



**HAL**  
open science

# Biologie des flavivirus émergents Zika et Dengue : importance de la protéine structurale M

Jason Decotter

► **To cite this version:**

Jason Decotter. Biologie des flavivirus émergents Zika et Dengue : importance de la protéine structurale M. Biologie cellulaire. Université de la Réunion, 2023. Français. NNT : 2023LARE0024 . tel-04419519

**HAL Id: tel-04419519**

**<https://theses.hal.science/tel-04419519v1>**

Submitted on 26 Jan 2024

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

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

# Biologie des flavivirus émergents Zika et Dengue : Importance de la protéine structurale M

**Thèse de doctorat pour obtenir le grade de docteur  
de l'Université de La Réunion**

École doctorale n° 542, Sciences, Technologies et Santé (EDSTS)

**Spécialité de doctorat** : Virologie, Biologie moléculaire, Santé

**Unité de recherche** : UMR PIMIT (Processus infectieux en milieu insulaire tropical)

**Thèse présentée et soutenue à Saint-Denis, le 06 Décembre 2023, par**

**JASON DECOTTER**

## Composition du Jury

Pr. Nathalie Chazal	IRIM, Université de Montpellier	Rapporteure
Pr. Didier Hober	CHU, Université de Lille	Rapporteur
Dr. Marie-Pierre Courageot	BioSpecT, Université de Reims	Examinatrice
Dr. Vincent Lotteau	Laboratoire P4 Inserm-Jean Mérieux	Examineur
Pr. Marie-Paule Gonthier	DéTROU, Université de La Réunion	Présidente du jury

## Direction de la thèse

Dr. Gilles Gadea	IRCM, Montpellier	Directeur de thèse
Pr. Philippe Desprès	UMR PIMIT, Université de La Réunion	Co-directeur de thèse



## Avant-propos :

Cette thèse a été réalisée au sein de l'École Doctorale Sciences Technologies Santé de l'Université de La Réunion (ED542) et a été financée par un contrat doctoral du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI). Les travaux de cette thèse ont été menés au sein de l'Unité Mixte de Recherche Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (UMR PIMIT ; Université de La Réunion, Inserm 1187, CNRS 9192, IRD 249) dirigée par le Dr. Patrick MAVINGUI. Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne par le programme de Fonds Européens de Développement Régional (FEDER).





## Remerciements

**J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury** qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci au Pr. Nathalie Chazal et au Pr. Didier Hober pour avoir accepté d'être rapporteur et au Pr. Marie-Paule Gonthier, au Dr. Vincent Lotteau et au Dr. Marie-Pierre Courageot pour avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

**Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse** pour leur enthousiasme, leurs précieux conseils et encouragements qui ont été une réelle source de motivation durant ces 4 années de thèse. Merci au Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi, au Dr. Estelle Nobécourt-Dupuy, au Dr. Erika Navarro Sanchez et au Dr. Alain Kohl.

**Je remercie le Dr. Patrick Mavingui**, directeur de l'Unité Mixte de Recherche Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), de m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche pour la réalisation de mon doctorat. Je vous remercie pour votre compréhension et votre soutien constant, ainsi que pour votre engagement à toujours mettre l'intérêt des étudiants au premier plan.

**Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr. Gilles Gadea.** Tu as toujours été pour moi un exemple de rigueur scientifique, avec une organisation, une gestion de ta vie personnelle et professionnelle, et une abnégation sans égal. Merci pour ta confiance et ta bienveillance, en me laissant une pleine liberté et autonomie tout au long de ma thèse. Merci pour tes qualités pédagogiques, humaines, et scientifiques. Je me rappellerai toujours nos moments de franches rigolades (notamment l'histoire du martinet), les nombreuses fois où tu me remontais le moral face à une erreur de manipulation ou un résultat non exploitable, ainsi que les discussions scientifiques où tu ne limitais jamais mes réflexions. Ton départ à Montpellier a été un évènement compliqué pour moi, créant beaucoup de distance entre nous. La fin de thèse n'a également pas été chose facile, en étant accompagné de nombreuses difficultés personnelles et professionnelles. Malgré tout cela, tu as toujours su être disponible, patient et à l'écoute. Je ne pourrais jamais assez te remercier de m'avoir encadré et soutenu durant tout ce temps. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci d'avoir été mon directeur de thèse.

**Je tiens également à remercier chaleureusement mon co-directeur de thèse, le Dr. Philippe Desprès.** Merci d'avoir assuré la relève au milieu de mon parcours en acceptant de participer à mon encadrement et de devenir mon co-directeur de thèse. Merci pour les nombreuses discussions enrichissantes, à parler de science, à nous questionner et trouver des hypothèses et solutions en avançant de concert pour la finalisation de mon projet de thèse. Merci pour ta disponibilité, ta patience et pour la passion que tu dégages à chaque fois que l'on te voit. Nul ne peut rêver d'un meilleur soutien et encadrement. Je me rappellerai toujours tes conseils et encouragements, comme lors de ma participation au congrès de l'ASV2022 où j'ai eu l'opportunité d'être autonome et de me représenter seul. Comme tu me l'as dit un jour, « une bonne thèse te détruit pour mieux te reconstruire et faire de toi un véritable chercheur ». J'espère pouvoir suivre tes enseignements et devenir ce véritable chercheur qui transmettra sa passion pour la virologie avec autant de patience et d'humanité que toi. Merci d'avoir été mon co-directeur de thèse.

**Merci aux responsables de l'École Doctorale STS de l'Université de La Réunion.** En particulier, un grand merci au Dr. Alain Bastide pour son accompagnement et son soutien à tous les doctorants, sans aucune distinction, et pour m'avoir remonté le moral durant une période difficile de ma thèse. Un énorme merci à Maria Mossadaq, l'une des femmes les plus belles, humaines et gentilles que je connaisse. Tu es toujours dévouée à ton travail, prenant toujours le temps d'être à l'écoute et disponible pour tous tes petits doctorants. Aujourd'hui, je peux dire que tu es devenue une amie formidable qui m'a toujours soutenu. Tu es la meilleure !

**Merci aux responsables de la Médiation Scientifique de l'Université de La Réunion.** En particulier, merci à Christelle Letellier et Silvère Pasquier pour leur grande humanité et leur accompagnement indéfectible des doctorants lors des nombreux événements scientifiques qui ont lieu chaque année. Merci de toujours être à l'écoute et de la confiance que vous nous accordez en tout instant.

**Merci aux référents administratifs de l'UMR PIMIT.** Merci à Marina Rigolet et Anne-Julie Bruno pour leur accompagnement durant toute ma thèse. En particulier, pour l'organisation de ma participation au congrès ASV2022 et mon voyage aux États-Unis qui ne s'est pas totalement déroulé comme prévu... mais qui s'est bien terminé.

**Je tiens à remercier chaleureusement tous les collègues de l'UMR PIMIT et en particulier un grand merci aux collègues de l'équipe MOCA** qui m'ont accueilli parmi eux et qui ont toujours montré de l'intérêt pour mes travaux. Merci à Phillipe Desprès notre chef d'équipe pour sa grande expertise, à Gilles Gadea mon directeur de thèse pour sa bienveillance, à Chaker El Kalamouni pour sa grande gentillesse, à Jean-Jacques Hoarau un exemple de positivité à toute épreuve, à Pascale Krejbich-Trotot pour ses questions toujours très pertinentes, à Marjolaine Roche notre miss NS1, à Wildriss Viranaicken le boss de la protéomique, à Dani Osman le fan des énigmes, et à Jessica Andries le couteau suisse de notre équipe.

**Je tiens également à remercier l'ensemble des collègues de l'équipe DYSIIS.** Merci à Camille Lebarbenchon le chef d'équipe pour sa polyvalence, à Patrick Mavingui notre directeur d'unité de recherche pour sa détermination, à Muriel Dietrich pour sa dévotion totale au sein du laboratoire, à Pablo Tortosa pour sa bonne humeur et ses sifflements dans les couloirs, à Célestine Atyame Nten pour ses écart-types à tendance significative, à Hervé Pascalis pour sa franchise et son expertise en virologie, à Marie Köster notre experte de la PCR, à Cyrille Lebon le couteau suisse de l'équipe DYSIIS, à Magalie Turpin pour son franc-parler qui cache une grande gentillesse, à Fiona Baudino pour sa positivité et son magnifique sourire, à Lise Monti pour sa gentillesse naturelle, à Clément De-Graaf pour nos discussions durant les repas du midi, à Marie Alice Simbi pour sa force de travail inégalée et à Jérémy Dubrulle le cowboy qui nage et nage en nous ramenant des bocaux de piment mangue/ananas.

**Merci aux post-doctorants de l'UMR PIMIT.** Merci à Etienne Frumence pour son humour, son esprit scientifique et son amour de l'aquariophilie, à Juliano Haddad un vrai magicien du criblage phytochimique à qui j'ai fait découvrir son daltonisme par hasard, à Bénédicte Vanwalscappel pour sa détermination à toute épreuve et son nom de famille trop compliqué, à Riana V. Ombalahibemaso Ramanantsalama (j'ai parlé de nom de famille compliqué...) merci pour nos soirées à boire, danser et chanter ainsi que nos matchs de bras de fer, à Jeanne-Arline Rajaonarivelo pour ta bienveillance et ta gentillesse, à Charifat Said-Hassane pour nos discussions philosophique durant la pause du midi, à Charline Herrscher pour son dynamisme, sa rigueur et sa résilience, à Matthieu Pot pour son humour sans égal, à Julien Mélade qui à travailler comme moi sur l'élaboration de clones viraux et de réplicon dengue, un boulot bien difficile et à Toscane Fourié pour sa gentillesse, son ouverture d'esprit et son grand cœur.

**Merci aux doctorants de l'UMR PIMIT.** Merci à Sandra Bos d'avoir participé à mon encadrement durant l'ensemble du master et pour nos soirées à discuter de science en écrivant sur les vitres de ton appartement, à Jonathan Turpin avec qui le travail est toujours plus plaisant, à Axel Hoarau mon ami cuisinier, dessinateur et scientifique hors-pair, à Eva Ogire qui a toujours été d'une grande gentillesse envers moi, à Sarah Hafsia qui possède une ténacité et une résilience sans égal, à Alawiya Reslan une collègue de promotion qui a su atteindre ses objectifs, à Jade Delveaux avec qui j'adorais discuter aussi bien science que vie perso, à Fenia Diane Ramiharimanana ma compère lors de la conférence de l'ASV2022 et de notre visite à Chicago, un moment inoubliable, à Layla El Kamali une chanteuse hors du commun qui semble pouvoir tout prédire en tout instant, à Samantha Aguilon la main de fer dans un gant de velours, à Tatiana Barbar la seule fan de muscu à avoir eu mes chaussettes sur son bureau, à Grégoire Lebeau l'homme qui publie plus vite que son ombre, à Dana Machmouchi qui aurait dû être ma stagiaire mais qui est devenue bien plus que ça avec le temps, à Daed El Safadi pour son rire, sa bonne humeur constante et ses chansons dans les couloirs du laboratoire, à Rachel Leong pour sa grande générosité et le fameux « C'est quoi un Wildriss ? » qui me fait encore rire aujourd'hui, à Patrick Carrière Richez le barbu de la bande avec qui les fins de soirées sont un peu trop folles, et à Victoria Carcauzon la rugbywoman aux yeux revolver.

**Merci à mes stagiaires et aux jeunes étudiants qui m'ont marqué.** Merci à Lucille Hoareau, officiellement ma première stagiaire qui fut aussi appelée la stagiaire aux 100 ECTS. Tu voulais continuer en médecine, je pense que cela est chose faite désormais. Je te souhaite alors le meilleur pour la suite et que tu t'épanouisses pleinement dans cette nouvelle voie. Merci à Elaa Chkaydem, une étudiante studieuse qui a toujours été à l'écoute, qui possédait une qualité de prise de note sans égal et qui affectionnait tout particulièrement les P1000. J'espère que tu sauras t'épanouir au cours de ta thèse et trouver la passion qui sommeille en toi. Merci à Caroline Jung qui m'a organisé tout mon trip à Paris lors d'une escale de seulement 10h où j'ai réussi à me balader le long des quais de Seine et à prendre des photos devant pas loin d'une quinzaine de monuments. Merci pour tous les moments de fou rire que nous avons eu à la paillasse comme au bureau. Merci à Julia Bourciquot Gonzalez, pour ta bonne humeur, ton dynamisme, tes goûts musicaux vraiment uniques et nos discussions intenses autour de l'écologie qui te tiens tellement à cœur.

**Merci aux collègues de l'UMR DéTROI**, nos anciens frères et anciennes sœurs de paillasses qui étaient toujours là pour échanger science mais également pour bien rigoler. Merci en particulier à Olivier Meilhac, Emmanuel Bourdon, Steeve Bourane, Nicolas Diotel, Marie-Paule Gonthier, Christian Lefebvre d'Hellencourt, Christine Robert-Da Silva, Philippe Rondeau, Pierre Giraud, Cynthia Planesse, Bryan Veeren, Angélique Arcambal, Jessica Patche, Brice Nativel et Laura Gence. Merci aux doctorants et doctorantes, en particulier à Ali, Kévin, Marie, Sarah, Batoul, Stéphane, Éloïse, Chloé, Aurélie, Danielle, Floran, Julien, Teva, Katy et Laurine.

**Merci aux collègues travaillant sur la plateforme CYROI**. En particulier, merci à Imade, Sébastien, Colette, Hella, Christian, Maya, Jérôme, Éric, Johnny, Johan, et Marcella.

**Merci aux doctorants et doctorantes de l'Université de La Réunion**, que j'ai rencontrés au cours de mes formations, évènements scientifiques ou au cours de ma vie étudiante. Merci à Tristan, Nalitiana, Océane, Meïla, Nathan, Julie, Merlène, Marion, Tanika, Maëva, Camille, Florian, Margot, James, Mélodie et Aroul.

**Merci aux participants de la MT180**, qui ont partagé ce moment fabuleux de vulgarisation scientifique avec moi. Merci à Olivia, Océane, Julie, Samantha, Hanna, Meïla, Tristan, Florian, Dana, Mélissa, Anne-Laure, Nalitiana et à notre formateur Benoît Dubin.

**Merci à Roger et les chatons**, mes amis pour la vie. Je vous remercie Jonathan, Axel et Marie pour tous ces bons moments passés ensemble à rire, débattre, danser, chanter, manger et boire. Sans vous, ma thèse n'aurait jamais été la même. Tellement de souvenirs et de nostalgie, nos soirées chez Axel où nous faisons toujours trop de bruit, nos soirées chez moi les uns sur les autres dans mon appartement de 20m<sup>2</sup>, les soirées chez Jonathan... hein non je me trompe là..., nos moments au petit Buddha accompagné de nos fameux shoots goût dentifrice et cette inoubliable soirée où la main du démon fut créée... Il y aurait tellement de chose à dire, mais au final le plus important comme vous le savez : « Je vous aime et je n'ai pas besoin d'être bourré pour vous le dire ». Merci beaucoup les amis, vous comptez énormément pour moi !

**Merci à Marie**, notre experte du vin et de Céline Dion. Du jour où tu es arrivée parmi nous en me piquant la place qui m'était réservée au bureau des sardines, jusqu'au jour de ton départ, tu as toujours été radieuse, souriante et joviale. Un vrai soleil qui illumine tous ceux et celles qui prennent le temps de savourer sa lumière... mais petit conseil, faite tout de même attention, les rayons du soleil peuvent parfois cacher un beau petit kraken prêt à vous sauter dessus. Je me rappellerai toujours nos danses où tu virevoltais comme une sirène au point de laisser une trace de pas sur le plafond de Riana, ce fameux grain de riz qui fut le premier lien biologique entre toi et moi, nos batailles de gosses à coup de bouteille d'eau le vendredi soir, nos débats interminables à la cafétéria renommée pour l'occasion « Resto U », et ce camping au Maïdo avec un feu qui nous pris 3h à allumer sans s'intoxiquer. Tu as toujours été là pour me soutenir, pour discuter science, pour discuter tout court d'ailleurs. Tu es comme une sœur pour moi, je te souhaite le meilleur pour la suite et te remercie pour tout le bonheur que tu as su apporter autour de toi. La prochaine fois qu'on se reverra, ça sera moi qui t'offrirai un Espresso Martini, promis !

**Merci à Jonathan**, mon frère d'une autre mère et d'un autre père. Un homme, un mari et un père exceptionnel, qui possède une réelle volonté de faire le bien autour de lui. Comment oublier tes entrées fracassantes au bureau des sardines, avec ton fameux : « ¡Hola de la casa buena! ». Tu réveillais tout le monde d'un seul coup et tu arrivais à transmettre ta bonne humeur en un instant. Nos sessions de bras de fer, où tu n'avais aucune chance de gagner mais l'ego était là, tes cris de Wookies qui ferait pâlir Chewbacca, ta manière de commander une pinte de Léffé sans sourciller une seule seconde et les fameux Kinder Bueno que je devais donner à Olivia suite au chantage de son père, qui finalement aura tout manger lui-même... Je te respecte énormément, tu es un modèle pour moi sur de nombreux points et j'espère un jour pouvoir égaler la passion que tu dégages lorsque tu parles de science. Ta volonté de défendre les valeurs de la vraie science, autour de toi et surtout sur le fameux réseau social Twitter qui fut renommé X d'ailleurs... Tu n'y serais pas pour quelque chose dit moi... ? Aujourd'hui on se voit malheureusement un peu moins, malgré le fait que l'île ne soit pas si grande, Saint-Joseph est à au moins 3h voir 4h de décalage horaire. C'est fou quand même, presque un autre monde là-bas ! Mi sa pas koz en lu, mé mi tien merci a ou du plu profon de mon kèr. Ne me juge pas, le bounty essaie de faire de son mieux... On se voit bientôt frétot et encore merci. Bisous à Leslie et Olivia.

**Merci à Axel**, un ami et un chercheur hors du commun. Tu as certainement été un de mes amis les plus proches au cours de cette thèse. Celui à qui je pouvais me confier et qui pouvait aussi se confier à moi lorsque cela n'allait pas. La première fois qu'on s'est rencontré toi et moi, le feeling ne passait vraiment pas. J'étais en Master, je voulais me faire remarquer et pour moi la compétition était primordiale pour réussir à intégrer une thèse au sein de notre laboratoire. C'est une fois que je suis devenu doctorant que notre relation a vraiment débuté et que j'ai appris à te découvrir. Tu es un chercheur plein de savoir, de connaissance et de passion pour son domaine, mais pas uniquement. Ta culture générale, ton amour de la botanique, de l'ornithologie, ainsi que tes talents artistiques et culinaires font de toi quelqu'un d'unique. Je me rappellerai toujours nos affrontements aux sudokus ou aux dingbats durant nos moments de pauses, nos concours de dessins où je n'avais aucune chance de gagner. Le nombre de fois où tu as essayé de m'apprendre à faire le hibou en soufflant dans les mains et où le seul son que j'arrivais à faire dans les bons jours était : « Pfiouit pfiouit... » à peine le son d'un oiseau enrhumé. Ton pouce tordu qui trouvait toujours une utilité, pour un meilleur pipetage ou pour mieux jouer de la guitare. Tes imitations de la goutte d'eau, de l'oiseau ou encore du moustique plus réaliste que nature. Merci de m'avoir toujours poussé vers l'avant et de m'avoir toujours encouragé.

**Merci aux Quattro Frommagis**. Merci à Axel, Layla et Dana pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble. Pour nos nombreuses sorties, soirées et bons repas, en particulier à l'aquarium de Saint-Gilles qui fut un moment magnifique et paisible, au volcan où la seule chose visible était le brouillard et les frissons sur notre peau, à la crêperie où on ne pouvait plus s'arrêter de rire à force de blaguer ou encore pour la sortie baleine qui était extraordinaire. Pour tous ces ramadans où je ne faisais que vous accompagner pendant une seule journée. Cette soirée chez Axel où j'ai mangé tous les mochis qui n'étaient vraiment pas bons, mais il ne fallait pas gaspiller. Et votre fameux ouridou saltattet wa tamateteme ! Merci les amis.

**Merci à Dana**, la future virologue qui va tout déchirer. On s'est rencontré alors que tu intégrais notre équipe de recherche pour ton stage de Master. Je me rappelle que le feeling était immédiat, j'avais envie de t'aider à progresser et tu avais soif de connaissance. Ton envi de bien faire les choses, de comprendre et de discuter science a toujours été un point fort chez toi qui me donnait confiance en tes capacités. Tu es

petite et fine, mais derrière cette apparence se cache un caractère étonnant, une fan de basket qui connaît même les pointures de ses joueurs favoris, une apprentie mannequin et styliste à en devenir, et à présent une rugbywoman de talent. Ta peur des chiens a été la première chose qui m'avait surpris chez toi. Moi qui adore les animaux je ne pouvais pas accepter cela si facilement. Je me rappelle notre sortie à la fourrière où l'on pouvait promener des chiens bénévolement. Princesse était l'heureuse élue, une petite chienne toute douce et gentille qui réussit à conquérir ton cœur. Ou encore la fois où je t'ai fait croire que j'allais t'offrir un vrai chien mais qui n'était au final qu'une belle petite peluche. On a passé tellement de bons moments ensemble, à simplement boire un café ou manger une glace, à se promener, faire du kayak ou du bateau... Je te souhaite le meilleur pour la suite et j'espère pouvoir encore être là pour te soutenir et t'aider.

**Merci à Tatiana**, la petite sœur sportive et un peu chiante de la famille. Je plaiiiiisaaante. Certainement l'une des doctorantes au sein de notre laboratoire à avoir participé au plus d'évènements de vulgarisation scientifique. Tout cela bien évidemment afin de promouvoir la science, la recherche, la culture... et peut-être un peu, juste un peu, pour les caméras. Fête de la science, Salon de la Santé, Nuit européenne des chercheurs, Pint of Science... et pour finir notre Miss MT180. Je suis franchement fier de toi et je suis heureux d'avoir assisté à toute ton évolution au cours de ces dernières années. Bosser, Rando, Plage, était ta devise, aujourd'hui c'est surtout Bosser, Bosser et un peu de Rando quand même. Merci de toujours avoir le sourire, merci de te moquer de moi quand je fais des blagues vraiment nul, merci d'accepter ma maladresse perpétuelle...mais bon je suis Jason. Je n'oublierai jamais cette nuit d'enquête policière où je suis devenu le sauveur de ces dames en arrêtant un bandit à main nu. D'ailleurs, les têtes noires ça te traumatise toujours ?

**Merci à Layla**, ma meilleure amie. Une chercheuse, chanteuse et cavalière comme on n'en voit pas tous les jours, spéciale, unique et imprévisible. Pleine de douceur, de générosité et de bienveillance tout en ayant une force, un caractère et une ambition débordante. Tu es une des personnes les plus communicatives, que j'ai eu la chance de rencontrer. Lorsque tu es heureuse ou triste tout le monde l'est autour de toi, entraînant une empathie collective comme par magie et démontrant le lien fort que tu arrives à nouer avec les gens qui t'entourent. Les défis et les jeux c'est notre

truc, manger le plus vite les barquettes de champignon forestière ou finir le plus rapidement possible les sudokus...Le problème c'est que je perds toujours contre toi sauf peut-être au Uno où j'arrive encore à gagner. Je me rappellerai pendant longtemps, l'histoire de cette fameuse liste de noms mis en place pour la soirée jeu du Cyroi, où tu m'as avoué après 2 ans, avoir totalement triché pour notre petit défi. Quelle injustice ! Mais bon, je t'aurais quand même offert cette petite peluche narval rose et cette Porsche miniature malgré tout. Tu es l'amie avec laquelle j'arrive à regarder la série Lupin, qui arrive à binge-watcher toute seule 10 épisodes dans la nuit et qui me dit le lendemain « Jazz, il va falloir que tu rattrapes tout ». Ce qui me fait le plus rire c'est que cette série te convient parfaitement, car le personnage principal aurait pu être toi. Tu es toujours capable de savoir ce que je vais faire, où et quand, et tu es même capable de prédire les cadeaux d'anniversaire que je vais offrir à lui ou elle en avance, j'en ai presque des frissons des fois. Tu es une amie vraiment très spéciale à mes yeux. Merci pour ton soutien et ta bienveillance au quotidien.

