.J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J. Virol.* **2004**, 78, 13975–13986.
 25. Oka, O.B.V.; Bulleid, N.J. Forming disulfides in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2013**, 1833, 2425–2429.
 26. Lee, Y.-R.; Kuo, S.-H.; Lin, C.-Y.; Fu, P.-J.; Lin, Y.-S.; Yeh, T.-M.; Liu, H.-S. Dengue virus-induced ER stress is required for autophagy activation, viral replication, and pathogenesis both in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 1–14.
 27. Urra, H.; Dufey, E.; Lisbona, F.; Rojas-Rivera, D.; Hetz, C. When ER stress reaches a dead end. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2013**, 1833, 3507–3517.
 28. Turpin, J.; Frumence, E.; Desprès, P.; Viranaicken, W.; Krejbich-Trotot, P. The ZIKA Virus Delays Cell Death through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. **2019**.
 29. Limonta, D.; Jovel, J.; Kumar, A.; Airo, A.M.; Hou, S.; Saito, L.; Branton, W.; Ka-Shu Wong, G.; Mason, A.; Power, C.; et al. Human Fetal Astrocytes Infected with Zika Virus Exhibit Delayed Apoptosis and Resistance to Interferon: Implications for Persistence. *Viruses* **2018**, 10.
 30. Osowski, C.M.; Urano, F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using

- mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* **2011**, 490, 71–92.
31. Okamoto, T.; Suzuki, T.; Kusakabe, S.; Tokunaga, M.; Hirano, J.; Miyata, Y.; Matsuura, Y. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses* **2017**, 9.
 32. Yoshida, H. ER stress and diseases. *FEBS J.* **2007**, 274, 630–658.
 33. Muneer, A.; Shamsher Khan, R.M. Endoplasmic Reticulum Stress: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Chonnam Med. J.* **2019**, 55, 8–19.
 34. van der Linden, V.; Pessoa, A.; Dobyns, W.; Barkovich, A.J.; Júnior, H. van der L.; Filho, E.L.R.; Ribeiro, E.M.; Leal, M. de C.; Coimbra, P.P. de A.; Aragão, M. de F.V.V.; et al. Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, 65, 1343–1348.