**Merci à Christopher**, mon meilleur ami. Certainement l'homme qui serait mon compagnon dans la vie si seulement je n'aimais pas autant les femmes. Ma petite cuillère, mon partenaire de jeux de société, l'ami avec qui je peux débattre pendant des heures sur tous les sujets, celui-ci qui connaît certainement tous mes secrets mais qui ne raconte rien contrairement à moi... car oui apparemment je parle un tout petit peu trop. Tu m'as toujours poussé vers l'avant, toujours su me dire lorsque je faisais le con et toujours su être à l'écoute dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu es un ami comme nul autre, qui n'a pas hésité une seule seconde à me présenter à toute sa famille. En particulier, je passe le bonjour à ta mère et ta sœur, des femmes formidables que j'aime énormément. Je me rappellerai toujours nos soirées Magic où on ne voyait pas le temps passer, nos tournois de jeux de société avec la mise en place du petit carnet officiel pour suivre nos statistiques en BO3, nos soirées jeux vidéo où tu gagnais toujours à Tekken et moi à Rocket League, notre fameuse soirée chez toi où je suis tombé dans les pommes (pour des raisons qu'on gardera secret) ou encore la première fois où j'avais bu de l'alcool qui s'est terminé avec l'intervention des ambulanciers (mais pas pour moi hein, je tiens à préciser). Tu es un frère pour moi, je t'aime énormément. Merci pour tous ces moments passés ensemble et ceux qui nous restent encore à découvrir.

**Merci à mes amis**, qui sont toujours là lorsqu'il faut passer un bon moment. Au groupe de la « Raclette Party » : Samuel, Shurley, Danyal, Hermanda, Julie, Christopher, Emma et Tristan. Je vous remercie pour toutes ces soirées jeux, bouffe et discussions, qui pourraient ne jamais se terminer. En particulier, merci à Samuel de m'avoir aidé pour la réalisation de cette page de garde que je trouve magnifique. À la tribu du Guillaume : Charlotte, Vincent et Simon. Merci pour nos soirées jeux de rôle, de sociétés, de films, nos discussions qui me permettent de m'évader et de bien commencer le week-end. Au château fort et au dernier bastion : Héloïse, Clarisse, Valentine, Théo et Christopher. Pour tous ces bons moments de franches rigolades passées ensemble et nos soirées Time's Up où les mimes n'avaient qu'à bien se tenir.

**Merci à mes parents John et Elgie**, qui ont toujours été là pour moi. Vous m'avez toujours soutenu, dans les bons et les mauvais moments, vous avez fait de moi l'homme que je suis aujourd'hui. Je n'aurai jamais pu rêver de meilleurs parents que vous. Vous m'avez toujours poussé vers l'avant, vous m'avez toujours donné les moyens d'atteindre mes objectifs quitte à vous plier en quatre pour ça et je ne pourrais jamais vous remercier suffisamment avec ces quelques mots. Je serai toujours là pour vous comme vous l'avez été pour moi. Je vous aime, vous serez à jamais les premiers dans mon cœur.

**Merci à mon frère Darren**, que je vois grandir beaucoup trop vite. Avec mes études, la thèse et le fait d'être loin de toi ici à Saint-Denis, j'ai l'impression d'avoir raté énormément de moments que l'on aurait pu vivre ensemble. Je n'oublierai jamais nos journées à jouer à la console, aux jeux de sociétés, aux échecs... avec ma mauvaise fois quand je pense être le meilleur alors que tu me bats à plat de couture. Aujourd'hui, tu deviens un homme remarquable qui fera, j'en suis sûr, de belles et grandes choses. Je suis très fier de toi mon frère et je serai toujours là pour toi, pour te soutenir, t'aider et te pousser à toujours devenir quelqu'un de meilleur.

**Merci à toutes ma famille proche**. Du côté de ma mère, à mes grands-parents : Aristhène et Simone, à mes oncles et tantes : Jean-Paul et Raïssa, David et Fabienne, Véronique et Éric, Didier et Mylène qui nous a malheureusement quitté bien trop tôt. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'aider dès que cela était possible, de me soutenir, de m'encourager mais aussi de me sermonner lorsqu'il le fallait. Du côté de mon père, à mon grand-père Anselme que je n'ai pas suffisamment connu, à

mes oncles et tantes : Konrad et Maud, Manfred et Myrlène, Robert et Aurore, à mes cousins et cousines : Alexandre, Aurélie, Dieter et Ludwig. Merci de toujours prendre des nouvelles de moi et de mon évolution professionnelle et personnelle, et de toujours m'encourager dans les projets que j'entreprends.

**Merci à toute la famille Viranaicken** : Jean-Paul et Suzelle, Wildriss et Céline, Roxanne et Josie, et bien sûr Abraham. Pour la majorité d'entre vous, vous étiez là dès ma naissance et vous m'avez vu grandir et évoluer durant toutes ces années. Vous avez toujours été là pour me soutenir, me conseiller, et souvent juste pour se détendre et rigoler. En particulier merci à Wildriss pour l'exemple que tu es pour moi en tant que chercheur et pour tous les conseils que tu as su me donner au cours de ces dernières années. Et merci à Abraham, pour tous les bons moments qu'on arrive à passer ensemble depuis que je suis gamin. Franchement si je devais avoir un grand frère ça serait certainement toi, alors merci pour tout.

**Merci à mes petits cousins et petites cousines** : Dhananjay, Léo, Keyran, Kyara, Raphaëlle et Estaban. Pour leur sourire, leur bonne humeur et leur joie lorsqu'ils me voient. Ils arrivent à me faire oublier tous mes soucis en une seule seconde, et je deviens alors en un instant le meilleur des tontons qui serait prêt à tout donner pour eux. Ce genre de moment vous rappelle ce qui est le plus important dans la vie, aimer les êtres qui vous sont chers et tout faire pour les voir rire et être heureux.

**Et pour finir, merci à la femme que j'aime.** Je sais que notre histoire est récente, qu'elle est pleine de belles choses mais aussi de nombreuses difficultés. Je sais que cette histoire pourrait être éphémère comme durer jusqu'à la fin de notre vie. Tu es la femme la plus forte que je connaisse, celle qui n'a peur d'aucunes difficultés, celle qui arrive à m'impressionner et à m'étonner tous les jours, celle qui sait me faire rire même dans les moments les plus sombres, celle qui me manque à chaque seconde qui passe, celle qui m'a fait sortir de ma dépression et celle grâce à qui je suis capable de finir cette thèse aujourd'hui. Il était alors tout à fait naturel pour moi de terminer mes remerciements par ce paragraphe. Tu comptes énormément à mes yeux et je te remercie pour tout ce que tu partages avec moi. The perfect imperfection, voilà bien les trois mots qui nous définissent à la perfection !



## Résumé

Le virus Zika (ZIKV) et le virus de la Dengue (DENV) sont des arbovirus majeurs en termes de santé publique. Appartenant au genre flavivirus (famille *Flaviviridae*), ZIKV et DENV sont principalement transmis par les moustiques du genre *Aedes*. Au cours des 30 dernières années, l'émergence des flavivirus n'a fait que croître avec une augmentation de répartition géographique, en particulier dans les régions tropicales et subtropicales de la planète. ZIKV se distingue en deux lignées principales, asiatique et africaine, qui présentent une pathogenèse et des réponses moléculaires distinctes. La lignée asiatique contenant pratiquement toutes les souches ayant provoqué des émergences épidémiques. DENV est classé en plusieurs génotypes et en quatre sérotypes antigéniquement distincts : DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4. Les épidémies récentes de dengue ayant lieu dans les régions tropicales étant principalement associées au sérotype DENV-2 et à la distribution géographique croissante du génotype Cosmopolitan. Au cours de la dernière décennie, les territoires du sud-ouest de l'océan Indien (SOOI) ont connu des épidémies fulgurantes de dengue, avec plusieurs dizaines de milliers de cas d'infection signalés à l'île de La Réunion entre 2018 et 2023. La présence de moustiques vecteurs et de conditions environnementales favorables serait propice à l'endémicité de DENV et une potentielle introduction de ZIKV sur l'île de La Réunion. Devant ce constat, l'UMR PIMIT a lancé plusieurs programmes de recherche portant sur l'étude des protéines virales connues pour leur rôle dans le pouvoir pathogène des flavivirus DENV et ZIKV. Dans le cadre de ma thèse, mes travaux se sont focalisés sur l'étude des protéines structurales de membrane (prM/M) et d'enveloppe (E) de ces virus, qui sont connues pour être essentielles d'une part dans la structuration de la particule virale et son infectiosité, et d'autre part dans les interactions hôte-pathogène et l'activation de la réponse immunitaire. L'analyse moléculaire des souches asiatiques et africaines de ZIKV, nous a permis d'identifier la substitution de trois résidus aux positions E-152, E-156 et E-158 dans la boucle de glycosylation (GL) de la protéine E. Mes travaux ont démontré le rôle majeur des résidus E-152/156/158 dans la réactivité antigénique de la GL de ZIKV, leur substitution entraînant une perte du motif de glycosylation et des changements conformationnels perturbant la reconnaissance de la protéine E par des anticorps neutralisants. La protéine prM/M des flavivirus qui sert de chaperon pour le bon repliement de la protéine E, semble être le support de déterminants viraux associés à la pathogénicité des flavivirus. L'ectodomaine de la protéine M contient un peptide pro-apoptotique que nous avons nommé ZAMP chez ZIKV, et D<sub>2</sub>AMP chez DENV-2. Nous avons démontré pour la première fois à notre connaissance qu'une activité pro-apoptotique était associée aux peptides, ZAMP et D<sub>2</sub>AMP, tout en démontrant le rôle important des résidus M-33/35/38 dans cette activité pro-apoptotique. Par ailleurs, une grande partie de mes travaux s'est concentrée sur la caractérisation des protéines prM et E des souches virales DENV-2 du génotype Cosmopolitan retrouvées dans la région SOOI. Nous avons démontré que la nature du résidu en position M-36 de la protéine M impact le comportement biologique des protéines prM/M et E. Nos résultats révèlent que la substitution d'un résidu Ile en Val à la position M-36 affecte l'expression et la cytotoxicité de la glycoprotéine E exprimée comme un complexe prME et la capacité de l'oligopeptide D<sub>2</sub>AMP à activer la voie apoptotique. L'ensemble de mes travaux de thèse apportent de nouvelles connaissances sur les caractéristiques biologiques des protéines structurales prM et E, qui permettront de mieux comprendre le pouvoir pathogène des flavivirus ZIKV et DENV.

Mots-clés : Flavivirus, Zika, Dengue, Protéines structurales, protéine de membrane (prM/M), protéine d'enveloppe (E), déterminants viraux, peptides apoptotiques, ZAMP, D<sub>2</sub>AMP.



## Abstract

Zika virus (ZIKV) and Dengue virus (DENV) are major arboviruses in terms of public health. Belonging to the flavivirus genus (family Flaviviridae), ZIKV and DENV are mainly transmitted by *Aedes* mosquitoes. Over the last 30 years, the emergence of flaviviruses has constantly increased, with a growing geographical distribution, particularly in tropical and subtropical regions of the world. ZIKV can be divided into two main lineages, Asian and African, with distinct pathogenesis and molecular responses. The Asian lineage contains almost all the strains that have caused epidemic outbreaks. DENV is classified into several genotypes and four antigenically distinct serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. Dengue recent epidemics in tropical regions are mainly associated with the DENV-2 serotype and the increasing geographical distribution of the Cosmopolitan genotype. Over the past decade, the south-west Indian Ocean territories (SOOI) have experienced dramatic epidemics of dengue fever, with tens of thousands of infection cases reported in La Réunion between 2018 and 2023. The presence of mosquito vectors and suitable environmental conditions would be propitious to the endemicity of DENV and the potential introduction of ZIKV in La Réunion. In response, the UMR PIMIT lab has launched several research programs focusing on the study of viral proteins known to play a role in the pathogenicity of DENV and ZIKV flaviviruses. As part of my thesis, my work focused on the study of the structural membrane (prM/M) and envelope (E) proteins of these viruses, which are known to be essential in one hand for the structure of the viral particle and its infectivity, and in other hand for host-pathogen interactions and the activation of the immune response. Molecular analysis of Asian and African strains of ZIKV has allowed us to identify the substitution of three residues at positions E-152, E-156 and E-158 in the glycosylation loop (GL) of the E protein. My work demonstrated the major role of residues E-152/156/158 in the antigenic reactivity of the ZIKV GL, as their substitution leads to a loss of the glycosylation motif and conformational changes that disrupt the recognition of the E protein by neutralizing antibodies. The flavivirus prM/M protein, which acts as a chaperone for the correct folding of the E protein, appears to be the support of viral determinants associated with the pathogenicity of flaviviruses. The ectodomain of the M protein contains a pro-apoptotic peptide that we have named ZAMP in ZIKV and D2AMP in DENV-2. We demonstrated for the first time to our knowledge that pro-apoptotic activity was associated with the peptides ZAMP and D2AMP, while also demonstrating the important role of residues M-33/35/38 in this pro-apoptotic activity. Furthermore, a large part of my work focused on the characterization of the prM and E proteins of DENV-2 viral strains of the Cosmopolitan genotype found in the SOOI region. We demonstrated that the nature of the residue at position M-36 of the M protein has an impact on the biological behavior of the prM/M and E proteins. Our results reveal that the substitution of an Ile residue for Val at position M-36 affects the expression and cytotoxicity of the E glycoprotein expressed as a prME complex and the ability of the D2AMP oligopeptide to activate the apoptotic pathway. Taken together, my thesis work provides new insights into the biological characteristics of the structural proteins prM and E, which will help us to better understand the pathogenicity of ZIKV and DENV flaviviruses.

Keywords: Flaviviruses, Zika, Dengue, Structural proteins, Membrane protein (prM/M), Envelope protein (E), Apoptotic peptides, ZAMP, D<sub>2</sub>AMP, Viral determinants.



## Liste des publications

### Article 1

Frumence E. Haddad J.G., Vanwalscappel B., Andries J., **Decotter J.**, Viranaïcken W., Gadea G., Desprès P. Immune Reactivity of a 20-mer Peptide Representing the Zika E Glycan Loop Involves the Antigenic Determinants E-152/156/158. *Viruses*. 2020 Nov 5;12(11):1258. doi: 10.3390/v12111258. PMID: 33167511; PMCID: PMC7694461.

### Article 2

Vanwalscappel B., Haddad J.G., Almokdad R., **Decotter J.**, Gadea G., Desprès P. Zika M Oligopeptide ZAMP Confers Cell Death-Promoting Capability to a Soluble Tumor-Associated Antigen through Caspase-3/7 Activation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Dec 16;21(24):9578. doi: 10.3390/ijms21249578. PMID: 33339164; PMCID: PMC7765671.

### Article 3

**Decotter J.**, Desprès P., Gadea G. Dengue virus M and E proteins belonging to genotype II (Cosmopolitan) of serotype 2 are influenced by the nature of M residue 36. *Journal of General Virology*. 2023 Jul;104(7). doi: 10.1099/jgv.0.001872. PMID: 37436433.



# Table des matières

<b>Avant-propos :</b> .....	<b>3</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>5</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>17</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>19</b>
<b>Liste des publications</b> .....	<b>21</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>23</b>
<b>Listes des figures et des tableaux</b> .....	<b>27</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>29</b>
<b>Liste des annexes</b> .....	<b>31</b>
<b>Partie I : Introduction générale</b> .....	<b>33</b>
<b>I. Des arbovirus aux flavivirus</b> .....	<b>34</b>
I.1. Définition .....	34
I.2. Cycle de transmission.....	36
I.3. Classification.....	38
I.4. Les Flavivirus .....	40
<b>II. Biologie moléculaire des flavivirus</b> .....	<b>42</b>
II.1. Organisation du génome .....	42
II.1.1. Les protéines structurales .....	43
II.1.1.1. La protéine de capsid (C).....	43
II.1.1.2. La protéine de membrane (prM/M) .....	43
II.1.1.3. La protéine d'enveloppe (E).....	44
II.1.2. Les protéines non-structurales (NS).....	45
II.1.2.1. La protéine NS1 .....	45
II.1.2.2. Les protéines NS2A et NS2B .....	45
II.1.2.3. La protéine NS3 .....	46
II.1.2.4. Les protéines NS4A et NS4B.....	46
II.1.2.5. La protéine NS5 .....	47
II.1.3. Les régions non-codantes 5'UTR et 3'UTR.....	47
II.2. Structure de la particule virale .....	49
II.2.1. Particule virale mature.....	50
II.2.2. Particule virale immature .....	50
II.2.3. Particule virale partiellement mature .....	51
II.3. Cycle de réplication des flavivirus.....	52
II.3.1. Entrée virale .....	53
II.3.1.1. Attachement .....	53
II.3.1.2. Internalisation.....	54
II.3.1.3. Fusion .....	55
II.3.2. Traduction et réplication virale.....	55
II.3.2.1. Formation des complexes de réplication.....	56
II.3.2.2. Réplication virale.....	56
II.3.3. Assemblage et morphogenèse de la particule virale.....	57
II.3.3.1. Maturation de la particule virale .....	58
II.3.3.2. Libération de la particule virale .....	58
<b>III. Les flavivirus – Zika et Dengue</b> .....	<b>60</b>
III.1. Découvertes et historiques des grandes épidémies .....	60
III.1.1. Découverte, émergence et historique du virus Zika (ZIKV).....	60
III.1.2. Découverte, émergence et historique du virus de la Dengue (DENV) .....	62
III.1.3. DENV-2 du génotype Cosmopolitan dans l'océan Indien et à La Réunion .....	64

III.2. Phylogénie des flavivirus : ZIKV et DENV .....	67
III.2.1. Phylogénie de ZIKV.....	67
III.2.2. Phylogénie de DENV.....	68
III.3. Transmission des flavivirus : ZIKV et DENV.....	70
III.3.1. Transmission vectorielle .....	71
III.3.1.1. Transmission vectorielle horizontale .....	71
III.3.1.2. Transmission vectorielle verticale .....	72
III.3.1.3. La capacité vectorielle.....	72
III.3.2. Transmission non-vectorielle.....	73
III.3.2.1. Transmission par voie sexuelle.....	73
III.3.2.2. Transmission par voie materno-fœtal .....	74
III.3.3. Les autres voies de transmission .....	74
III.4. Symptomatologie, diagnostic, stratégies thérapeutiques et vaccinales.....	75
III.4.1. Syndrome neurologique et congénital associé à l'infection par le virus Zika .....	76
III.4.1.1. Le syndrome de Guillain-Barré (SGB) .....	76
III.4.1.2. Le syndrome congénital à virus Zika (SCZ).....	77
III.4.2. Syndrome hémorragique associé à l'infection par le virus de la Dengue.....	78
III.5. Diagnostic en laboratoire .....	80
III.5.1. Diagnostic moléculaire .....	80
III.5.2. Diagnostic sérologique.....	81
III.6. Stratégies thérapeutiques, vaccinales et lutte antivectorielle .....	83
III.6.1. Approches antivirales .....	83
III.6.2. Approches vaccinales.....	84
III.6.3. La lutte antivectorielle.....	87
III.7. Physiopathologie et immunopathologie des flavivirus .....	88
III.7.1. Physiopathologie associée à l'infection par ZIKV et DENV .....	88
III.7.2. La réponse immunitaire innée anti-ZIKV et anti-DENV .....	90
III.7.2.1. Toll-Like Receptors (TLRs) .....	92
III.7.2.2. RIG-I-Like Receptor RLRs .....	92
III.7.2.3. Activation et amplification de la réponse interféron de type I.....	93
III.7.2.4. Inhibition de l'immunité innée par les protéines virales.....	95
III.7.3. La réponse immunitaire adaptative .....	96
III.7.3.1. La réponse cellulaire .....	96
III.7.3.2. La réponse humorale .....	97
III.7.4. L'apoptose .....	99
III.7.4.1. La voie intrinsèque .....	100
III.7.4.2. La voie extrinsèque .....	101
III.7.4.3. L'apoptose viro-induite .....	101
<b>IV. Les protéines structurales de membrane (prM) et d'enveloppe (E) .....</b>	<b>102</b>
IV.1. La protéine de membrane (prM/M).....	102
IV.1.1. Synthèse de la protéine de membrane (prM/M).....	102
IV.1.2. Structure de la protéine de membrane (prM/M).....	102
IV.1.3. Rôle et fonction de la protéine de membrane (prM/M).....	103
IV.1.3.1. Rôle de protéine chaperonne .....	103
IV.1.3.2. Rôle dans la pathogénicité virale.....	105
IV.1.3.3. Rôle dans l'induction de l'immunité innée.....	106
IV.1.3.4. Rôle de la protéine M mature dans l'induction de l'apoptose .....	106
IV.2. La protéine d'enveloppe (E) .....	107
IV.2.1. Synthèse de la protéine d'enveloppe (E) .....	107
IV.2.2. Structure de la protéine d'enveloppe (E).....	107
IV.2.2. Rôle et fonction de la protéine d'enveloppe (E) .....	108
IV.2.2.1. L'ectodomaine I (EDI).....	108
IV.2.2.2. L'ectodomaine II (EDII).....	109
IV.2.2.3. L'ectodomaine III (EDIII).....	110
IV.2.2.4. Le domaine d'ancrage transmembranaire (TMD).....	111
IV.3. Interaction des protéines de membrane (prM/M) et d'enveloppe (E) .....	112
<b>Partie II : Rationnel &amp; Objectifs .....</b>	<b>117</b>
<b>Partie III : Travaux de recherche .....</b>	<b>121</b>

<b>I. Rôle des résidus E-152, E-156 et E-158 dans la réactivité antigénique de la boucle de glycosylation du virus Zika</b> .....	<b>122</b>
I.1. Contexte de l'étude .....	122
I.2. Résumé de l'étude .....	123
I.3. Article 1: Immune Reactivity of 20-mer Peptide Representing the Zika E Glycan Loop Involves the Antigenic Determinants E-152/156/158 .....	124
I.4. Discussion de l'article 1 .....	140
<b>II. Rôle des résidus M-31/41 dans l'activité pro-apoptotique du virus Zika</b> .....	<b>143</b>
II.1. Contexte de l'étude .....	143
II.2. Résumé de l'étude .....	144
II.3. Article 2: Zika M Oligopeptide ZAMP Confers Cell Death-Promoting Capability to a Soluble Tumor-Associated Antigen through Caspase-3/7 Activation .....	145
II.4. Discussion de l'article 2 .....	160
<b>III. Impact de la mutation M-136V sur le comportement biologique des protéines prM/M et E de DENV-2 Cosmopolitan</b> .....	<b>163</b>
III.1. Contexte de l'étude .....	163
III.2. Résumé de l'étude .....	164
III.3. Article 3: Dengue virus M and E proteins belonging to genotype II (Cosmopolitan) of serotype 2 are influenced by the nature of M residue 36 .....	165
III.4. Discussion de l'article 3 .....	176
<b>Partie IV : Discussion générale</b> .....	<b>179</b>
IV.1. Les résidus M-31/41 des flavivirus et leur capacité pro-apoptotique .....	182
IV.2. Le résidu M-36 et son impact sur la biologie des protéines prM/M et E.....	183
<b>Partie V : Perspectives</b> .....	<b>187</b>
V.1. Utilisation du peptide pro-apoptotique M-31/41 de ZIKV dans l'élaboration de nouvelles stratégies anti-cancéreuses.....	188
V.2. Atténuation de DENV pour l'élaboration de souches vaccinales vivantes .....	190
V.3. Design, production et caractérisation de clones viraux RUN-18 et DES-14 obtenus par génétique inverse .....	193
<b>Partie VI : Références</b> .....	<b>196</b>
<b>Partie VII : Annexes</b> .....	<b>232</b>



## Listes des figures et des tableaux

Figure 1 : Distribution mondiale des arbovirus et aire de répartition de leurs moustiques vecteurs. ....	35
Figure 2 : Cycle de transmission des arbovirus .....	37
Figure 3 : Classification de Baltimore .....	38
Figure 4 : Arbre phylogénétique du genre <i>Flavivirus</i> (famille <i>Flaviviridae</i> ).....	41
Figure 5 : Organisation du génome des flavivirus .....	42
Figure 6 : Les protéines structurales C, prM et E .....	44
Figure 7 : Les régions non-codantes 5'UTR et 3'UTR des flavivirus.....	48
Figure 8 : Structure de la particule virale des flavivirus.....	49
Figure 9 : Cycle de réplication des flavivirus .....	52
Figure 10 : Récepteurs et facteurs d'attachement des flavivirus.....	54
Figure 11 : Complexe de réplication des flavivirus.....	57
Figure 12 : Étapes de traduction, de réplication et d'assemblage des flavivirus.....	59
Figure 13 : Répartition mondiale de l'infection par ZIKV.....	61
Figure 14 : Répartition mondiale de l'infection par DENV.....	63
Figure 15 : Représentation de la région sud-ouest océan Indien (SOOI) .....	64
Figure 16 : Épidémies de la DENV-2 à La Réunion entre 2018 et 2019.....	66
Figure 17 : Arbre phylogénétique du virus Zika .....	68
Figure 18 : Arbre phylogénétique du virus de la dengue .....	69
Figure 19 : Cycle de transmission des flavivirus ZIKV et DENV .....	70
Figure 20 : Les étapes de la transmission vectorielle (virus/moustique) .....	71
Figure 21 : Symptômes associés à l'infection par ZIKV et DENV.....	75
Figure 22 : Syndrome de Guillain-Barré (SGB) médiée par les auto-anticorps .....	77
Figure 23 : Classification de la dengue par gravité des manifestations cliniques.....	79
Figure 24 : Dynamique et diagnostic de l'infection par les flavivirus ZIKV et DENV .....	82
Figure 25 : Structure moléculaire de vaccins contre le virus de la dengue .....	85
Figure 26 : Réponse physiologique de l'hôte au site d'infection.....	89
Figure 27 : Reconnaissance et localisation cellulaire des récepteurs PRR .....	91
Figure 28 : Voie de signalisation de l'interféron (IFN) de type I.....	94
Figure 29 : La réponse immunitaire adaptative.....	98
Figure 30 : Voie de signalisation de l'apoptose .....	100
Figure 31 : Structure de la protéine précurseur de membrane prM.....	103
Figure 32 : Structure de la protéine d'enveloppe (E) .....	108
Figure 33 : Organisation structurale de prM et E à la surface de la particule virale .....	111
Figure 34 : États oligomériques de la protéine E au cours du cycle viral .....	113
Figure 35 : Interactions des protéines structurales prM et E.....	115
Figure 36 : Méthode de production des nanoparticules MPSPs .....	190
Figure 37 : La méthode ISA (Infectious subgenomic amplicons).....	193
Figure 38 : Clones moléculaire et virus chimériques DENV-2 RUN-18 et DES-14.....	195
Tableau 1 : Classification des arbovirus .....	39
Tableau 2 : Alignement des résidus M-31/41 des flavivirus d'intérêt médical .....	183
Tableau 3 : Séquences M-31/41 des souches vaccinales Dengvaxia et Qdenga .....	192



## Liste des abréviations

ADE : *antibody-dependant enhancement*  
ADN : *acide désoxiribonucléique*  
ADNc : *acide désoxyribonucléique complémentaire*  
Ae. : *aedes*  
AINS : *anti-inflammatoire non stéroïdien*  
APAF-1 : *apoptosis protease activating factor-1*  
ARN : *acide ribonucléique*  
ARNi : *acide ribonucléique interférent*  
ARNm : *acide ribonucléique messenger*  
BiFC : *bimolecular fluorescence complementation*  
C : *protéine de capsid*  
CDC : *centers for disease control and prevention*  
cGAS : *cyclic GMP-AMP synthase*  
CHIKV : *virus Chikungunya*  
CLR : *type-C lectin receptors*  
CM : *circonvolution membranaire*  
CPA : *cellule présentatrice d'antigène*  
CR : *complexe de réplication*  
D2AMP : *DENV-2 Apoptotic M Peptide*  
DAMP : *damage-associated molecular pattern*  
DB : *dumbbell*  
DC : *dendritic cell*  
DC-SIGN : *dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*  
DENV : *virus de la Dengue*  
DENV-2 : *virus de la Dengue de sérotype 2*  
DES-14 : *Dar-Es-Salaam 2014*  
DF : *fièvre de la Dengue*  
DHF : *fièvre hémorragique de la Dengue*  
DR : *récepteur de mort*  
DSS : *syndrome de choc de la Dengue*  
E : *protéine d'enveloppe*  
ED : *ectodomaine de la protéine d'enveloppe*  
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*  
FL : *boucle de fusion*  
GAG : *glycosaminoglycanes*  
GFP : *green fluorescent protein*  
GL : *boucle de glycosylation*  
GRP : *glucose-regulated protein*  
HSP : *heat shock protein*  
IFN : *interféron*  
Ig : *immunoglobuline*  
ISA : *infectious subgenomic amplicons*  
ISFV : *insect-specific flavivirus*  
ISG : *interferon-stimulated genes*  
ISRE : *interferon-stimulated response element*  
JAK : *janus kinase*  
JEV : *virus de l'Encéphalite Japonaise*  
kDa : *kilodalton*  
L-SIGN : *liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*  
LAV : *lutte antivectorielle*  
LGP2 : *laboratory of genetics and physiology protein 2*  
M : *protéine de membrane*  
m7GpppAmp : *7-méthylguanosine de type I*  
MAVS : *mitochondria antiviral-signaling protein*  
MBFV : *mosquito-borne flavivirus*  
MDA5 : *melanoma differentiation-associated gene 5*  
MMR : *macrophages mannose receptor*  
MPF : *megacaryocyte potentiating factor*

MPSP : *multimeric protein scaffold particle*  
MSLN : *mésothéline*  
MTase : *méthyltransférase*  
NKV : *no known vector*  
NLR : *NOD like-receptor*  
NS : *non-structurale*  
NTPase : *nucleoside triphosphatase*  
OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*  
ONNV : *virus O'Nyong-Nyong*  
ORF : *open reading frame*  
PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*  
PARP : *poly ADP-ribose polymerase*  
pH : *potentiel hydrogène*  
PNH : *primates non-humains*  
prM : *précurseur de membrane*  
PRNT : *plaque reduction neutralisation test*  
PRR : *pattern recognition receptor*  
RdRp : *ARN polymérase ARN-dépendant*  
RE : *réticulum endoplasmique*  
REG : *réticulum endoplasmique granuleux*  
RLR : *retinoid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor*  
ROS : *reactive oxygen species*  
RT-qPCR : *reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction*  
RTPase : *ARN triphosphatase*  
RUN-18 : *Réunion 2018*  
RVFV : *virus de la Fièvre de la Vallée du Rift*  
SCZ : *syndrome congénital à virus Zika*  
sfRNA : *subgenomic flavivirus RNA*  
SGB : *syndrome de guillain-barré*  
SL : *stem-loop*  
SOC : *suppressor of cytokine signalling*  
SOOI : *sud-ouest de l'océan indien*  
SPHK2 : *sphingosine kinase 2*  
STAT : *signal transducer and activator of transcription*  
TAA : *tumor-associated antigen*  
TAM : *Tyro3, Axl et Mer*  
TBFV : *tick-borne flavivirus*  
TDM : *domaine transmembranaire*  
TII : *technique de l'insecte incompatible*  
TIM : *T-cell immunoglobulin domain and mucin domain*  
TIS : *technique de l'insecte stérile*  
TLR : *toll-like receptor*  
TNFR : *tumor necrosis factor receptor*  
TROD : *test rapide d'orientation diagnostic*  
TYK : *tyrosine kinase*  
UPR : *unfolded protein response*  
UTR : *untranslated region*  
VP : *paquets vésiculaires*  
WNV : *virus West Nile*  
XRN : *exoribonucléase*  
YFV : *virus de la Fièvre jaune*  
ZAMP : *zika apoptotic M peptide*  
ZIKV : *virus Zika*

## Liste des annexes

Annexe n°1: Decotter J., Mavingui P., Desprès P. and Gadea G. Expression of Cosmopolitan Dengue 2 envelope glycoproteins in human cells identifies a role for the residues M-33/35/38 in the stability of E protein. Résumé pour la conférence internationale « American Society of Virology 2022 » (ASV2022)

Annexe n°2: Decotter J., Mavingui P., Desprès P. and Gadea G. Expression of Cosmopolitan Dengue 2 envelope glycoproteins in human cells identifies a role for the residues M-33/35/38 in the stability of E protein. Session poster à la conférence internationale « American Society of Virology 2022 » (ASV2022)

Annexe n°3: Substitutions nucléotidiques présentes dans les souches DENV-2 RUN-18, DES-14, Seychelles 2016 et la souche vaccinale PDK-53



# **Partie I : Introduction générale**

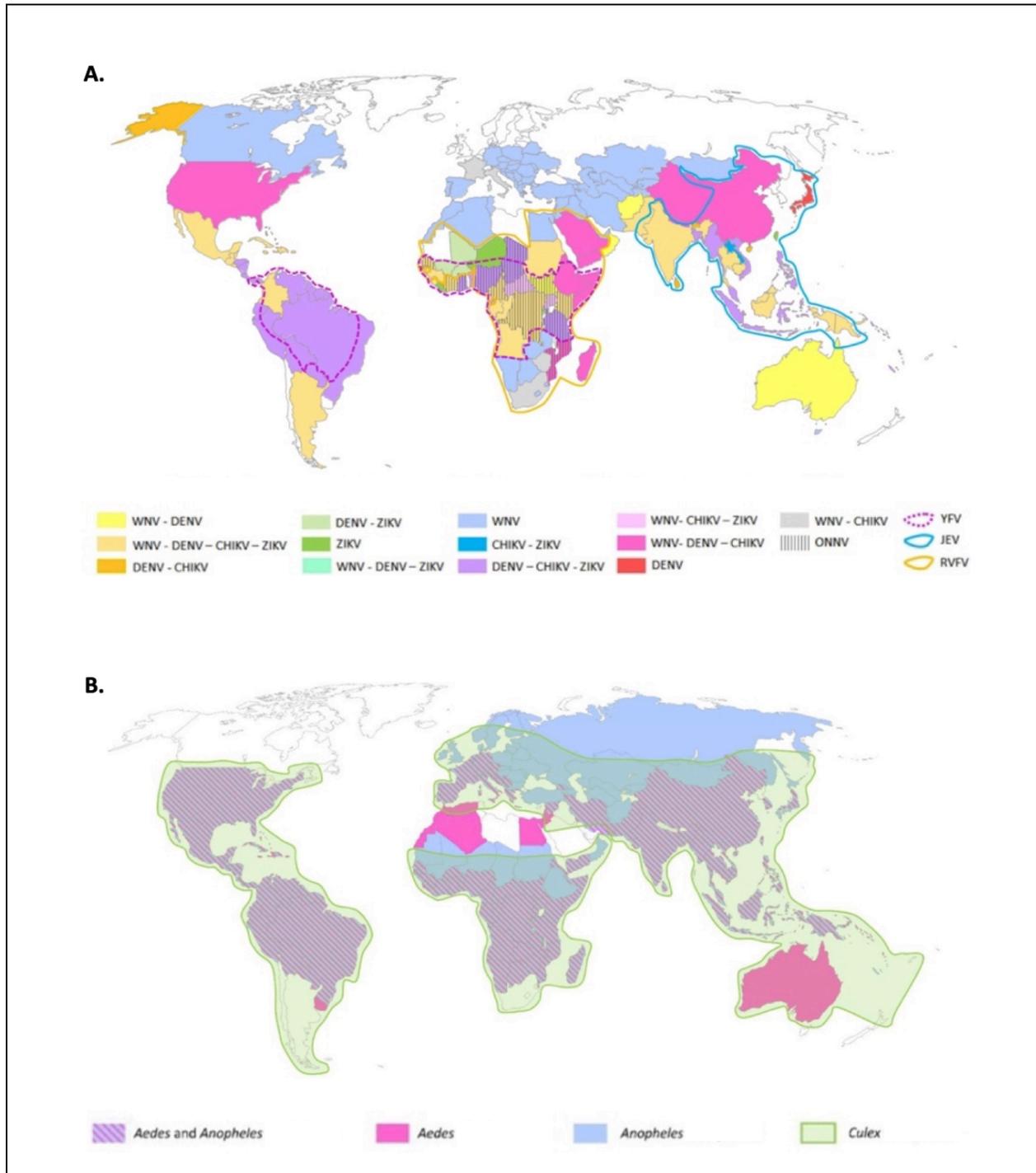
## I. Des arbovirus aux flavivirus

### I.1. Définition

Les arbovirus (de l'anglais, Arthropode-borne virus) constituent un ensemble hétérogène de virus responsable de zoonoses transmis à des hôtes vertébrés par des vecteurs arthropodes hématophages : moustiques, tiques, culicoïdes et phlébotomes (Mellor 2000, Kuno & Chang 2005). Ces virus peuvent être à l'origine de pathologies chez l'Homme qui sont appelées des arboviroses. Les arbovirus représentent actuellement un problème de santé publique majeur au niveau mondial, étant responsables de maladies à morbidité et mortalité élevées qui affectent plusieurs centaines de millions de personnes chaque année (Girard et al. 2020).

Au cours des 30 dernières années, l'émergence et/ou la ré-émergence des arbovirus n'a fait que croître avec une augmentation de leur répartition géographique donnant lieu à de nombreuses épidémies dans diverses régions du monde (Gould et al. 2017, Weaver 2018, Girard et al. 2020). À l'origine principalement associés à des maladies tropicales et subtropicales dû à la présence géographique de leurs vecteurs, les arbovirus participent aujourd'hui à l'émergence de ces maladies dans des régions tempérées qui étaient jusque-là préservées (**Figure 1**). La récente expansion mondiale des arbovirus repose principalement sur l'existence d'une grande diversité virale et leur adaptation à un environnement propice à la présence de leur vecteur(s), sans oublier l'implication grandissante des changements démographiques, sociaux et à présent climatiques dans le phénomène (Weaver & Reisen 2010, Young 2018).

La majorité de la population mondiale est donc aujourd'hui considéré à risque de développer une épidémie par arbovirose. Récemment, des plans stratégiques tels que le « Global Arbovirus Initiative » mise en place par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ou encore des plans d'investissements comme « France 2030 » lancé par le gouvernement français ont eu pour objectif de lutter contre ces arbovirus émergents et ré-émergents présentant un potentiel épidémique et pandémique. Ma thèse s'intègre intégralement dans cette dynamique en ayant comme objectif d'approfondir nos connaissances sur les caractéristiques biologiques des arbovirus, afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénicité virale, d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques et de développer de nouveaux outils virologiques qui pourront faire l'objet de stratégies de lutte innovantes et efficaces.



**Figure 1 : Distribution mondiale des arbovirus et aire de répartition de leurs moustiques vecteurs.**

**(A.)** Distribution mondiale des principaux arbovirus d'importance médicale : Virus West Nile (WNV) ; Virus de la Dengue (DENV) ; Virus Chikungunya (CHIKV) ; Virus Zika (ZIKV) ; Virus de la Fièvre Jaune (YFV) ; Virus de l'Encéphalite Japonaise (JEV) ; Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (RVFV) ; Virus O'Nyong-Nyong (ONNV). **(B.)** Aire de répartition mondiale des populations de moustiques du genre *Aedes* ssp., *Anopheles* ssp. et *Culex* ssp. Les trois genres de moustiques représentés sur la carte sont les plus répandus dans le monde et constituent les principaux vecteurs d'arbovirus (*Aedes* ssp. et *Culex* spp.) et de parasites (*Anopheles* spp.) d'importance médicale. Figure adaptée de (Viglietta et al. 2021).

## I.2. Cycle de transmission

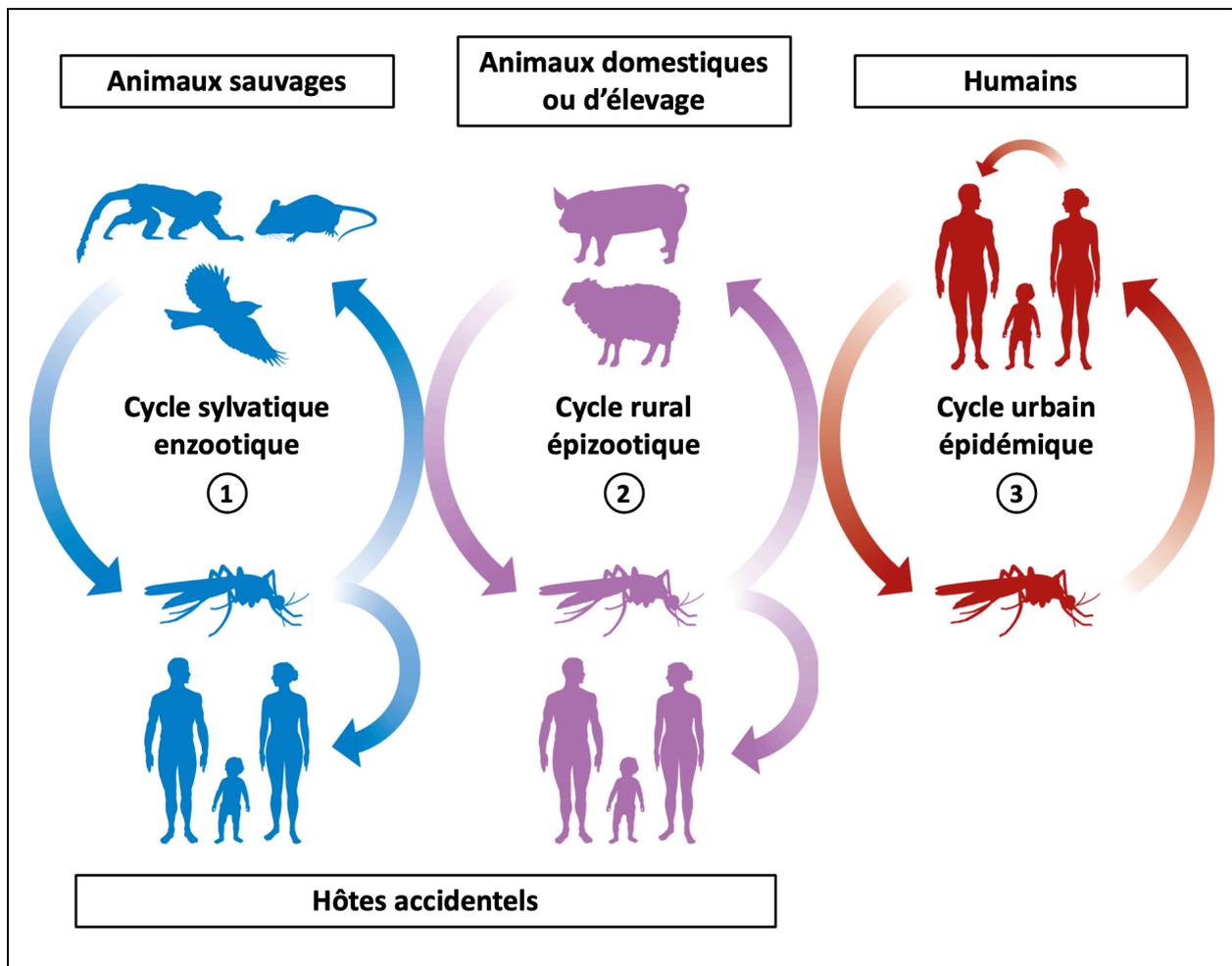
Le cycle de transmission des arbovirus implique alternativement la présence de trois acteurs : le virus, le vecteur et l'hôte vertébré. Il existe différents cycles de transmission : **1)** Le cycle sylvatique enzootique. Il a lieu entre le virus, le vecteur et des animaux de la faune sauvage (primates, rongeurs, oiseaux, chauves-souris, ...) qui jouent le rôle de réservoir et/ou d'amplificateur du virus (Kuno et al. 2017). **2)** Le cycle rural épizootique. Il a lieu entre le virus, le vecteur et des animaux domestiques et/ou d'élevage. **3)** Le cycle urbain. Durant le cycle sylvatique et/ou rural, une transmission accidentelle à l'Homme peut se produire en raison des proximités de lieux entre les animaux réservoirs et l'Homme (**Figure 2**). Celui-ci peut alors devenir un hôte amplificateur accidentel permettant le maintien du virus dans un cycle épidémique sans intermédiaire entre Homme et vecteur. Ce dernier cycle est à l'origine de l'émergence et du maintien de nombreuses épidémies d'arbovirus dans le monde (Weaver & Barrett 2004, Weaver 2005).

Les arbovirus sont uniques en ce qui concerne leur mode de transmission biologique qui implique la présence d'un vecteur hématophage (Viglietta et al. 2021). Après le repas sanguin du vecteur sur un hôte infecté, le virus va se multiplier dans l'organisme du vecteur après avoir traversé le tube digestif, puis va envahir les tissus environnants pour atteindre finalement les glandes salivaires. L'arbovirus est ensuite transmis à un hôte vertébré lors d'une nouvelle piqûre ou morsure (Conway et al. 2014). Il est nécessaire que le virus dispose de la capacité de se répliquer efficacement chez le vecteur aussi bien que l'hôte vertébré dont la charge virale dans la circulation sanguine (virémie) doit être suffisamment élevée pour que la chaîne de transmission vecteur-hôte se maintienne. Chez l'hôte vertébré qui n'est pas un réservoir du pathogène, la virémie après quelques jours disparaît avec la mise en place d'une immunité innée et adaptative spécifique du pathogène. En règle générale, une persistante virale est observée chez le moustique femelle et une transmission sexuée (ou verticale) est possible avec des œufs positifs pour la présence du pathogène. Même si la fréquence d'un tel phénomène est rare, il pourrait contribuer au maintien du virus dans la nature pendant les périodes inter-épidémiques.

## - DES ARBOVIRUS AUX FLAVIVIRUS -

Une transmission non-vectorielle et intra-espèces chez l'Homme peut également se produire. Étant un hôte amplificateur, l'Homme peut transmettre certains arbovirus par diverses voies : voie sexuelle, voie nosocomiale lors d'une transfusion sanguine ou lors d'une transplantation d'organe, ou par transmission verticale de la mère enceinte à l'enfant (Chen & Wilson 2016). Cependant chez les arbovirus ces voies de transmission non-vectorielle restent rares et spécifiques du virus impliqué.

> La transmission de ZIKV et DENV sera présentée plus en détail dans la section « III. Les flavivirus – Zika et Dengue », page 70.

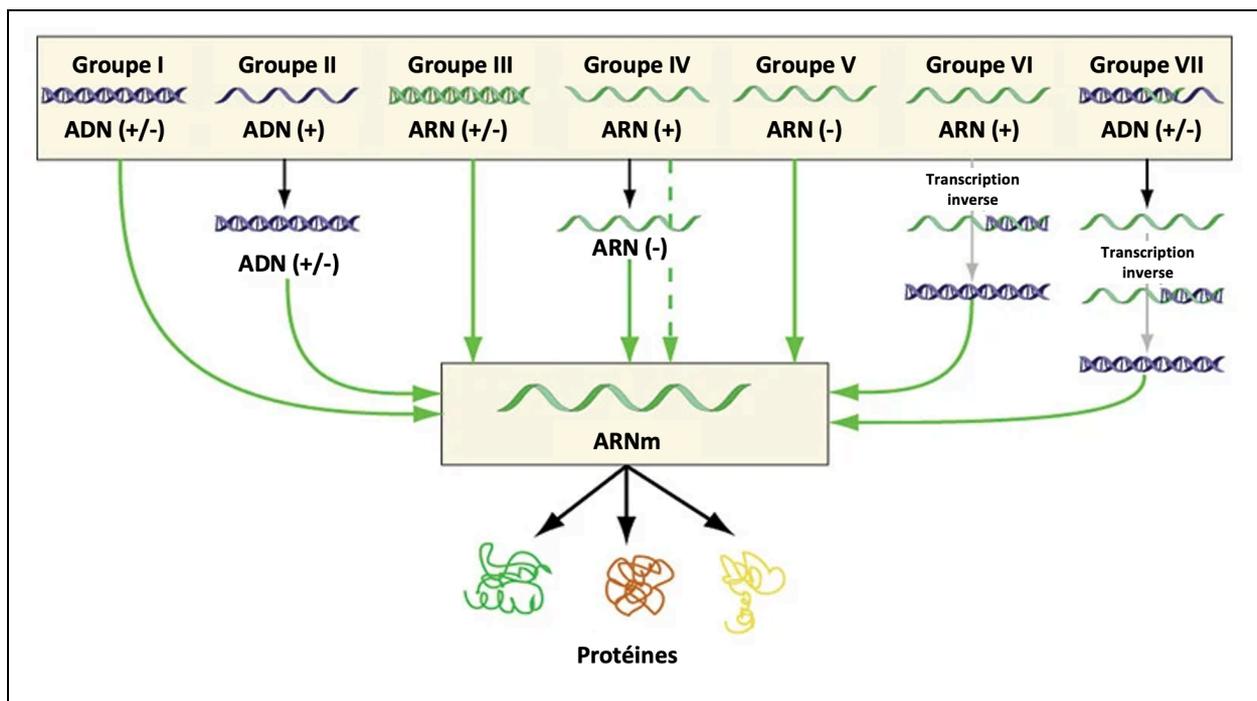


**Figure 2 : Cycle de transmission des arbovirus**

Cycles de transmission des arbovirus : 1) Le cycle sylvatique enzootique qui implique les animaux sauvages, les vecteurs arthropodes et l'Homme. 2) Le cycle rural épizootique qui implique les animaux domestiques ou d'élevage, les vecteurs arthropodes et l'Homme, et 3) le cycle urbain épidémique qui implique les vecteurs arthropodes et l'Homme sans intermédiaire. Dans le cycle sylvatique et/ou rural l'Homme peut devenir un hôte accidentel. L'ensemble des vecteurs arthropodes est ici représenté par l'illustration d'un moustique vecteur. *Figure adaptée de (Weaver et al. 2018).*

### I.3. Classification

À ce jour, plus de 500 arbovirus ont été enregistrés dans le catalogue international des arbovirus (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), dont environ 150 sont connus pour être pathogènes pour l'Homme (Hubálek et al. 2014). La classification des arbovirus était initialement basée sur des critères sérologiques (classification antigénique) et sur la base d'une capacité commune de ces virus à se répliquer et se transmettre par des arthropodes. Aujourd'hui, la classification des arbovirus est établie selon des critères génomiques (classification de Baltimore), sur la base de propriétés biologiques communes permettant la séparation des arbovirus en groupes distinctifs (**Figure 3**). Les arbovirus peuvent alors être classés en quatre groupes distincts suivant la nature de leur génome : ARN simple brin positif (Groupe IV ; ARN +), ARN simple brin négatif (Groupe V ; ARN -), ARN double brin (Groupe III ; ARN +/-) et ADN (Groupe I ; ADN +/-) (Plowright et al. 1969, Calisher et al. 1989, Kuno et al. 1998).



**Figure 3 : Classification de Baltimore**

Classification des virus proposée par le biologiste américain David Baltimore. Cette classification prend en compte la structure du génome viral, la stratégie de synthèse d'ARNm et de répllication des virus. Sept groupes sont établis selon que le génome est constitué d'acide ribonucléique (ARN) ou d'acide désoxyribonucléique (ADN), que le génome soit monocaténaire ou bicaténaire, et que la polarité du génome soit positive (+) ou négative (-).

- DES ARBOVIRUS AUX FLAVIVIRUS -

Toutefois, les arbovirus sont dans leur grande majorité des virus à ARN de polarité positive, qui sont connus pour avoir un taux de mutation particulièrement élevé (Domingo et al. 2021). Cette propriété particulière reflète la grande plasticité génétique de ces virus, qui sont adaptés à des hôtes tant invertébrés que vertébrés taxonomiquement éloignés et dont les types de cellules et de systèmes immunitaires sont radicalement différents (Domingo & Holland 1997, Wuerth & Weber 2016). Cette plasticité génétique participe donc à la mise en place d'une grande diversité des arbovirus, permettant leur évolution et leur adaptation, tout en facilitant l'émergence et/ou la ré-émergence des arboviroses qui y sont associées.

L'alignement de séquences critiques pour la biologie des arbovirus, permet également leur organisation au sein d'une grande variété de familles virales, chacune composée de genres spécifiques (**Tableau 1**). On peut distinguer plusieurs familles taxonomiques regroupant des arbovirus humains d'importance en termes de santé publique : *Orthomyxoviridae* (genre *Thogotovirus*), *Reoviridae* (genre *Coltivirus*, *Orbivirus*, *Seadornavirus*), *Rhabdoviridae* (genre *Vesiculovirus*), *Bunyaviridae* (genre *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*), *Togaviridae* (genre *Alphavirus*), et *Flaviviridae* (genre *Flavivirus*) (Gubler 2002, Venter 2018).

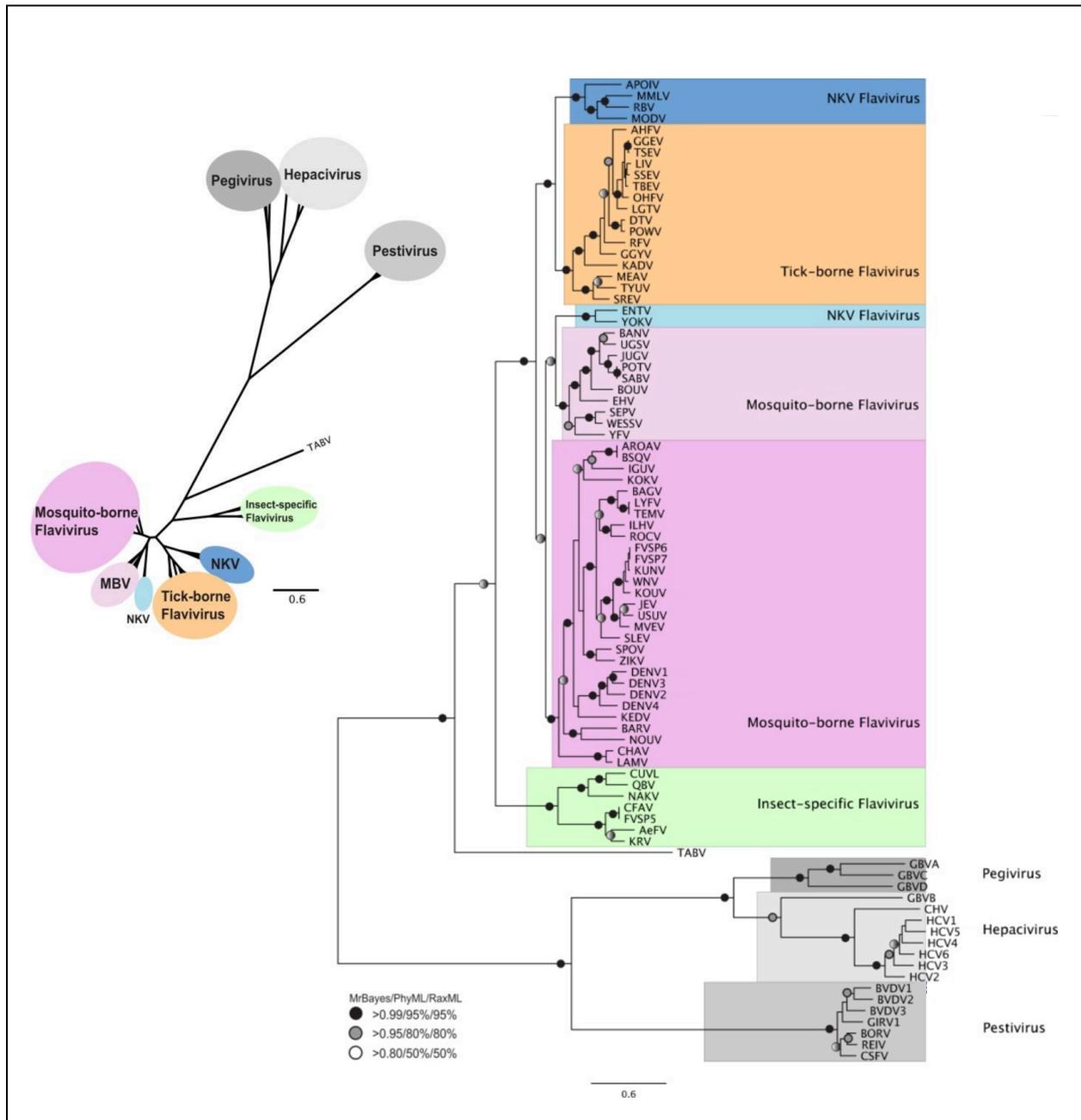
<b>Tableau 1 : Classification des arbovirus</b>				
<b>Famille</b>	<b>Genre</b>	<b>Groupe</b>	<b>Génome</b>	<b>Vecteur</b>
Orthomyxoviridae	<i>Thogotovirus</i>	Groupe V	ARN (-)	Tique
Rhabdoviridae	<i>Vesiculovirus</i>	Groupe V	ARN (-)	Phlébotome
Bunyaviridae	<i>Orthobunyavirus</i>	Groupe V	ARN (-)	Tique
	<i>Nairovirus</i>			Moustique
	<i>Phlebovirus</i>			Phlébotome
Togaviridae	<i>Alphavirus</i>	Groupe IV	ARN (+)	Moustique
Flaviviridae	<i>Flavivirus</i>	Groupe IV	ARN (+)	Tique Moustique
Reoviridae	<i>Coltivirus</i>	Groupe III	ARN (+/-)	Tique
	<i>Orbivirus</i>			Culicoïde
	<i>Seadornavirus</i>			

#### I.4. Les Flavivirus

Le genre Flavivirus appartient à la famille des Flaviviridae qui comprend trois autres genres non apparentés aux arbovirus : Pestivirus, Hepavirus et Pegivirus. Le terme flavivirus vient de « flavus » signifiant jaune en latin, faisant référence au virus de la fièvre jaune (YFV) qui fut le premier virus identifié chez l'Homme au début du XXe siècle. Le genre Flavivirus regroupe plus de 70 virus (appartenant à 53 espèces virales), qui partagent de fortes similarités en termes de morphologie, d'organisation du génome, de cycle viral et de caractéristiques biologiques (Simmonds et al. 2017). Ce genre viral constitue le groupe d'arbovirus le plus important en termes de santé publique, regroupant des virus d'importance médicale pour l'homme, tels que : le virus de la fièvre jaune (YFV), le virus West Nile (WNV), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), le virus de la Dengue (DENV) ou encore le virus Zika (ZIKV) (Gould & Solomon 2008). Les flavivirus sont répandus sur tous les continents en raison de la distribution géographique mondiale de leurs vecteurs et sont endémiques dans de nombreuses régions du monde affectant la vie de millions d'êtres humains.

D'après la classification actuelle, le genre Flavivirus peut être divisé en quatre groupes distincts selon la nature de l'hôte et du vecteur de transmission (**Figure 4**). On peut citer : **1**) Les flavivirus transmis aux vertébrés par des moustiques (MBFV, de l'anglais Mosquito-borne flavivirus), **2**) les flavivirus transmis aux vertébrés par des tiques (TBFV, de l'anglais Tick-borne flavivirus), **3**) les flavivirus spécifiques aux insectes (ISFV, de l'anglais Insect-borne flavivirus) et **4**) les flavivirus sans vecteurs connus (NKV, de l'anglais No known vector) (Moureau et al. 2015).

La grande majorité des flavivirus d'importance médicale sont principalement transmis par les moustiques (MBFV). Les MBFVs sont subdivisés en deux groupes selon le genre auquel appartient leur principal vecteur (Gaunt et al. 2001, Gould et al. 2003). Ces groupes comprennent les flavivirus principalement transmis par les moustiques du genre *Culex* et/ou du genre *Aedes* (*Ae.*). Les flavivirus associés aux moustiques du genre *Culex* sont généralement neurotropes et associés à des encéphalites chez l'Homme (JEV et WNV). Alors que les flavivirus associés aux moustiques du genre *Aedes* sont généralement viscérotropes et provoquent des fièvres hémorragiques chez l'Homme dans les formes les plus sévères de l'infection (YFV, DENV).



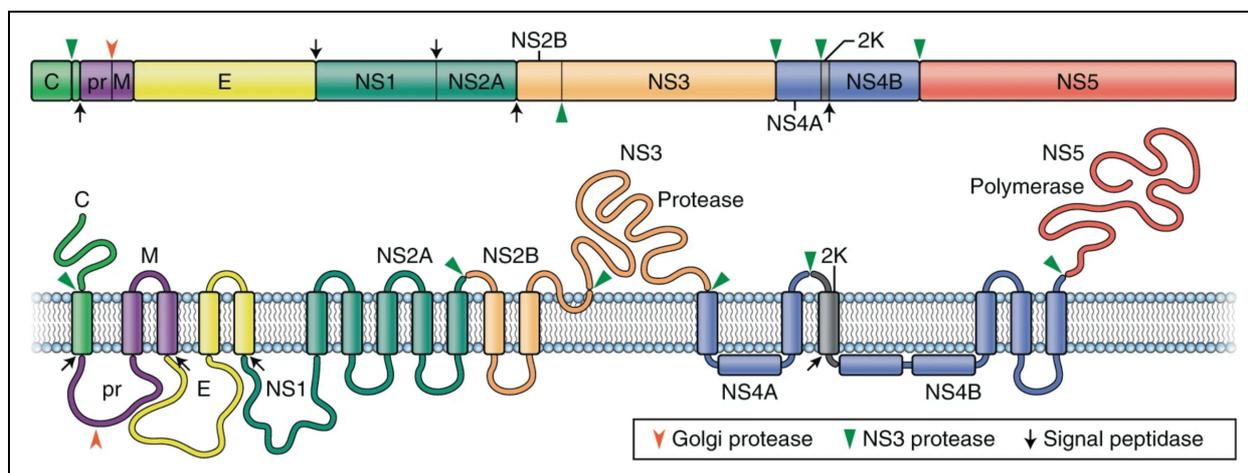
**Figure 4 : Arbre phylogénétique du genre *Flavivirus* (famille *Flaviviridae*)**

Reconstruction phylogénétique du genre *Flavivirus* à partir des séquences concaténées des protéines non-structurales (NS) NS3 et NS5 des virus de la famille des *Flaviviridae*. L'arbre illustré présente la meilleure topologie bayésienne, en distinguant les flavivirus selon la nature de l'hôte (vertébré ou insecte) et du vecteur de transmission (moustique, tique, sans vecteurs connus). Les valeurs numériques aux nœuds de l'arbre (x/y/z) indiquent les valeurs statistiques obtenus grâce aux logiciels suivants : MrBayes, PhyML et RAXML. *Figure adaptée de (Papageorgiou et al. 2014).*

## II. Biologie moléculaire des flavivirus

### II.1. Organisation du génome

Le génome des flavivirus est un ARN simple brin de polarité positive d'environ 11,000 bases nucléotidiques, possédant un cadre de lecture ouvert (ORF) unique, flanqué aux extrémités 5' et 3' par deux régions non-codantes (5'UTR et 3'UTR). Ces extrémités 5'UTR et 3'UTR sont respectivement constituées d'une coiffe de type I (7-méthylguanosine) et d'une terminaison non-polyadénylée en 3', qui sont hautement conservées et essentielles au cours du cycle viral. La traduction du génome viral au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) génère une polyprotéine qui est clivée co- et post-traductionnellement par des protéases cellulaires et virales (**Figure 5**). Cela génère trois protéines structurales : la capsid (C), le précurseur de membrane (prM) et l'enveloppe (E) qui constituent la particule virale, et sept protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) qui sont impliquées d'une part dans la formation de complexes de réplication virale et d'autre part dans le contrôle des mécanismes cellulaires de défense innée antivirale au bénéfice de la multiplication virale. Les protéines structurales et non structurales contribuent aux différentes étapes du cycle réplcatif cytoplasmique des flavivirus qui seront décrites plus en détail dans les paragraphes suivants. (Chambers et al. 1990).



**Figure 5 : Organisation du génome des flavivirus**

Le génome des flavivirus possède un cadre de lecture ouvert unique qui est traduit au niveau du réticulum endoplasmique (RE) en une polyprotéine, qui sera clivée par des protéases cellulaires et virales (indiquées par des flèches). Ce processus aboutit à la production de dix protéines fonctionnelles, dont les trois protéines structurales C, prM et E, et sept protéines non structurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. *Figure adaptée de (Pierson & Diamond 2020).*

## II.1.1. Les protéines structurales

### *II.1.1.1. La protéine de capsid (C)*

La protéine de capsid (~12 kDa) est une protéine hautement basique, chargée positivement. Cette protéine joue un rôle primordial dans l'assemblage de la particule virale en étant la principale protéine structurale à interagir directement avec le génome des flavivirus en formant la nucléocapsid (Sotcheff & Routh 2020). Bien que la protéine de capsid (C) soit une des protéines les moins conservées des flavivirus, il est intéressant de noter que les propriétés structurelles et la distribution des charges à la surface de celle-ci semblent particulièrement préservées (Samsa et al. 2009). La distribution asymétrique des résidus basiques et la présence de résidus chargés aux extrémités N-terminale et C-terminale de la protéine de capsid facilitent l'interaction de celle-ci d'une part à la membrane lipidique virale (par sa région apolaire) et d'autre part à l'ARN viral chargé négativement (par sa région riche en résidus basiques) (Ma et al. 2004) (**Figure 6**).

### *II.1.1.2. La protéine de membrane (prM/M)*

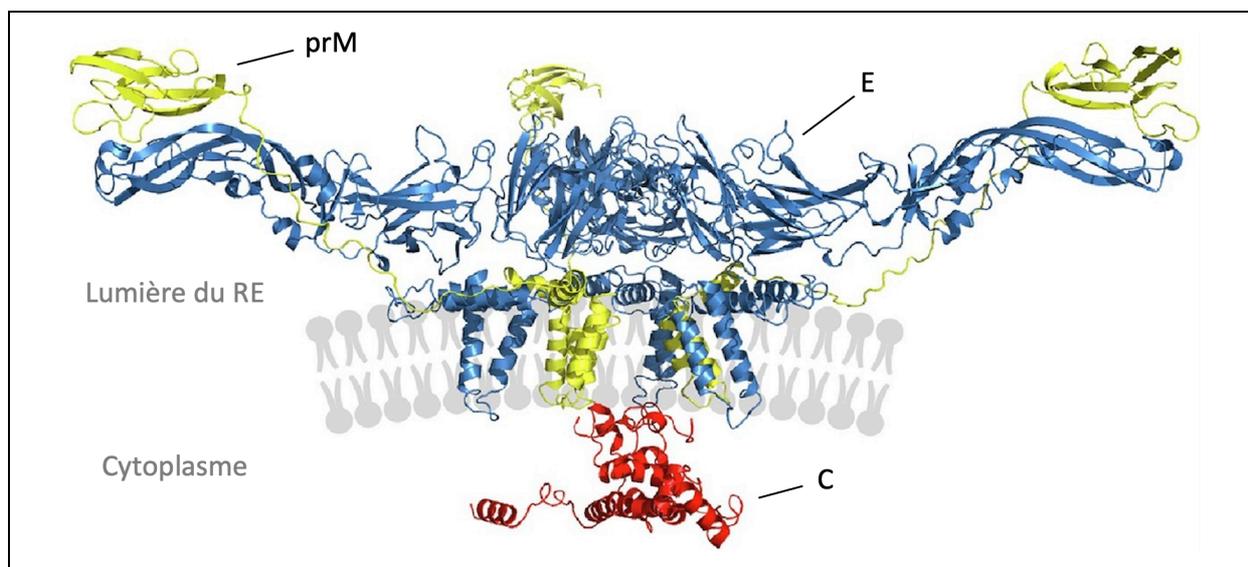
La protéine de membrane (prM/M) des flavivirus est une glycoprotéine initialement synthétisée sous forme de précurseur de membrane (prM) d'environ 26 kDa. La protéine prM est une protéine membranaire constituée d'un domaine précurseur « pr » dans sa partie N-terminale, suivi d'un ectodomaine et de deux domaines transmembranaires constituant la protéine M dans sa partie C-terminale (Zhang et al. 2003). Ces deux sous-unités « pr » et « M » sont reliées entre elles par un domaine de clivage qui sera reconnu par les furines et qui permettra le processus de maturation de la particule virale. La protéine prM/M joue un rôle majeur tout au long du cycle virale en étant la chaperonne de la protéine d'enveloppe (E) (Konishi & Mason 1993, Lorenz et al. 2002). Elle va notamment permettre le bon repliement de la protéine d'enveloppe et empêche la fusion précoce de cette dernière lors de la sécrétion des particules virales. La protéine de membrane (prM/M) est notamment l'une des deux seules protéines se trouvant à la surface de la particule virale avec la protéine d'enveloppe.

> *Cette protéine sera présentée plus en détail dans la section « IV. Les protéines structurales de membrane (prM/M) et d'enveloppe (E) », page 102.*

### II.1.1.3. La protéine d'enveloppe (E)

La protéine d'enveloppe (E) est une glycoprotéine d'environ 53-55 kDa, qui est N-glycosylée par un ou deux glycanes ramifiés sur le séquen N-x-T/S. La protéine E est composée d'un ectodomaine dans sa partie N-terminale et de deux domaines transmembranaires dans sa partie C-terminale (Kuhn et al. 2002, Kostyuchenko et al. 2016). L'ectodomaine est constitué de trois domaines structuraux et fonctionnels (Rey et al. 1995) : le domaine I (EDI), le domaine II (EDII) et le domaine III (EDIII). La protéine d'enveloppe (E) joue un rôle important dans le cycle viral, en étant responsable de l'attachement cellulaire, de l'entrée, de la fusion et de l'assemblage de la particule virale (Mukhopadhyay et al. 2005, Pierson & Kielian 2013). La protéine E est la principale protéine de surface de la particule virale, elle constitue par conséquent une cible privilégiée de la réponse immunitaire en étant le principal antigène des flavivirus. En plus de son rôle structural, comme la protéine prM/M, la protéine E joue également un rôle dans la pathogenèse des flavivirus. Son état de glycosylation étant déterminant à la fois dans la capacité de neuro-invasion, dans l'assemblage et dans l'infectiosité des particules virales (Hanna et al. 2005, Carbaugh et al. 2019).

> Cette protéine sera présentée plus en détail dans la section « IV. Les protéines structurales de membrane (prM/M) et d'enveloppe (E) », page 102.



**Figure 6 : Les protéines structurales C, prM et E**

Illustration des protéines structurales de capsid (C, en rouge), de précurseur de membrane (prM, en jaune) et d'enveloppe (E, en bleu) enchâssées au sein de la membrane du RE (en gris). Vue latérale regroupant un dimère de capsid et trois hétérodimères prME. *Figure adaptée de (Barnard et al. 2021).*

## II.1.2. Les protéines non-structurales (NS)

### *II.1.2.1. La protéine NS1*

La protéine NS1 a un poids moléculaire d'environ 46 kDa. Cette protéine est la seule protéine virale non-structurale sécrétée connue chez les flavivirus (Flamand et al. 1999, Crabtree et al. 2005). La protéine NS1 a la capacité de s'associer en homodimères au sein des membranes du RE (Winkler et al. 1988), puis en hexamères au travers de l'appareil de Golgi pour former des particules lipoprotéiques solubles qui seront sécrétées dans le compartiment extracellulaire (Rastogi et al. 2016). La forme hexamérique de la NS1 est hautement antigénique induisant une forte réponse humorale qui sera utilisée pour le diagnostic des infections à flavivirus à un stade précoce. La protéine NS1 est un cofacteur essentiel de la réplication virale, qui semble faciliter la formation de complexes immuns, induire la production d'auto-anticorps et endommager les cellules endothéliales par le système du complément (Muller & Young 2013, Rastogi et al. 2016).

### *II.1.2.2. Les protéines NS2A et NS2B*

La protéine NS2A (~22 kDa) est une protéine membranaire hydrophobe multifonctionnelle. Cette protéine s'associe à la membrane du RE et joue un rôle important dans la réplication, l'assemblage et la libération de la particule virale (Xie, Zou, Puttikhunt, et al. 2015). Au sein du site de réplication, la protéine NS2A interagit avec les protéines NS3, NS5 et l'ARN viral néosynthétisé afin de coordonner le recrutement de ce dernier depuis les complexes de réplication vers les sites d'assemblage de la particule virale. La protéine NS2A agirait également comme un antagoniste de la réponse antivirale en inhibant la production de l'interféron et en participant à l'induction de l'apoptose (Muñoz-Jordán et al. 2003, Melian et al. 2013).

La protéine NS2B (~14 kDa) est une protéine membranaire hydrophobe qui forme un complexe avec la protéine NS3 et permet son ancrage dans les membranes cellulaires (Li et al. 2015). NS2B agit comme un cofacteur essentiel pour l'activité sérine protéase du complexe NS2B/NS3, en permettant le bon repliement de la protéine NS3 (Arias et al. 1993). Grâce à son rôle de cofacteur, la protéine NS2B est également impliquée dans le recrutement des protéines virales au niveau des complexes de réplication, dans la régulation de l'assemblage et la libération des particules virales (Chambers et al. 1993).

### *II.1.2.3. La protéine NS3*

La protéine NS3 (~70 kDa) est une protéine multifonctionnelle hautement conservée chez les flavivirus. Cette protéine possède deux domaines à activité enzymatique : un domaine sérine/protéase à son extrémité N-terminale et un domaine hélicase/5'-nucleoside triphosphatase (NTPase) à son extrémité C-terminale (Wang et al. 2009). Le domaine sérine/protéase est responsable de la maturation de la polyprotéine virale en permettant le clivage protéolytique des jonctions NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A et NS4A/NS5 (Wahaab et al. 2021). Le domaine C-terminal se compose de deux sous-domaines avec : une activité hélicase pour dérouler l'ARN viral lors de la réplication virale et une activité NTPase permettant l'hydrolyse de nucléoside triphosphate. Ce domaine C-terminal possède également une activité ARN 5'-triphosphatase (RTPase) qui est impliquée dans la mise en place de la coiffe 5' de l'ARN viral (Wengler & Wengler 1989).

### *II.1.2.4. Les protéines NS4A et NS4B*

Les protéines NS4A et NS4B sont des protéines transmembranaires reliées entre elles par un peptide nommé 2K. Le peptide 2K agit comme une séquence de signal pour la translocation de la NS4B dans la lumière du RE et son clivage est essentiel pour le bon fonctionnement de la NS4A (Miller et al. 2007). Les protéines NS4A et NS4B semblent fonctionner en coopération et jouent des rôles multiples dans la réplication virale et dans l'interaction virus-hôte.

La protéine NS4A (~16 kDa) est un composant majeur du complexe de réplication virale en jouant un rôle majeur dans le réarrangement et l'invagination de la membrane du RE. La région N-terminale transmembranaire de NS4A est impliquée dans son oligomérisation (Lee et al. 2015), et interagirait avec les protéines virales NS et la vimentine cellulaire pour réguler la formation des complexes de réplication (Teo & Chu 2014). La protéine NS4B (~27 kDa) est la plus grande protéine non-structurale et transmembranaire des flavivirus. La protéine NS4B est également impliquée dans la formation du complexe de réplication, en favorisant la courbure négative de la membrane du RE et en augmentant la surface de cette dernière par son interaction directe avec la protéine NS4A (Zou et al. 2015).

D'autre part, les protéines NS4A et NS4B contribuent toutes deux à la réplication virale par leur interaction avec la protéine NS3. NS4A régule l'activité ATPase du domaine hélicase de NS3 (Shiryayev et al. 2009), tandis que NS4B renforce son activité hélicase en facilitant la dissociation entre l'ARN simple brin et NS3 (Umareddy et al. 2006). Les protéines NS4A et NS4B auraient également un rôle dans la régulation des réponses cellulaires face à l'infection. NS4A et NS4B peuvent induire la réponse UPR (de l'anglais, Unfolded protein response) pour faciliter la réplication virale et/ou moduler la voie de signalisation antivirale par inhibition de l'IFN de type I (Muñoz-Jordán et al. 2005, Ambrose & Mackenzie 2011, Dalrymple et al. 2015).

#### *II.1.2.5. La protéine NS5*

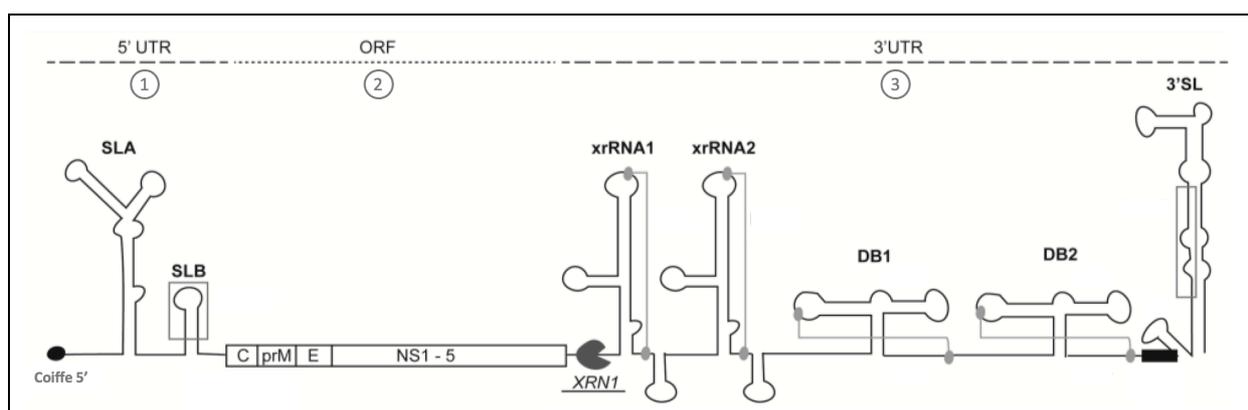
La protéine NS5 (~102 kDa), est une protéine multifonctionnelle hautement conservée au sein du genre Flavivirus. Cette protéine possède deux domaines à activité enzymatique : un domaine méthyltransférase (MTase) à son extrémité N-terminale et un domaine ARN polymérase ARN-dépendant (RdRp) à son extrémité C-terminale (Zhou et al. 2007). La protéine NS5 est essentielle pour la réplication du génome viral en assurant la synthèse et la méthylation des ARN viraux nouvellement synthétisés. Le domaine MTase est responsable de la synthèse de la coiffe 5' de l'ARN viral en possédant trois activités : guanylyltransférase, guanine-N7-méthyltransférase et nucléoside-2'O-méthyltransférase. Au sein des complexes de réplication, la protéine NS5 s'associe avec la protéine NS3 stimulant son activité hélicase et favorisant la synthèse de l'ARN viral (Tay & Vasudevan 2018).

#### *II.1.3. Les régions non-codantes 5'UTR et 3'UTR*

Le génome des flavivirus est flanqué aux extrémités 5' et 3' par deux régions non-codantes 5'UTR et 3'UTR (**Figure 7**). L'interaction entre ces deux régions 5'UTR et 3'UTR permet la cyclisation du génome viral. Celle-ci est essentielle pour la réplication de l'ARN, en permettant le recrutement et le bon positionnement de la protéine NS5 durant l'étape de synthèse des ARN viraux néosynthétisés (Alvarez, De Lella Ezcurra, et al. 2005, Filomatori et al. 2006). La cyclisation du génome requiert plusieurs régions complémentaires entre les extrémités 5'UTR et 3'UTR, qui ont été identifiées comme étant essentielles pour la traduction, la réplication et la pathogénèse des flavivirus (Ng et al. 2017).

L'extrémité 5'UTR s'étend sur environ 100 nucléotides. Cette région contient une structure de coiffe 7-méthylguanosine de type I (m7GpppAmp) et deux régions conservées de type tige-boucle SLA et SLB (SL, de l'anglais Stem-loop). La coiffe 5' est importante pour la traduction et la protection contre les exonucléases cellulaires (Edgil et al. 2006). La région SLA permet l'activation de la polymérase NS5 en étant le promoteur de la synthèse de l'ARN (L. Yu et al. 2008), et la région SLB permet l'interaction ARN-ARN de longue distance nécessaire pour la cyclisation du génome viral (Alvarez, Lodeiro, et al. 2005).

L'extrémité 3'UTR s'étend sur une longueur allant de 400 à 700 nucléotides. Cette région est fortement structurée avec plusieurs régions SL et deux structures en haltère (DB, de l'anglais Dumbbell). L'extrémité 3'UTR joue un rôle important dans la formation d'ARN viraux subgénomiques (sfRNA, de l'anglais Subgenomic flavivirus RNA) en bloquant l'activité des exoribonucléases XRN1, grâce aux régions SL xrRNA1 et xrRNA2 (Moon et al. 2012). Les sfRNA sont produits par une dégradation incomplète de l'ARN viral par XRN1, et modulent la réponse immunitaire en affectant les mécanismes d'ARN interférence (ARNi), les voies de renouvellement de l'ARN messenger (ARNm) et la réponse à l'IFN de type I (Schnettler et al. 2012, Schuessler et al. 2012). D'autre part, la région 3'SL interagit avec les protéines virales et cellulaires pour moduler la synthèse et la traduction de l'ARN viral (Paranjape & Harris 2007).

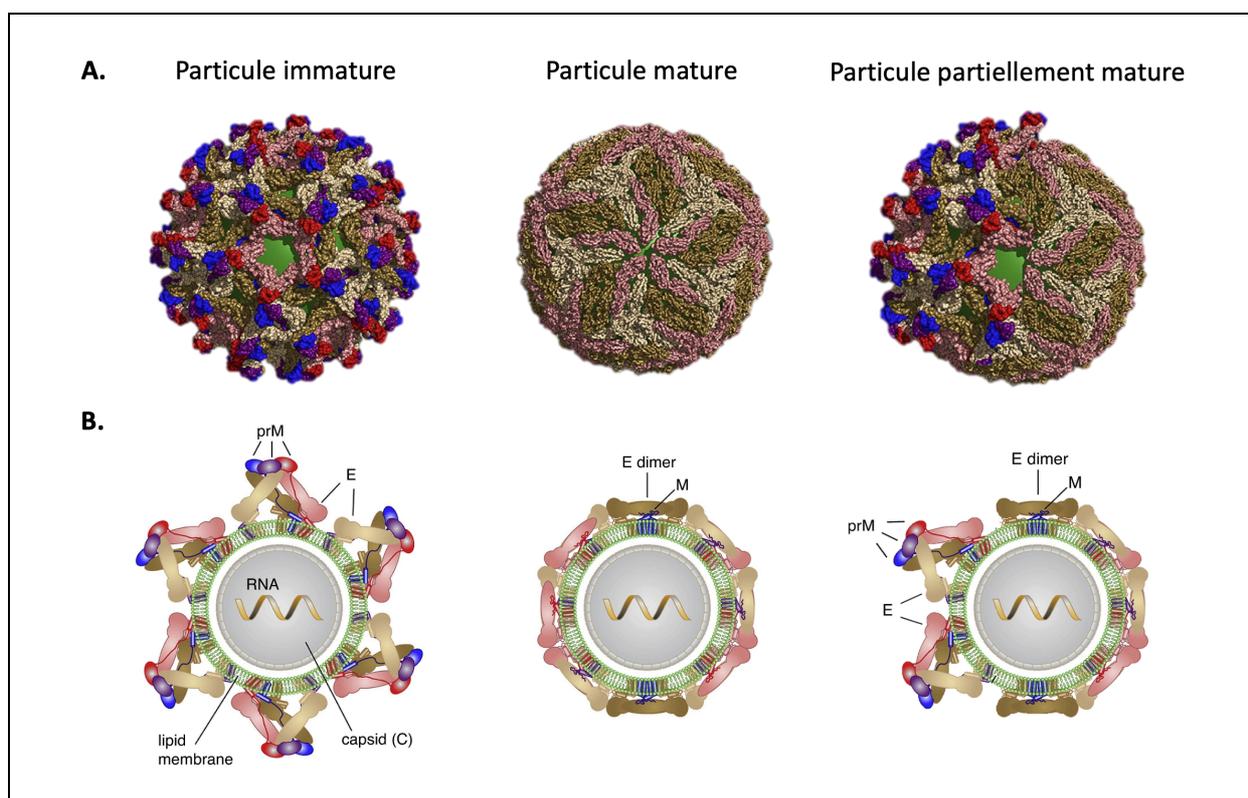


**Figure 7 : Les régions non-codantes 5'UTR et 3'UTR des flavivirus**

Représentation schématique du génome viral des flavivirus avec un agrandissement des extrémités 5'UTR et 3'UTR. Sont indiqués sur l'illustration : **1)** L'extrémité 5'UTR comprenant les régions SLA et SLB (Stem-loop). **2)** Le cadre de lecture ouvert (ORF) codant les trois protéines structurales : la capsid (C), le précurseur de membrane (prM), l'enveloppe (E) et les sept protéines non-structurales (NS1-5). **3)** L'extrémité 3'UTR comprenant les régions SL xrRNA1 et xrRNA2, les deux régions DB (Dumbbell) et la région 3'SL. XRN1 est indiqué au niveau de la première région xrRNA1. *Figure adaptée de (Ng et al. 2017).*

## II.2. Structure de la particule virale

Les flavivirus se présentent sous la forme d'une particule virale sphérique d'environ 50 nm de diamètre (Kuhn et al. 2002). Au sein de cette particule, le génome viral est encapsidé par des protéines de capsid (C). La nucléocapside ainsi formée est enveloppée d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) de la cellule hôte. Dans cette bicouche lipidique sont enchâssées 180 copies des protéines virales de membrane (M) et d'enveloppe (E), qui y sont ancrées par des hélices transmembranaires (**Figure 8**). Les protéines M et E forment alors ensemble une couche glycoprotéique icosaédrique à la surface de la particule virale (Perera & Kuhn 2008). Au cours du cycle de réplication des flavivirus, les particules virales peuvent exister sous trois formes principales : matures, immatures ou partiellement matures (I.-M. Yu et al. 2008, Sirohi et al. 2016).



**Figure 8 : Structure de la particule virale des flavivirus**

(A.) Reconstitution Cryo-EM et (B.) Représentation schématique des particules virales de flavivirus : immatures, matures et partiellement matures. La protéine E est représentée en couleurs pastel (sable, brun et rose), la protéine prM en couleurs vives (violet, bleu et rouge), et la membrane virale sous-jacente en vert. Les structures tridimensionnelles ont été obtenues à partir de la structure immature de DENV sérotype 1 (PDB : 4B03) (Kostyuchenko et al. 2013), et de la structure RNA mature de DENV sérotype 2 (PDB : 3J27) (Xiaokang Zhang et al. 2013). *Figure adaptée de (Rey et al. 2017).*

### II.2.1. Particule virale mature

La particule virale mature adopte une morphologie dite lisse, en étant recouverte à sa surface de 90 homodimères tête-bêche à plat de la protéine E. Ces homodimères forme ensemble 30 radeaux constitués de trois dimères parallèles assemblés en chevrons qui recouvrent entièrement la bicouche lipidique (Xiaokang Zhang et al. 2013, Sirohi et al. 2016). La morphologie des particules virales matures n'est cependant pas statique et peut changer en fonction des variations de potentiel hydrogène (pH) et/ou de température, au cours d'un phénomène dit de « respiration » de la particule virale (Pierson & Kuhn 2012, Fibriansah et al. 2013).

À une température physiologique humaine de 37°C, les particules virales peuvent présenter une morphologie dite bosselée, atteignant 55 nm de diamètre. Cette morphologie serait un intermédiaire des formes matures et fusogéniques de la particule virale (Xinzheng Zhang et al. 2013). L'infection des cellules de mammifères serait alors plus efficace, la protéine E étant plus accessible pour la liaison aux récepteurs cellulaires, tout en facilitant l'étape de fusion du cycle viral (Mukhopadhyay et al. 2005, Fibriansah et al. 2013). La sensibilité de la particule virale face aux changements de pH et de température, semble principalement dépendre de la composition en acides aminés des protéines structurales M et E. À titre d'exemple, le virus Zika présente une surface plus compacte et semble être plus stable que celle du virus de la dengue de sérotype 2, en conservant son infectivité à une température de 40°C (Goo et al. 2016, Kostyuchenko et al. 2016).

### II.2.2. Particule virale immature

Les particules virales immatures sont principalement intracellulaires, mais un clivage incomplet de la protéine précurseur de membrane (prM) par les furines lors de la maturation virale peut engendrer la production de particules immatures extracellulaires (Junjhon et al. 2010). Les particules virales immatures adoptent une morphologie dite épineuse qui peut atteindre 60 nm de diamètre. Elles possèdent une structure icosaédrique asymétrique formée de 60 trimères en pointes constitués à partir de 90 hétérodimères prME. Au sein d'un pic trimérique, le peptide « pr » recouvre la boucle de fusion de la protéine E empêchant toute étape de fusion précoce.

Le clivage de la protéine de membrane prM est considéré comme nécessaire pour permettre l'infectivité des particules virales (Zybert et al. 2008). Cependant, plusieurs études récentes tendent à démontrer que les particules virales immatures participent intégralement au processus infectieux. Ces particules immatures peuvent notamment se lier à la surface de cellules cibles par l'intermédiaire de la protéine prM qui est capable d'interagir avec divers facteurs d'attachement cellulaire (Che et al. 2013, Richter et al. 2014). Les particules immatures peuvent également servir de leurre immunologique. Les anticorps dirigés contre la protéine prM sont faiblement neutralisants et seraient capables de promouvoir l'infection d'autres sérotypes en contribuant au développement de symptômes sévères dans le cas d'une infection par le virus de la dengue (Brandt et al. 1989, Wang et al. 2017).

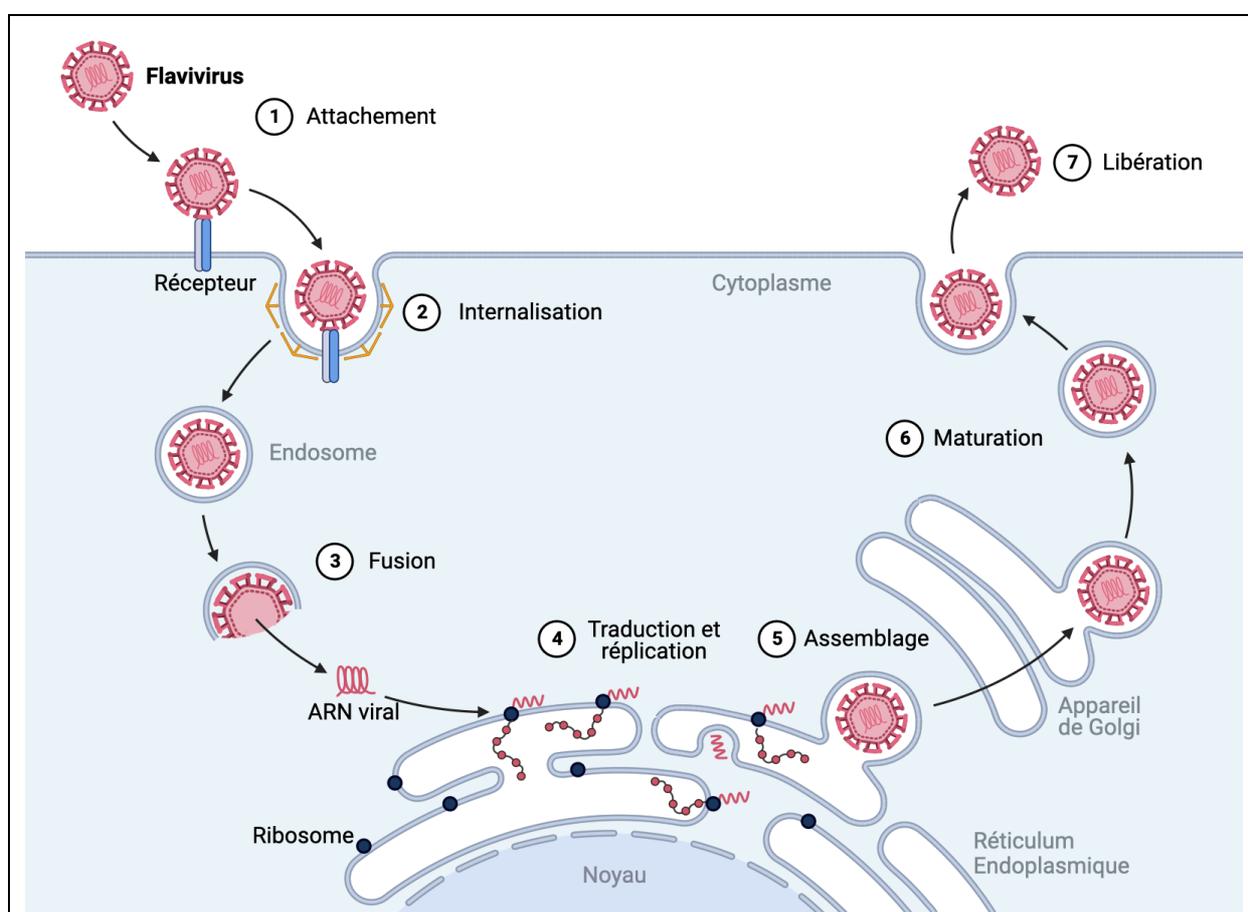
### II.2.3. Particule virale partiellement mature

Le processus de maturation des flavivirus peut être inefficace dans certaines circonstances, et mener à la libération de particules virales partiellement matures par les cellules infectées. Ces particules partiellement matures ne présentent pas de symétrie icosaédrique et partagent à la fois des caractéristiques structurales avec les particules virales matures et immatures. Elles présentent un mélange de morphologies dites lisses et épineuses, correspondant à une mosaïque d'arrangements des protéines d'enveloppe E à la surface de la particule virale (Cherrier et al. 2009, Junjhon et al. 2010, Plevka et al. 2011). Ces particules partiellement matures semblent également participer au processus infectieux (Rodenhuis-Zybert et al. 2010, Meertens et al. 2012). La présence de protéine prM dans les régions immatures de la particule peut altérer l'efficacité de la fusion, mais celle-ci peut toujours avoir lieu par des changements conformationnels des protéines E dans les régions matures toujours présentes à la surface de la particule virale.

Outre les particules virales, les cellules infectées par les flavivirus peuvent également libérer des pseudo-particules virales (Lindenbach et al. 2007). Des petites particules non infectieuses d'environ 30 nm de diamètre qui se forment à partir des protéines M et E mais qui ne contiennent ni protéines de capsid (C), ni de matériel génétique. Ces pseudo-particules virales sont d'excellents immunogènes et ne sont pas infectieux étant dépourvues de capsid et d'ARN viral (Schalich et al. 1996, Ferlenghi et al. 2001).

### II.3. Cycle de réplication des flavivirus

Dans leur grande majorité les flavivirus partagent une stratégie de réplication similaire. Le cycle de réplication se compose de plusieurs étapes : l'entrée, la réplication, l'assemblage et la libération des particules virales (**Figure 9**). À chacune de ces étapes, les flavivirus dépendent entièrement de la machinerie cellulaire pour accomplir les fonctions nécessaires. La taille limitée du génome des flavivirus les oblige à maximiser les fonctions de chaque protéine. La réplication dépend donc grandement des interactions entre les protéines virales et les protéines de l'hôte pour manipuler leur biologie par des mécanismes directs et indirects (Fishburn et al. 2022).



**Figure 9 : Cycle de réplication des flavivirus**

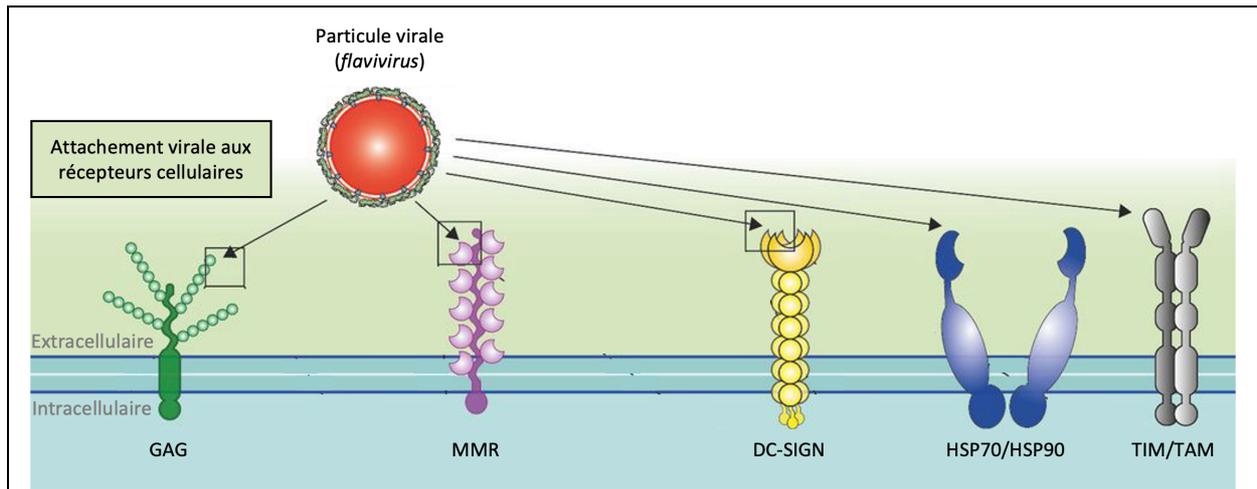
Représentation schématique des différentes étapes du cycle de réplication virale chez les flavivirus : **(1)** L'attachement de la particule virale à un récepteur spécifique de la membrane cellulaire ; **(2)** L'internalisation de la particule virale par endocytose médiée par la clathrine ; **(3)** La fusion des membranes virale et endosomale, et libération de l'ARN viral dans le cytoplasme cellulaire ; **(4)** La traduction et la réplication de l'ARN viral au sein du réticulum endoplasmique ; **(5)** L'assemblage de la particule virale ; **(6)** La maturation de la particule virale au sein de l'appareil de Golgi et de la voie de sécrétion cellulaire ; **(7)** Libération de la progénie virale dans le milieu extracellulaire. *Figure adaptée de (Ona 2021).*

### II.3.1. Entrée virale

#### II.3.1.1. Attachement

Le cycle de réplication des flavivirus débute par l'entrée de la particule virale dans la cellule hôte. Cette étape nécessite l'interaction et la reconnaissance de la particule virale par des récepteurs et facteurs d'attachement exprimés à la surface de la membrane cellulaire (S. Y. Kim et al. 2017). Ce processus requiert une première phase au cours de laquelle les particules virales interagissent avec les facteurs d'attachement qui vont permettre leur rétention et leur rapprochement à la surface de la membrane cellulaire. Ceci facilite dans une seconde phase, l'interaction des particules virales aux récepteurs spécifiques permettant leur internalisation au sein de la cellule hôte (Grove & Marsh 2011, Cruz-Oliveira et al. 2015).

Les récepteurs d'entrée spécifiques nécessaires à l'internalisation des différents membres des flavivirus n'ont pas encore été clairement identifiés (Hidari & Suzuki 2011). Cependant plusieurs marqueurs de surface cellulaire ont été proposés comme des facteurs d'attachement potentiels, décrits comme jouant un rôle important dans l'étape d'entrée des flavivirus (**Figure 10**) (Cruz-Oliveira et al. 2015). On peut citer : **1**) Les facteurs d'attachement de faible affinité, tels que les glycosaminoglycanes (GAG) possédant une charge négative comme les héparanes sulfates (Chen et al. 1997, Reyes-del Valle et al. 2014). **2**) Les facteurs d'attachement induits par le stress, tels que les protéines chaperonnes HSP-90, HSP-70 (Heat shock protein) et GRP-78 (Glucose-regulated protein) (Jindadamrongwech et al. 2004, Reyes-del Valle et al. 2005). **3**) Les récepteurs de reconnaissance de pathogènes exprimés par les cellules de l'immunité innée, tels que DC-SIGN (Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), L-SIGN (Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin), et les MMR (Macrophage mannose receptor) (Navarro-Sanchez et al. 2003, Miller et al. 2008). **4**) Les récepteurs transmembranaires de la famille des TIM (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain) et TAM (Tyro3, Axl et Mer), qui reconnaissent les lipides membranaires de la particule virale (Meertens et al. 2012). **5**) Des récepteurs de haute affinité aux laminines des cellules hépatiques, le récepteur aux lipopolysaccharides CD14 des cellules dendritiques, ou la protéine transmembranaire claudine-1 qui jouerait le rôle de cofacteur d'entrée pour les particules virales immatures ou partiellement matures par reconnaissance de la protéine prM.



**Figure 10 : Récepteurs et facteurs d'attachement des flavivirus**

Représentation schématique des composants de la surface cellulaire impliqués dans les étapes d'entrée et d'attachement des flavivirus : Glycosaminoglycane (GAG), Macrophage mannose receptor (MMR), DC-SIGN, HSP90/HSP70 et TIM/TAM. *Figure adaptée de (Cruz-Oliveira et al. 2015).*

Les interactions individuelles avec des récepteurs cellulaires sont généralement faibles. Le contact de la particule virale avec plusieurs récepteurs semble favorisé, augmentant l'interaction du virus à la surface cellulaire (Mercer et al. 2010). Les flavivirus utilisent donc un large éventail de récepteurs et facteurs d'attachement qui diffèrent selon le type cellulaire et l'espèce hôte (Perera-Lecoin et al. 2013, Laureti et al. 2018). Cela participe à la grande capacité d'adaptation et au tropisme étendu de ces virus lors de l'infection, expliquant en partie l'importante diversité de symptômes possibles des maladies à flavivirus.

### *II.3.1.2. Internalisation*

L'attachement de la particule virale à un récepteur d'entrée spécifique va engendrer son internalisation au sein de la cellule hôte par endocytose. La particule virale va atteindre le cytoplasme cellulaire dans une vésicule résultante appelée endosome. L'endocytose médiée par la clathrine est considérée comme le principal mécanisme d'entrée des flavivirus dans les cellules (Van Der Schaar et al. 2008, Acosta et al. 2009). Cependant il a été démontré que les flavivirus peuvent également exploiter d'autres voies d'endocytose qui peuvent être dépendantes ou indépendantes de la clathrine ou de la cavéoline (Boulant et al. 2015, Hackett & Cherry 2018, Laureti et al. 2018, Li et al. 2020).

### *II.3.1.3. Fusion*

La maturation de l'endosome lors de son transport dans le cytoplasme cellulaire est caractérisée par une diminution du pH qui va entraîner une acidification progressive à l'intérieur de la vésicule endosomale. Cette acidification va provoquer un changement conformationnel irréversible des protéines virales de membrane M et d'enveloppe E (Smit et al. 2011). Les dimères de la protéine E vont se dissocier pour former des trimères et exposer à la surface de la particule virale les boucles de fusion qui sont présentes dans le domaine II de l'ectodomaine de la protéine E. Ces boucles de fusion sont des régions hydrophobes qui vont s'enchâsser et se replier dans la membrane lipidique de l'endosome et déclencher la fusion des membranes virales et cellulaires (Kaufmann & Rossmann 2011, Pierson & Kielian 2013, Van Vlack & Seeliger 2018). La fusion des deux membranes va permettre la libération du complexe nucléocapsidique dans le cytoplasme cellulaire (Hamel et al. 2015). Le génome viral est alors dissocié de la capsidie et libéré dans le cytoplasme de l'hôte par un processus de décapsidation (Mendes et al. 2012).

### *II.3.2. Traduction et réplication virale*

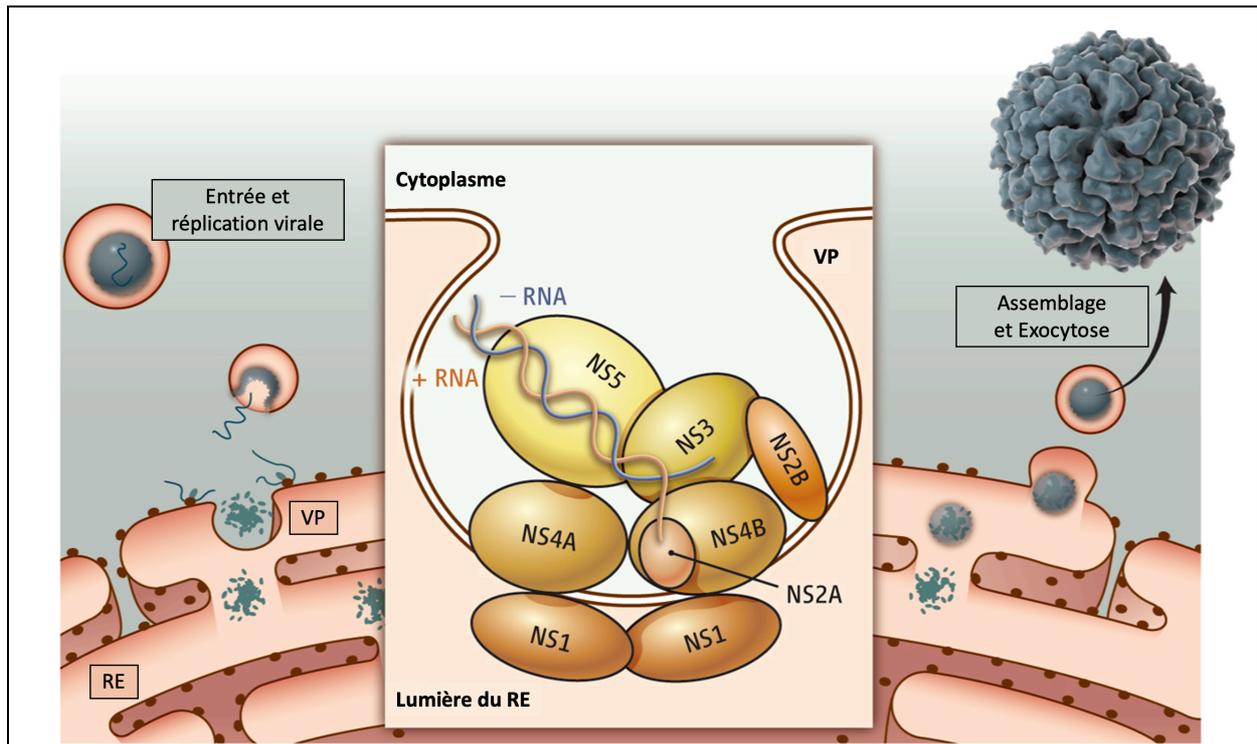
Le génome viral est alors accessible et reconnu tel un ARN messager (ARNm) par la machinerie cellulaire. L'ARN génomique virale, qui est de polarité positive et coiffé en 5', va être directement traduit par les ribosomes du réticulum endoplasmique granuleux (REG). La traduction du génome virale par ces ribosomes cellulaires produit une polyprotéine d'environ 3400 acides aminés qui sera ancrée dans la membrane du RE. Cette polyprotéine va subir des traitements co- et post-traductionnels par des protéases virales et cellulaires : la protéase/hélicase NS3 du côté cytoplasmique et des peptidases cellulaires au niveau de la lumière du RE (Roby et al. 2015). La polyprotéine va alors être clivée en 10 protéines virales qui se regroupent en trois protéines structurales, capsidie (C), précurseur de membrane (prM), enveloppe (E) et sept protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). Après clivage de la polyprotéine, les protéines C, NS2A, NS2B, NS4A et NS4B se retrouveront ancrées au sein des membranes du RE. Les protéines prM et E seront transloquées dans la lumière du RE puis dans le réseau trans-golgien, où elles subiront des glycosylations, première étape de leur maturation qui permettra leur assemblage en hétérodimères. Enfin, les protéines NS3 et NS5 seront cytosoliques, et pourront être recrutées pour la formation des complexes de réplication.

### *II.3.2.1. Formation des complexes de réplication*

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'organelle où se réalise la réplication virale. Les protéines non structurales s'associent entre elles afin de former des complexes de réplication (CR), qui correspondent à un réseau protéique provoquant des altérations et des invaginations au sein des membranes du RE (Welsch et al. 2009, Gillespie et al. 2010, Van Den Elsen et al. 2021). Ces invaginations rassemblent les facteurs cellulaires et viraux indispensables à la réplication virale, tout en protégeant ces derniers des senseurs cytosoliques de l'immunité innée et des nucléases cytosoliques (Morrison et al. 2012). On retrouve principalement deux types d'altérations au sein des membranes du RE : **1)** Les circonvolutions membranaires (CMs, de l'anglais *Convolute*d membranes) qui constituent le lieu de traduction de l'ARN viral en polyprotéine. Les CMs représenteraient des sites de stockage de lipides et de protéines virales qui seraient essentiels à la réplication du virus. **2)** Les paquets vésiculaires (VPs, de l'anglais *Vesicle packets*) qui forment des structures membranaires hautement organisées renfermant la machinerie de réplication virale (**Figure 11**). Les protéines NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 sont regroupées à l'intérieur des VPs et la protéine NS1 forme des dimères dans la lumière du RE de l'autre côté de la membrane. Les VPs sont connectées au cytoplasme cellulaire via un système de pore qui permettra le recrutement des protéines NS3 et NS5 afin d'initier la réplication virale.

### *II.3.2.2. Réplication virale*

Les complexes de réplication permettent de répliquer l'ARN génomique virale grâce à l'activité ARN polymérase ARN-dépendant de la protéine NS5 et l'activité hélicase de la protéine NS3. L'initiation de la réplication débute par l'interaction des régions complémentaires hautement structurées 5' et 3' UTR de l'ARN viral. Cette interaction induit la circularisation du génome viral, permettant le recrutement de la polymérase NS5 et la synthèse d'un brin complémentaire au brin d'ARN matrice de polarité négative (Khromykh et al. 2001, Yu & Markoff 2005). Cela forme alors une molécule transitoire d'ARN à double brin (Clyde et al. 2006). Au cours de ce processus de réplication asymétrique et semi-conservatif, plus de 90% des brins d'ARN synthétisés seront de polarité positive (Klema et al. 2015). Le brin d'ARN de polarité négative ne représentant qu'un intermédiaire réplcatif, et servant de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN viraux.



**Figure 11 : Complexe de réplication des flavivirus**

Représentation schématique du complexe de réplication virale des flavivirus. Sept protéines non-structurales, ainsi que des protéines hôtes (non représentées), forment ensemble le complexe de réplication. La réplication de l'ARN viral a lieu à l'intérieur d'invaginations des membranes du réticulum endoplasmique (RE), appelées paquets vésiculaires (VPs). *Figure adaptée de (Shi 2014).*

Durant la réplication, l'ARN génomique viral de polarité positive nouvellement synthétisé sera pris en charge par les protéines NS3 et NS5. Une coiffe de 7-méthylguanosine de type I sera synthétisé à l'extrémité 5' du génome viral (m7GpppAmp), grâce aux activités méthyltransférase et guanylyltransférase de la protéine NS5 et à l'activité triphosphatase de la protéine NS3 (Zhou et al. 2007, Saeedi & Geiss 2013).

### II.3.3. Assemblage et morphogenèse de la particule virale

L'assemblage et la morphogenèse des particules virales des flavivirus débutent au sein des membranes du RE, dans des saccules qui sont localisées à proximité des paquets vésiculaires (VPs) (**Figure 12**). Les premières étapes de l'assemblage s'effectuent de façon concomitante à la réplication virale qui se déroule au niveau des VPs (Chatel-Chaix & Bartenschlager 2014). Les protéines de capsides nouvellement synthétisées sont recrutées et s'associent à l'ARN viral pour former la nucléocapside.

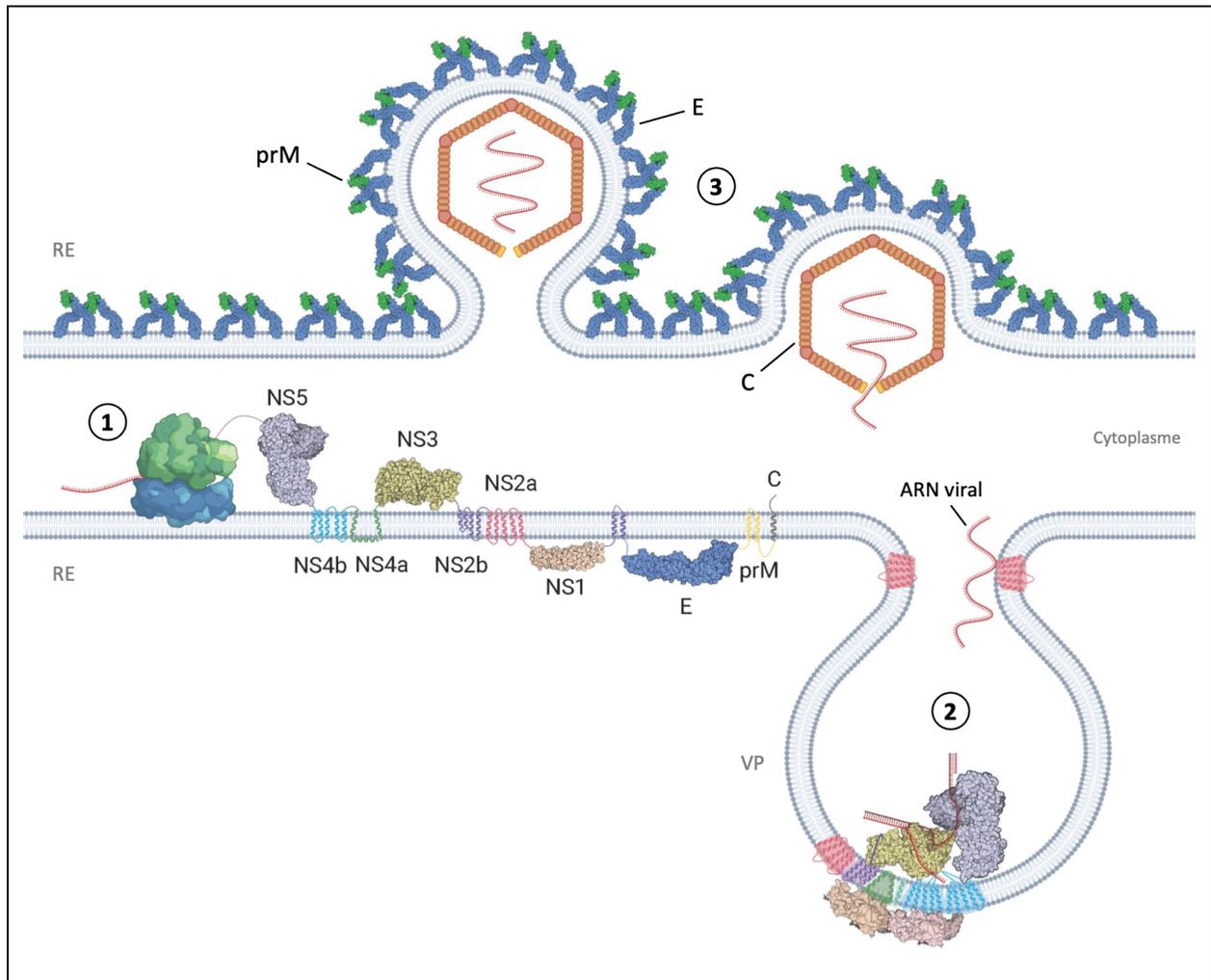
Parallèlement, les protéines prM et E s'associent sous forme d'hétérodimères enchâssées au sein des membranes du RE. La nucléocapside va alors bourgeonner dans la lumière du RE et acquérir l'enveloppe lipidique virale où se trouvent ancrées les protéines prM et E (Zhang 2003, Tan et al. 2020). Les particules virales immatures ainsi formées, sont adressées au réseau de l'appareil de Golgi et à la voie de sécrétion cellulaire pour achever leur maturation.

#### *II.3.3.1. Maturation de la particule virale*

Au cours des étapes de maturation, les particules virales immatures vont subir diverses modifications dont le clivage de la protéine précurseur de membrane prM, la N-glycosylation et l'ubiquitylation de la protéine d'enveloppe E (Mackenzie & Westaway 2001, Carbaugh & Lazear 2020, Giraldo et al. 2020). La migration des particules virales immatures au sein de la voie de sécrétion cellulaire va induire un réarrangement des glycoprotéines prM et E (I.-M. Yu et al. 2008). Au sein des endosomes tardifs, la diminution du pH va permettre l'exposition du site de clivage de la protéine prM, le rendant accessible aux protéases furines cellulaires. La protéine prM sera alors clivée en deux sous-unités « pr » et « M », rendant le peptide de fusion de la protéine E inaccessible à la membrane endosomale et empêchant toute étape de fusion précoce des particules virales immatures (Mukhopadhyay et al. 2005, Li et al. 2008). La sous-unité « pr » sera libérée dans le milieu extracellulaire lors de la libération des particules virales mettant fin au processus de maturation (Yu et al. 2009).

#### *II.3.3.2. Libération de la particule virale*

Une fois le processus de maturation terminé, les particules virales devenues matures seront libérées dans le milieu extracellulaire pour former la nouvelle progénie virale (Pierson & Diamond 2013). La sortie des particules virales se faisant par exocytose n'est généralement pas lytique dans la plupart des types cellulaires. Les mécanismes impliqués dans cette libération n'ont cependant pas encore été totalement élucidés. Il est intéressant de noter, que l'infection par les flavivirus est connue pour produire un mélange de particules matures, immatures et partiellement matures. Il arrive donc parfois que le cycle de réplication viral ne soit pas réalisé ou soit incomplet, menant à la génération d'une population virale hétérogène qui présente un ensemble d'épitopes très varié au système immunitaire (Sirohi & Kuhn 2017)



**Figure 12 : Étapes de traduction, de réplication et d'assemblage des flavivirus**

Représentation schématique : (1) de la protéine virale traduite, (2) du complexe de réplication et (3) du mécanisme d'assemblage viral des flavivirus. La traduction s'effectue au niveau de la membrane du RE et génère une polyprotéine qui sera clivée en trois protéines structurales (C, prM et E) et sept protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). La réplication de l'ARN viral a lieu à l'intérieur d'invaginations de la membrane du RE, appelées paquets vésiculaires (VPs). L'ARN viral nouvellement synthétisé sert de modèle pour la traduction, la poursuite de la réplication, et l'assemblage de nouvelles particules virales. L'assemblage a lieu dans des saccules qui sont localisées à proximité des VPs. *Figure adaptée de (Van Den Elsen et al. 2021).*

### III. Les flavivirus – Zika et Dengue

#### III.1. Découvertes et historiques des grandes épidémies

##### III.1.1. Découverte, émergence et historique du virus Zika (ZIKV)

En 1947, le virus Zika (ZIKV) a été isolé pour la première fois à partir d'un singe rhésus prélevé dans la forêt Zika de Kampala, en Ouganda (Dick et al. 1952). Un an plus tard, le virus fut isolé chez des moustiques du genre *Aedes* provenant de la même région, suivi du premier isolement humain en 1953 au Nigéria (MacNamara 1954). Les années 1950 à 1980 ont vu des enquêtes de séro-surveillance révéler la présence étendue de ZIKV dans divers pays d'Afrique et d'Asie (Weaver et al. 2016). Au cours des soixante années qui ont suivi sa découverte, ZIKV est demeuré confiné dans ses deux continents se manifestant uniquement sous la forme de cas sporadiques.

En 2007, l'île de Yap, située dans les États fédérés de Micronésie dans l'ouest de l'océan Pacifique a été le théâtre de la première grande épidémie de ZIKV. Cette flambée épidémique a touché environ 73% de la population totale de l'île, soit environ 8000 personnes infectées (Duffy et al. 2009). Néanmoins, seul des symptômes légers et de courte durée ont été signalés à l'époque.

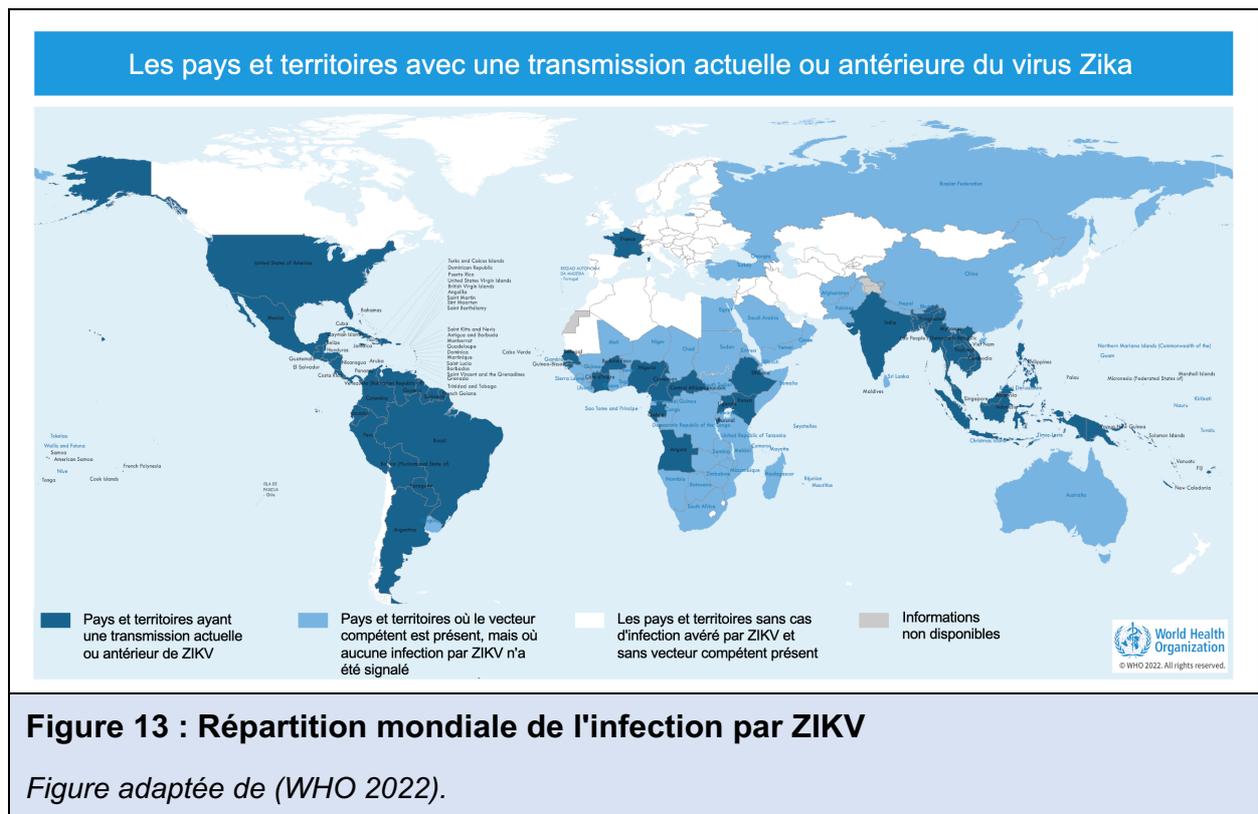
En 2013, la propagation de ZIKV s'est étendue à travers l'océan Pacifique, déclenchant une épidémie au sein de la Polynésie française. Au cours de cette épidémie, plus de 11% de la population totale a été touchée par l'infection aboutissant à plus de 30.000 cas symptomatiques recensés et l'apparition de complications graves chez les individus infectés (Cao-Lormeau et al. 2014, Musso et al. 2018). Parmi ces complications, certaines ont notamment été associées à des troubles neurologiques tels que le syndrome de Guillain-Barré chez l'adulte et des malformations congénitales chez les nouveau-nés de mères infectées (Oehler et al. 2014). Des épisodes similaires ont par la suite été signalés sur d'autres îles du Pacifique (Musso et al. 2014).

En 2015, le Brésil a été le théâtre de la plus vaste épidémie de ZIKV jamais enregistrée, atteignant des proportions pandémiques avec 440.000 à 1.300.000 cas d'infection présumés au cours d'une année. Cette flambée épidémique a été étroitement associée à l'émergence de complications chez les nouveau-nés, ultérieurement désignées sous le nom de « Syndrome Congénital à virus Zika (SCZ) », avec plus de 3700 cas signalés (Musso et al. 2019).

## - LES FLAVIVIRUS ZIKA ET DENGUE -

En Février 2016, l'OMS pris la décision d'élever le niveau d'alerte en déclarant Zika comme une urgence de santé publique de portée internationale (Gulland 2016). À la suite de cette déclaration, la communauté scientifique s'est mobilisée pour concentrer ses efforts sur la compréhension de la maladie et ses origines, dans le but d'accélérer le développement de nouveaux vaccins et antiviraux contre ZIKV.

Aujourd'hui, la transmission de ZIKV a considérablement diminué, toutefois elle persiste en continuant à évoluer discrètement à travers le monde, se manifestant majoritairement sous la forme d'infection asymptomatique (Duong et al. 2017, Ruchusatsawat et al. 2019). En juillet 2019, pas moins de 87 pays et territoires d'Afrique, d'Asie, des Amériques et du Pacifique ont rapporté la présence de ZIKV (**Figure 13**). Jusqu'en 2019, la transmission autochtone de ZIKV par son vecteur n'avait jamais été signalée en Europe, même si plus de 2300 cas importés avaient été recensés entre 2015 et 2017 (Wilder-Smith et al. 2018). Les premières infections acquises localement ont été signalées à l'automne 2019 dans le sud de la France.



### III.1.2. Découverte, émergence et historique du virus de la Dengue (DENV)

Les premières descriptions qui correspondent aux symptômes cliniques de la dengue ont été documentées dans une encyclopédie chinoise datant de la période allant de 265 à 992 après J.-C (Gubler 1998). À cette époque, la dengue était désignée sous le nom de « poison de l'eau » et était associée aux insectes volants, suggérant une compréhension ancienne des facteurs de transmission associés à la maladie (Guzman & Istúriz 2010). L'étymologie du mot « Dengue » trouve son origine probable dans le terme swahili « Ki denga pepo » qui signifie littéralement : crampes soudaines causées par un esprit maléfique. Au fil du temps, le terme évolua pour devenir « Dengue » dans le langage médical pour désigner la maladie causée par le virus de la dengue (DENV) (McSherry 1993).

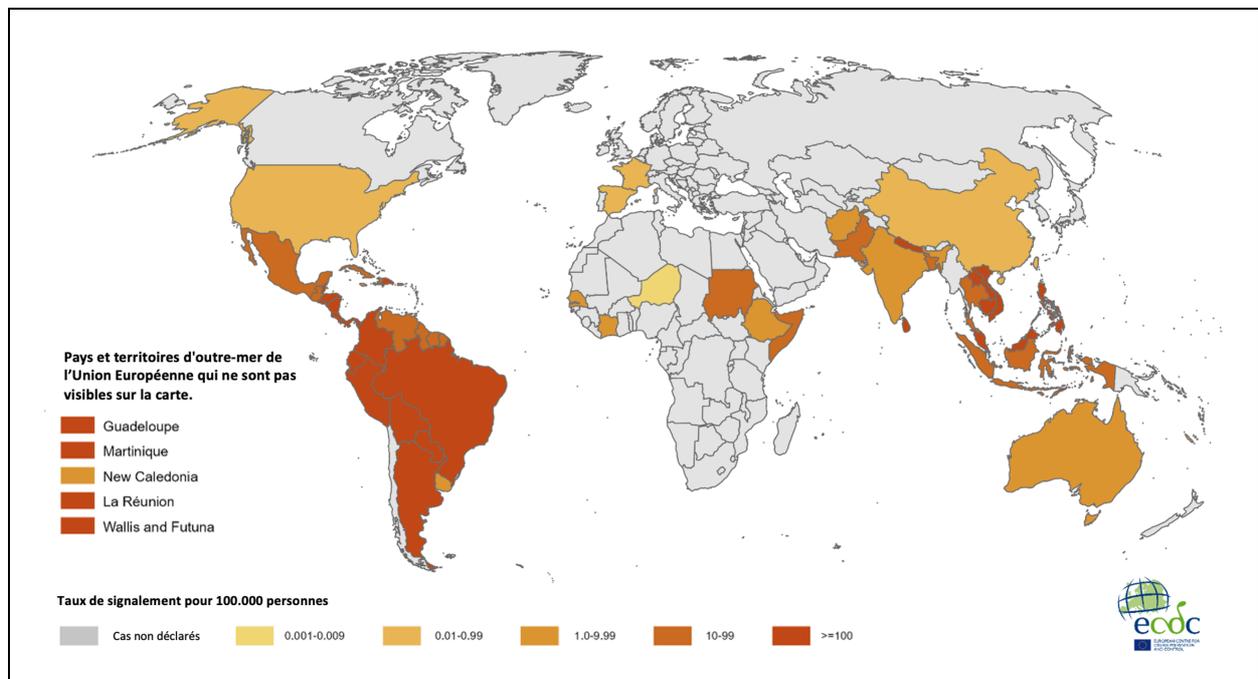
Au cours du XVIIIe siècle, les premières épidémies de dengue ont été enregistrées en Amérique centrale, puis en Afrique, en Asie, et en Amérique du Nord (Gubler & Clark 1995). Les premières épidémies avérées ayant lieu en 1779 à Jakarta (Indonésie) et au Caire (Égypte), puis en 1780 à Philadelphie (Amérique du Nord) (Rush 1951). Ce qui donna lieu à la mise en place du premier tableau clinique de la dengue par Benjamin Rush en 1787 (Packard 2016). À l'époque, la propagation de la dengue était intimement liée aux commerces internationaux et aux commerces d'esclaves entre l'Afrique et les Amériques. En Europe, les premiers cas d'infection par DENV ont été décrits en 1784 à Cadix et Séville (Espagne), marquant le début d'épisodes épidémiques brefs mais particulièrement intenses tout au long du XIXe et du XXe siècle (Halstead 1992, Schaffner & Mathis 2014).

En 1903, la transmission de DENV à l'Homme par le vecteur moustique du genre *Aedes* a été établi par Graham et Bancroft (Graham 1902). Cela lança le début des études scientifiques permettant de définir la nature virale de la dengue en 1906 (Holmes & Twiddy 2003). Le virus a été isolé pour la première fois au Japon par Ren Kimura et Susumu Hotta, en 1943. L'isolement s'était alors fait à partir de l'échantillon sanguin d'un patient infecté durant l'épidémie de dengue qui sévissait à Nagasaki, donnant lieu à l'identification du premier sérotype DENV-1 (Hotta 1952). Au cours des années suivantes, les trois autres sérotypes de DENV ont également été isolés. Dans la région du Pacifique pour DENV-2 (Sabin 1952), et lors d'épidémies survenues aux Philippines et en Thaïlande pour DENV-3 et DENV-4 (Hammon et al. 1960).

## - LES FLAVIVIRUS ZIKA ET DENGUE -

Au milieu du XXe siècle, la Seconde Guerre mondiale modifia profondément le profil épidémiologique de la dengue. Les mouvements massifs de populations civiles et les nombreux déploiements de troupes militaires auraient facilité la propagation de la dengue ainsi que son moustique vecteur dans de nombreuses régions qui étaient jusque-là préservées, favorisant ainsi l'émergence de nouvelles épidémies (Gubler 1998). Après-guerre, une urbanisation accrue et incontrôlée favorisa également cette propagation et l'installation d'une endémicité de la dengue à travers diverses régions de la planète (Gubler 2011). La co-circulation de plusieurs sérotypes de la dengue dans ces régions entraîna l'apparition de formes hémorragiques de la maladie qui ont été décrites pour la première fois aux Philippines en 1953 (Hammon et al. 1960).

Au cours des cinquante dernières années, l'incidence de la dengue a augmenté de manière spectaculaire, se multipliant par 30 (Stanaway et al. 2016). De nos jours, DENV se propage à l'échelle mondiale infectant des individus dans plus de 125 pays chaque année et exposant environ 3,6 milliards de personnes à un risque d'infection (Brady et al. 2012). Les épidémies de la dengue surviennent annuellement notamment en Amérique, en Asie, en Afrique et en Australie (**Figure 14**). Ces épidémies se traduisent par environ 400 millions de cas d'infection, incluant 500.000 cas de formes sévères et 22.000 décès chaque année à l'échelle mondiale (Bhatt et al. 2013).

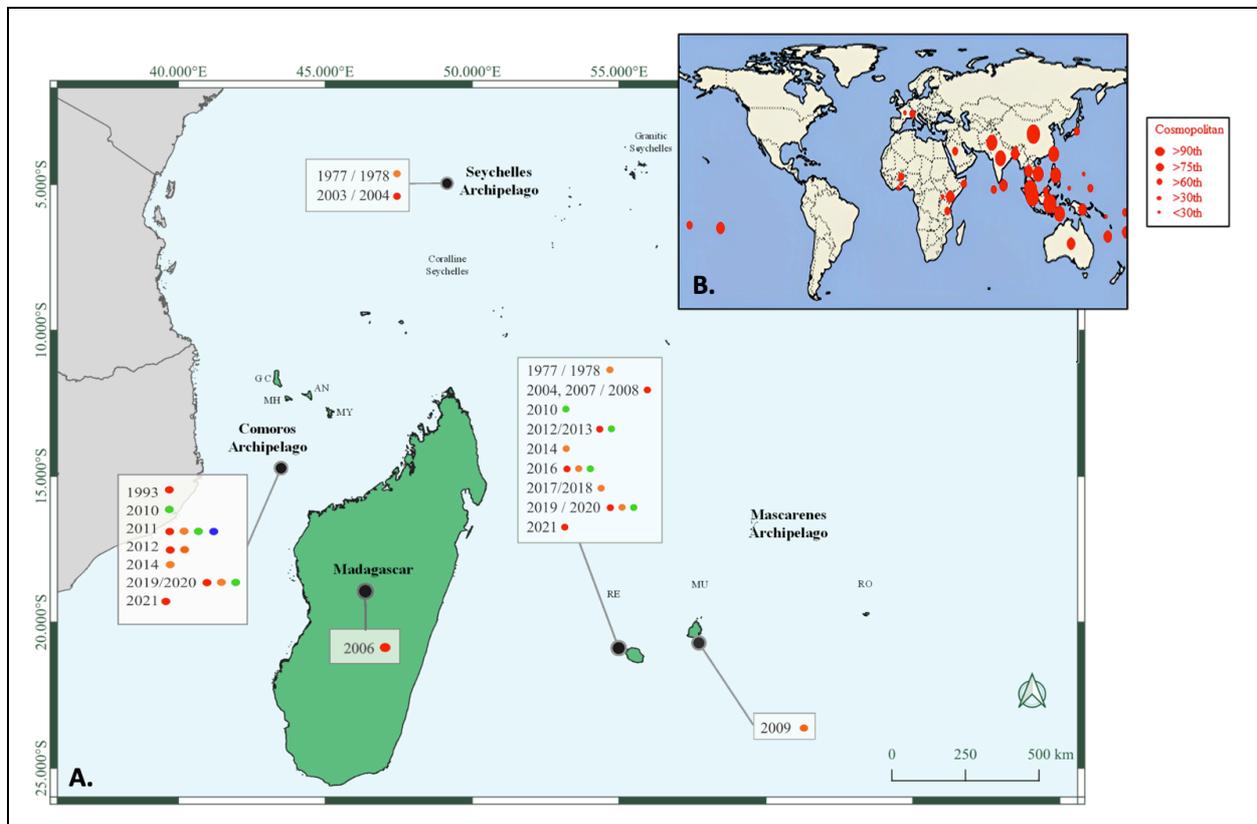


**Figure 14 : Répartition mondiale de l'infection par DENV**

*Figure adaptée de (ECDC 2023).*

### III.1.3. DENV-2 du génotype Cosmopolitan dans l'océan Indien et à La Réunion

Les épidémies de dengue dans les régions tropicales et subtropicales sont principalement associées au sérotype DENV-2 et à la distribution géographique croissante du génotype Cosmopolitan (Yenamandra et al. 2021). Ce génotype possède une grande hétérogénéité génétique pouvant expliquer sa vaste propagation et serait particulièrement pathogène pour l'Homme pouvant entraîner des symptômes sévères même lors d'une primo-infection. Le génotype Cosmopolitan de DENV-2 circule principalement en Asie, en Afrique, au Moyen-Orient, dans les îles du Pacifique, en Amérique du Sud (Yenamandra et al. 2021, Giovanetti et al. 2022), mais celui-ci est récemment devenu un problème majeur de santé publique dans la région sud-ouest de l'océan Indien (SOOI) (Pascalis et al. 2019, Hafsia et al. 2022) (**Figure 15**).



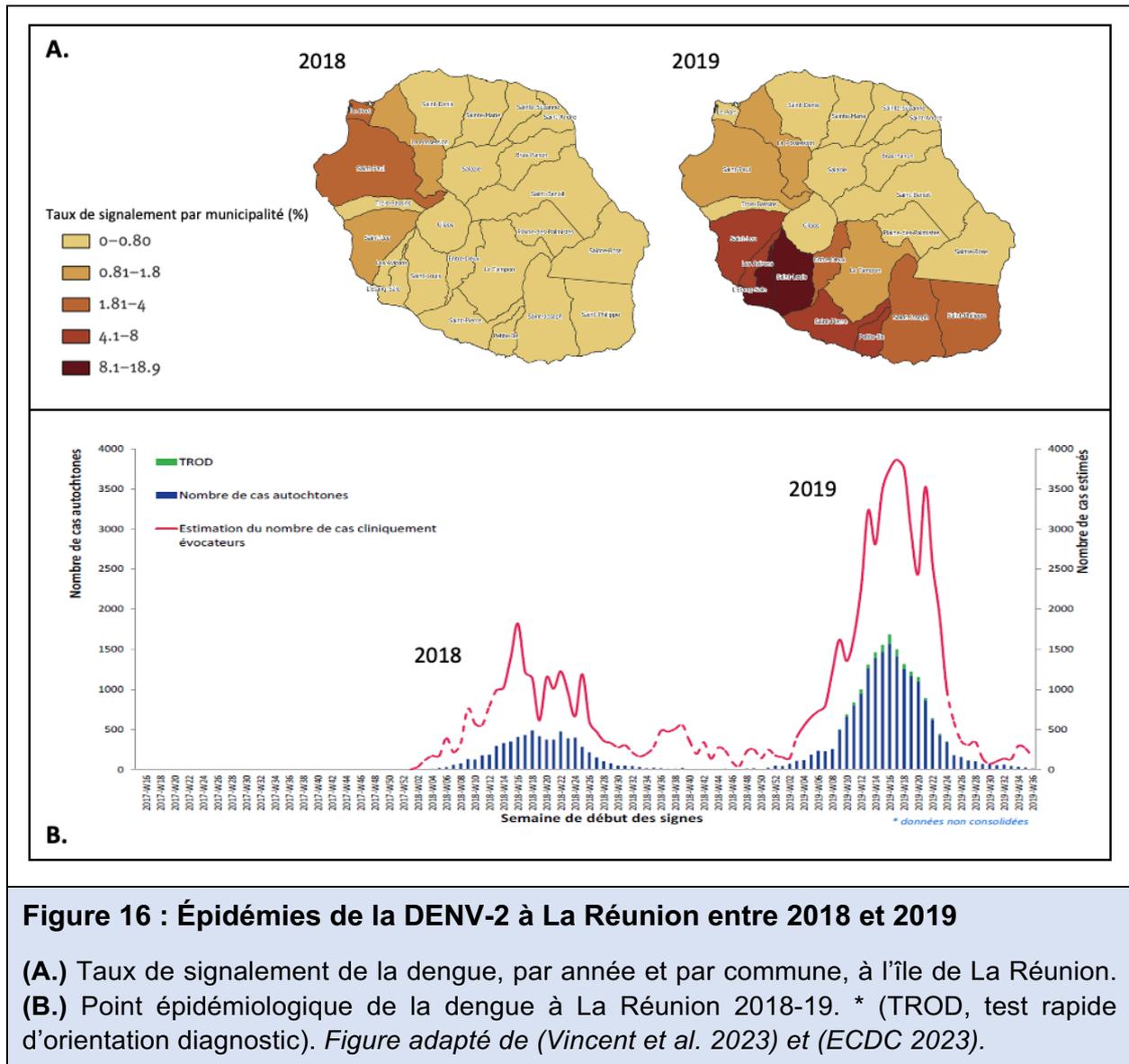
**Figure 15 : Représentation de la région sud-ouest océan Indien (SOOI)**

(A.) Historique des épidémies de DENV dans la région SOOI. Les dates correspondent aux épidémies et les cercles de couleurs aux sérotypes associés (Rouge/DENV-1, Orange/DENV-2, Vert/DENV-3 et Violet/DENV-4). (B.) Distribution spatiale de DENV-2 du génotype Cosmopolitan dans le monde. Le nombre de séquences signalées par pays sont représentées par des cercles de taille différente. *Figure adaptée de (Hafsia et al. 2022) et (Yenamandra et al. 2021).*

La région SOOI est composée de plusieurs pays côtiers d'Afrique de l'Est, tels que le Mozambique et la Tanzanie, et se distingue par la présence de nombreuses îles et archipels, notamment Madagascar, les Seychelles, les Comores, l'île Maurice, et l'île de La Réunion. Cette région est un hub d'activités commerciales et de déplacements humains, par voie maritime et/ou aérienne, entre les territoires qui la composent et plusieurs autres pays d'Afrique de l'Est et d'Asie du Sud-Est où circulent malheureusement des arboviroses telles que la dengue (Hafsia et al. 2022). Par conséquent, les territoires de la région SOOI n'ont pas été épargnés par la propagation de la dengue, avec une circulation active du pathogène et la présence de foyers épidémiques sur de nombreuses îles.

L'île de La Réunion, un département français d'outre-mer, a connu sa première épidémie de dengue depuis près de 40 ans avec l'introduction sur le territoire de la DENV-2 du génotype Cosmopolitan entre 2018 et 2019 (Pascalis et al. 2019). Jusqu'à présent seuls de petits foyers d'infection avaient été sporadiquement enregistrés, principalement en lien avec des cas importés. Au début de l'épidémie de 2018, la population réunionnaise était alors considérée comme naïve et immunologiquement vulnérable face à DENV. En outre, la présence des moustiques vecteurs du genre *Aedes* et des conditions environnementales favorables à leur prolifération, était également propice à l'introduction et la mise en place d'une endémicité de la dengue à La Réunion (Vincent et al. 2023).

Entre 2018 et 2019, l'île de La Réunion a donc connu une épidémie de dengue avec près de 25.000 cas d'infection confirmés sur une population de 875.000 habitants (Santé Publique France 2021) (**Figure 16**). Au cours de cette épidémie, il a été enregistré un total de 2400 passages aux urgences, 773 hospitalisations dont 79 cas de dengue sévère et 20 décès directement lié à la dengue. L'année 2020, marqua la fin de l'épidémie causée par l'unique sérotype DENV-2 de génotype Cosmopolitan avec l'introduction ultérieure des sérotypes DENV-1 et DENV-3 au cours des années suivantes (Hafsia et al. 2022).



**Figure 16 : Épidémies de la DENV-2 à La Réunion entre 2018 et 2019**

(A.) Taux de signalement de la dengue, par année et par commune, à l’île de La Réunion. (B.) Point épidémiologique de la dengue à La Réunion 2018-19. \* (TROD, test rapide d’orientation diagnostic). *Figure adaptée de (Vincent et al. 2023) et (ECDC 2023).*

Les analyses épidémiologiques et phylogénétiques des souches de DENV-2 circulants dans la région SOOI ont révélé que les échantillons de DENV-2 prélevés à La Réunion en 2018 ainsi qu’aux Seychelles en 2016 appartiennent au génotype Cosmopolitan et à la sous-lignée C1-B (Pascalis et al. 2020). En revanche les échantillons de DENV-2 prélevés à Dar Es Salaam en 2014 sont rattachés à la sous-lignée C2 (Vairo et al. 2016). Cette co-circulation active de différentes sous-lignées de DENV-2 de génotype Cosmopolitan dans la région SOOI semble être liée à d’éventuelles introductions antérieures de la dengue en provenance d’Inde, du Pakistan et de la Chine (Pascalis et al. 2020). De nos jours, peu d’informations sont disponibles sur les caractéristiques biologiques des souches DENV-2 de génotype Cosmopolitan qui circulent dans la région SOOI (Ogire et al. 2021, Ogire et al. 2023).

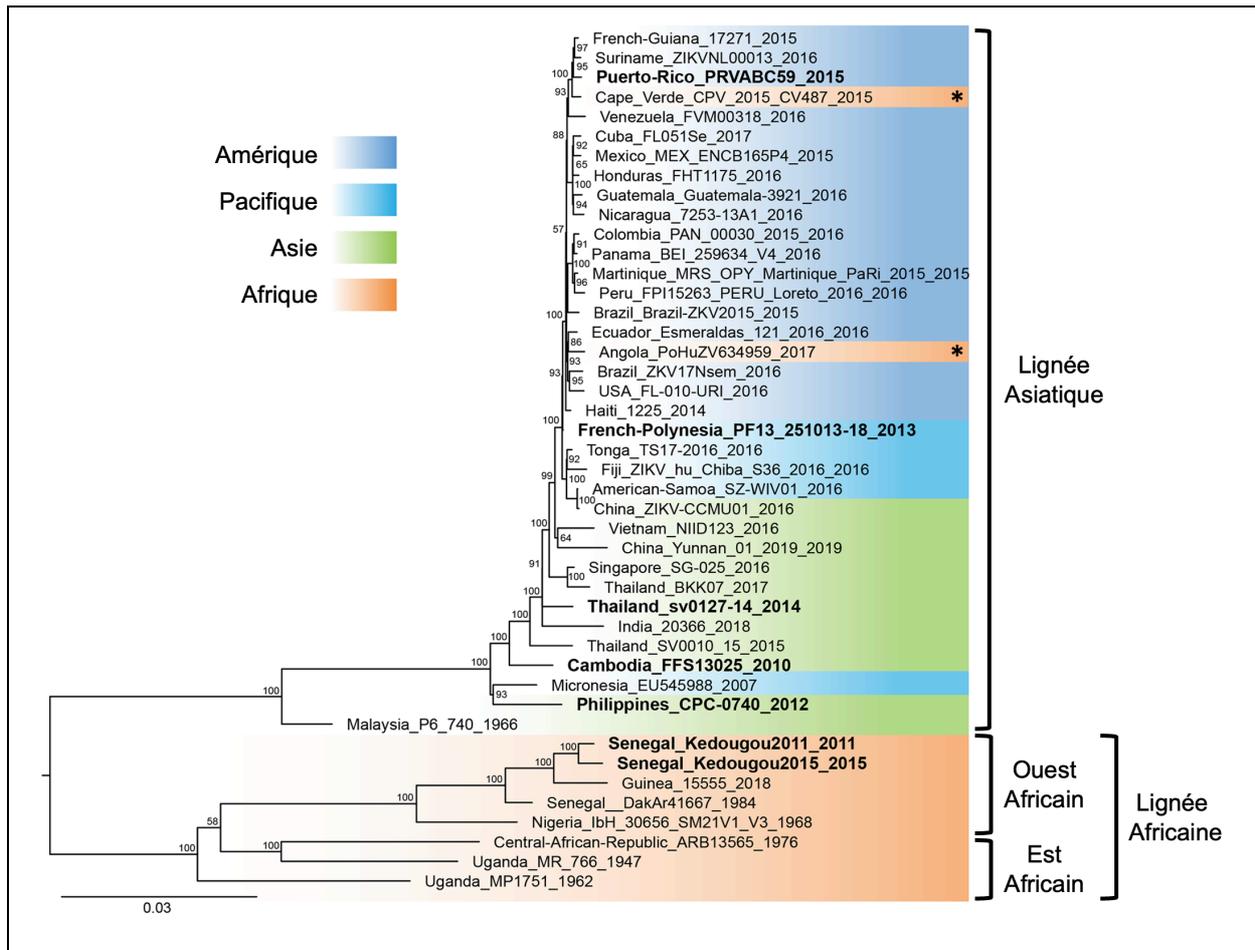
## III.2. Phylogénie des flavivirus : ZIKV et DENV

### III.2.1. Phylogénie de ZIKV

ZIKV est catégorisé en deux lignées génétiques distinctes : la lignée africaine qui se divise en deux génotypes (est africain et ouest africain) et la lignée asiatique (Faye et al. 2014). En Afrique, la lignée africaine persiste principalement dans un cycle sylvatique impliquant des moustiques et singes indigènes, avec seulement quelques cas sporadiques d'infection chez l'Homme. À l'inverse, la lignée asiatique englobe pratiquement toutes les souches épidémiques de ZIKV qui sont associés à l'apparition de symptômes sévères chez les individus infectés (Haddow et al. 2012). Ces lignées africaine et asiatique présentent des différences de transmissibilité et de pathogénicité pouvant expliquer leur diversité phénotypique (Simonin et al. 2017) (**Figure 17**).

Les analyses phylogénétiques des souches de ZIKV ont mis en évidence des changements d'acides aminés survenues lors de son émergence d'Afrique et sa propagation progressive en Asie. Ces changements d'acides aminés sont conservés dans les souches épidémiques de ZIKV, ce qui a vraisemblablement favorisé une adaptation à l'Homme et une virulence accrue. La divergence génétique entre ces lignées reste toutefois relativement faible, avec moins de 12% de divergence au niveau nucléotidique (Haddow et al. 2012). Ces variations génétiques se sont produites sur l'intégralité du génome viral, les protéines structurales étant néanmoins soumises à un taux de substitution d'acides aminés plus élevé. Celles-ci présentent des changements génétiques notables affectant les protéines prM et E de ZIKV, entraînant des différences de structure de la particule virale (Bos et al. 2018, Li et al. 2019).

Toutes les souches épidémiques de ZIKV contiennent un site de N-glycosylation dans la protéine E (Carbaugh et al. 2019). La découverte de cette glycosylation a suscité l'intérêt de la communauté scientifique en raison de son impact sur la pathogénicité et le potentiel épidémique des souches contemporaines de ZIKV. Les études récentes menées sur les souches contemporaines de la lignée africaine mettent en évidence un potentiel épidémique élevé. Ces souches présentent une transmissibilité accrue chez les moustiques et une létalité plus élevée chez les souris en comparaison aux souches asiatiques (Aubry et al. 2021). La récente détection de souches africaines de ZIKV au Brésil suscite des inquiétudes quant à la possibilité de nouvelle flambée épidémique qui serait fortement préjudiciable (De Matos et al. 2021).



**Figure 17 : Arbre phylogénétique du virus Zika**

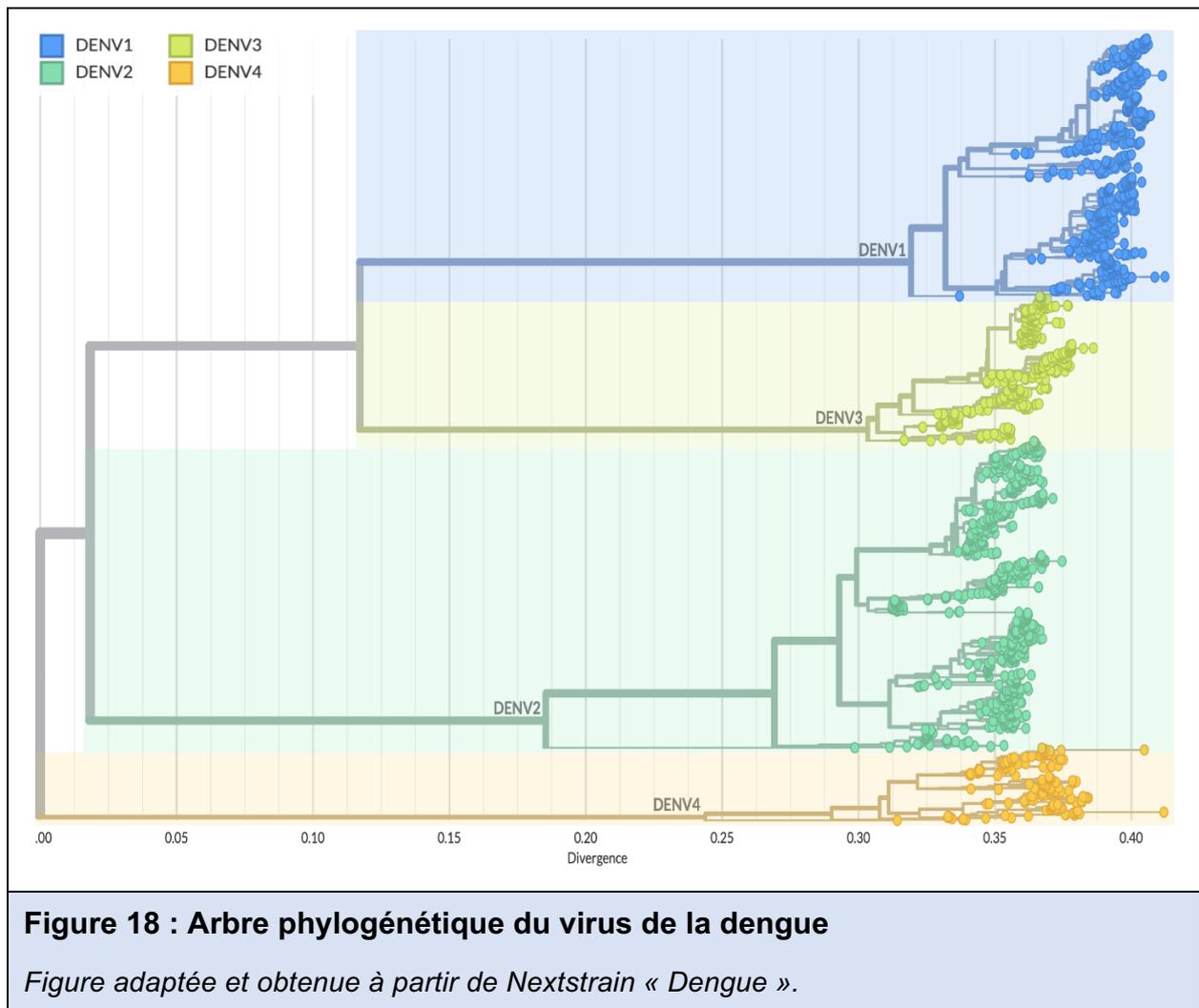
Illustration représentant un arbre phylogénétique consensuel, obtenu en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance à partir de 1000 arbres répliqués par Bootstrap ultra-rapide. Le fond coloré représentant l'origine géographique des souches de ZIKV. Indiqué par le symbole « \* » : Souche de la lignée asiatique indépendamment importée du Brésil. *Figure adaptée de (Aubry et al. 2021).*

### III.2.2. Phylogénie de DENV

DENV se distingue par sa classification en quatre sérotypes génétiquement apparentés mais antigéniquement distincts : DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4. Les sérotypes ont été identifiés par des tests sérologiques montrant une réactivité croisée limitée et sont nommés en fonction de la chronologie de leur découverte (**Figure 18**). L'analyse moléculaire des quatre sérotypes de DENV a mis en évidence une homologie d'acides aminés allant de 60 à 80 % entre chaque sérotype (Holmes & Twiddy 2003). Cette proximité génétique leur permet d'être étroitement apparentés tout en étant suffisamment différents pour déclencher une réponse immunitaire spécifique et efficace à l'égard du sérotype impliqué dans l'infection.

## - LES FLAVIVIRUS ZIKA ET DENGUE -

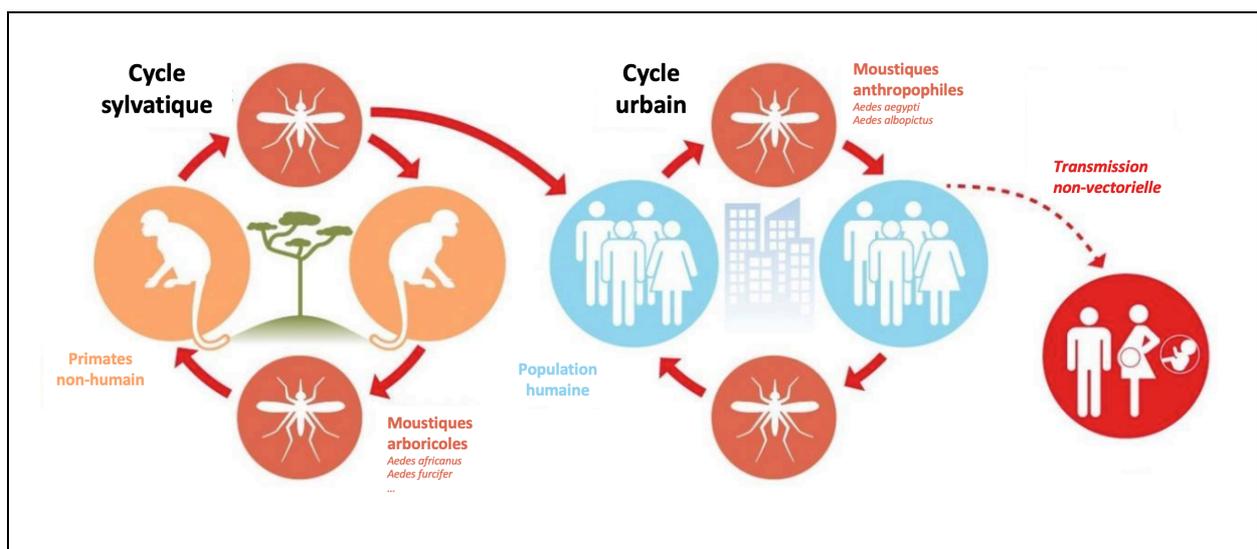
Des analyses phylogénétiques complémentaires ont également révélé l'existence de plusieurs génotypes au sein même de chaque sérotype. La distinction entre ces génotypes est caractérisée par une variation de plus de 6% dans la composition du génome viral, spécifiquement au niveau de la région de jonction entre les protéines NS1 et E (Rico-Hesse 1990). Par conséquent, le sérotype DENV-1 englobe cinq génotypes, désignés de I à V (Goncalvez et al. 2002). Le sérotype DENV-2 se subdivise en six génotypes, identifiés sous les dénominations suivantes : Asian I, Asian II, Cosmopolitan, American, American/Asian et Sylvatic (Twiddy et al. 2002). Les sérotypes DENV-3 et DENV-4 sont constitués respectivement de quatre génotypes chacun, nommés de I à IV pour DENV-3 et I, II, III et Sylvatic pour DENV-4 (Lanciotti et al. 1994, Trent et al. 1997). Dans le cas de DENV, les génotypes viraux sont dans leur grande majorité étroitement liés à l'origine géographique des isolats viraux qui les constituent.



Parmi les divers génotypes et sérotypes de DENV, il existe des différences en termes de virulence, de distribution géographique et/ou de prévalence. Parmi les quatre sérotypes décrits, DENV-1 et DENV-2 sont les sérotypes les plus fréquemment associés aux flambées épidémiques connues aujourd'hui (Guo et al. 2017). Le sérotype DENV-2 étant associé aux épidémies possédant les taux de mortalité les plus élevés et à l'apparition de symptômes grave dans les cas d'infections secondaires (Yenamandra et al. 2021).

### III.3. Transmission des flavivirus : ZIKV et DENV

La propagation des flavivirus, Zika et Dengue, est principalement due à une transmission vectorielle. DENV et ZIKV circulent dans deux environnements distincts : un cycle sylvatique dans les zones forestières et un cycle humain dans les zones urbaines (Wang et al. 2000, Weaver & Reisen 2010) (**Figure 19**). En Asie du Sud et en Afrique de l'Ouest, le cycle de transmission initial implique des primates non humains (PNH) en tant que réservoirs et des moustiques arboricoles du genre *Aedes* comme vecteurs : *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer*, *Ae. vittatus*,... (Valentine et al. 2019). En revanche, dans la quasi-totalité des foyers urbains ce sont *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* qui jouent un rôle majeur dans la transmission de ces virus (Black et al. 2002, Bonizzoni et al. 2013). La transmission de ZIKV et DENV semble impliquer une grande variété de vecteurs, mettant en évidence la grande adaptabilité des flavivirus.



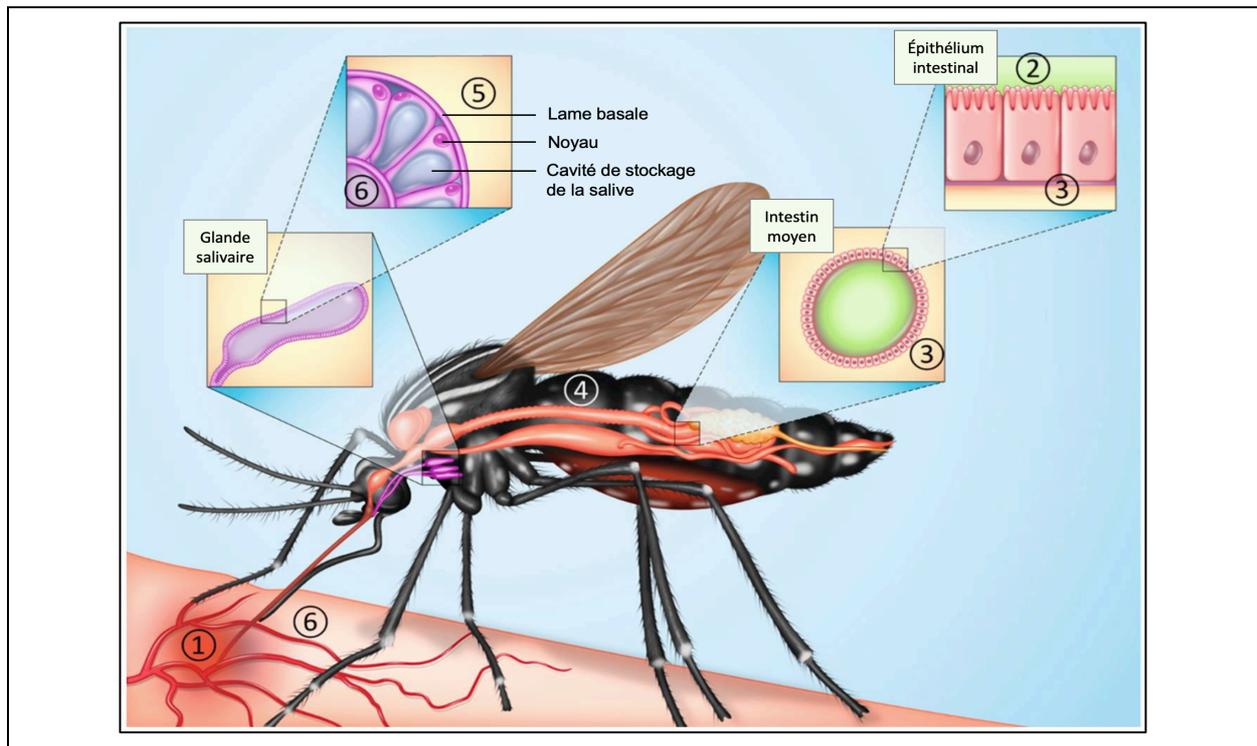
**Figure 19 : Cycle de transmission des flavivirus ZIKV et DENV**

Figure adaptée de (CDC & PLOS 2016). "Council on foreign relations".

### III.3.1. Transmission vectorielle

#### III.3.1.1. Transmission vectorielle horizontale

La transmission des flavivirus ZIKV et DENV par leurs vecteurs se déroule en plusieurs étapes (Hardy et al. 1983) (**Figure 20**) : Initialement, une femelle moustique s'infecte en se nourrissant de sang sur un hôte vertébré porteur du virus. Le virus est alors ingéré avec le sang et infecte les cellules épithéliales dans l'intestin moyen du moustique. Après une phase de réplication virale dans l'intestin moyen, les nouveaux virions doivent traverser la lame basale qui sert de soutien à cet épithélium pour être libérés dans l'hémocoèle, une cavité où circule l'hémolymphe (Franz et al. 2015). Une fois dans le système circulatoire de l'insecte, le virus peut se disséminer vers divers tissus et organes. Pour être transmis à un nouvel hôte vertébré lors de la piqûre, le virus doit atteindre les glandes salivaires du moustique. Il est important de noter que la femelle moustique reste infectée toute sa vie et peut se nourrir sur plusieurs individus en peu de temps, ce qui contribue à la rapide propagation de ZIKV et DENV.



**Figure 20 : Les étapes de la transmission vectorielle (virus/moustique)**

(1) Le virus est ingéré par le moustique à partir d'un hôte virémique, (2) le virus infecte et se réplique dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen, (3) le virus s'échappe de l'intestin moyen vers l'hémolymphe du moustique à l'intérieur de l'hémocoèle, (4) dissémination du virus vers les tissus/organes périphériques, (5) infection des glandes salivaires et (6) transmission du virus par la salive du moustique. *Figure adaptée de (Azar & Weaver 2019).*

### *III.3.1.2. Transmission vectorielle verticale*

Au cours de la phase de dissémination dans le moustique, le virus peut également infecter le tissu reproducteur (ovaires et œufs potentiels de la femelle) par transmission trans-ovarienne (Lai et al. 2020). Cela peut favoriser le passage du virus d'une femelle moustique à sa descendance. Ce phénomène est rare, mais peut permettre au virus de persister en l'absence d'hôtes réceptifs, lors de conditions environnementales défavorables, ou lorsque la densité des vecteurs est trop faible pour soutenir une transmission horizontale efficace (Lequime et al. 2016).

### *III.3.1.3. La capacité vectorielle*

La capacité vectorielle d'un moustique vecteur se définit comme la capacité de ce vecteur à transmettre efficacement un agent pathogène dans des conditions naturelles. Cette notion englobe la compétence vectorielle (capacité du moustique à ingérer, à répliquer et transmettre l'agent pathogène), la bio-écologie du moustique qui prend en compte tous les éléments susceptibles d'influencer la probabilité de contact entre vecteur et hôte sous l'influence de facteurs environnementaux. En conséquence, de nombreux facteurs internes et externes peuvent avoir un impact sur la dynamique de transmission des pathogènes par les moustiques (Kramer & Ebel 2003).

La compétence vectorielle d'une espèce de moustique pour un flavivirus dépend généralement de la combinaison spécifique du moustique et du génotype viral (Lambrechts et al. 2009). Par conséquent, la capacité d'un moustique à transmettre un flavivirus est une caractéristique spécifique qui peut différer d'une espèce de vecteur à une autre (Weaver & Barrett 2004). Les moustiques du genre *Aedes*, notamment *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, sont reconnus comme les principaux vecteurs des virus ZIKV et DENV, tandis que les vecteurs du genre *Culex* ou *Anopheles* semblent présenter une résistance à l'infection par ces virus. Des variations dans la capacité de transmission des flavivirus ont également été observées au sein d'une même espèce de moustique (Farfan-Ale et al. 2002, Chouin-Carneiro et al. 2016). Par exemple, dans le cas de DENV, une spécificité d'interaction entre les génotypes et leurs vecteurs a été confirmée (Armstrong & Rico-Hesse 2001). De même, pour ZIKV, des différences de transmission ont été constatées entre la lignée africaine et la lignée asiatique du virus (Ciota et al. 2017).

Un exemple remarquable illustrant cette spécificité en génotype viral et vecteur, concerne la transmission du CHIKV lors de l'épidémie qui a frappé l'île de La Réunion entre 2005 et 2006. Pendant cette épidémie, le virus qui circulait sur l'île à l'époque s'est adapté au vecteur *Ae. albopictus* en modifiant un seul acide aminé (passant de l'alanine à la valine) en position 226 de la protéine d'enveloppe E (Schuffenecker et al. 2006). Cette modification a favorisé la dissémination et la transmission du virus au sein du vecteur *Ae. albopictus* (Tsetsarkin et al. 2007).

### III.3.2. Transmission non-vectorielle

La transmission intraspécifique d'homme à homme peut se produire par des voies telles que la transmission verticale, sexuelle ou nosocomiale (Chen & Wilson 2016). Cependant, chez les flavivirus, ces modes de transmissions sont relativement rares. ZIKV présente la particularité de persister dans certains tissus et liquides biologiques. Ce virus a été détecté dans des échantillons d'urine, de salive, de sperme, d'écouillons nasopharyngés, ainsi que dans le lait maternel (Song et al. 2017), confortant l'idée d'une transmission non-vectorielle fort probable.

#### III.3.2.1. Transmission par voie sexuelle

Contrairement à la majorité des flavivirus, ZIKV peut se propager à la fois par les arthropodes et par voie sexuelle. Le premier cas de transmission sexuelle a été documenté en 2011, dans l'État du Colorado aux États-Unis, suite au retour d'un scientifique d'une mission au Sénégal (Foy et al. 2011). Sa femme, qui n'avait pas voyagé, a été infectée par ZIKV neuf jours après le retour de son mari. Cette hypothèse a été renforcée par l'isolement du virus dans le sperme d'un patient infecté par ZIKV lors de l'épidémie en Polynésie Française en 2013 (Musso et al. 2015). Après une identification singulière de cas sporadique d'infection par ZIKV en 2016, l'idée d'une transmission sexuelle de ZIKV a été largement acceptée (Davidson et al. 2016). Depuis lors, plusieurs études ont signalé la présence de ZIKV dans le sperme des hommes ainsi que le liquide séminal et la muqueuse génital des femmes. Il convient de noter que la transmission sexuelle de ZIKV peut être retardée et survenir jusqu'à au moins un mois après l'apparition des symptômes chez le partenaire (Turmel et al. 2016). ZIKV a une affinité particulière pour les tissus de l'appareil reproducteur masculin et pourrait avoir des effets préjudiciables à long terme sur la fertilité des hommes (Avelino-Silva et al. 2018, Robinson et al. 2018).

### *III.3.2.2. Transmission par voie materno-fœtal*

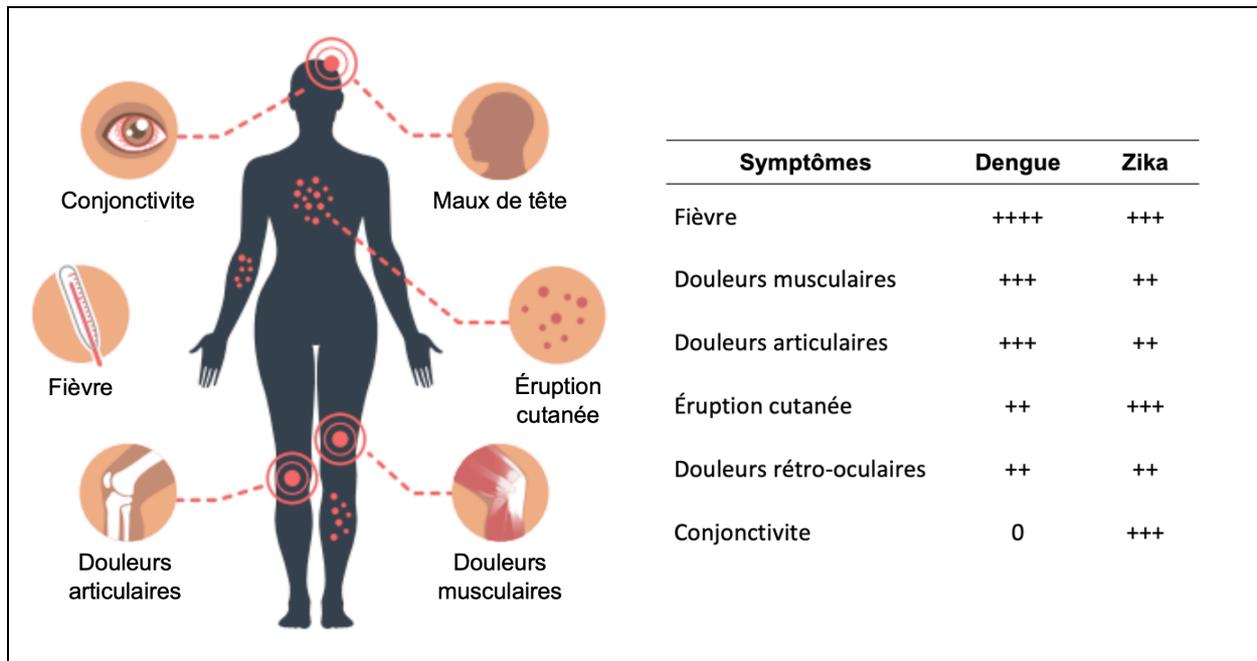
Pendant l'épidémie de ZIKV au Brésil, en 2015, la première preuve de transmission placentaire du virus a été obtenue par la détection de l'ARN viral de ZIKV dans le liquide amniotique de deux femmes chez lesquelles une microcéphalie fœtale avait été diagnostiquée (Oliveira Melo et al. 2016). Par la suite, la transmission materno-fœtale de ZIKV a été confirmée en Amérique du Sud grâce à des études de cohorte prospectives menées sur des femmes enceintes, ainsi que par la détection du virus dans divers échantillons biologiques prélevés chez des femmes enceintes infectées et leurs fœtus : sang, liquide amniotique, cordon ombilical, biopsie du placenta, tissus fœtaux (Hoen et al. 2018, Pomar et al. 2018). Par conséquent, la transmission de ZIKV se fait de la mère infectée vers le fœtus, le virus étant capable de traverser la barrière fœto-placentaire humaine (Besnard et al. 2016). Il est à noter que peu de flavivirus sont en mesure de franchir la barrière placentaire et uniquement chez une petite proportion de femmes enceintes, un phénomène qui a été décrit pour DENV. Cependant, ZIKV est le premier arbovirus caractérisé par une transmission intra-utérine si efficace (Nguyen et al. 2017).

### *III.3.3. Les autres voies de transmission*

La transmission périnatale de ZIKV peut se faire par voie transplacentaire lors de l'accouchement (Besnard et al. 2014), par la présence de ZIKV dans le liquide amniotique (Calvet et al. 2016), par l'allaitement (Dupont-Rouzeyrol et al. 2016), ou par contact étroit entre la mère et le nouveau-né. Une transmission de ZIKV par contact physique, via les fluides corporels (urine, larmes, salive, sueur) a également été rapportée bien que rare (Gregory et al. 2017). Pour finir, dans le cas de ZIKV et DENV, une transmission non-vectorielle peut se produire lors d'une transfusion sanguine accidentelle ou d'un don d'organe infecté (Tambyah et al. 2008, Rosso et al. 2019).

### III.4. Symptomatologie, diagnostic, stratégies thérapeutiques et vaccinales

L'infection par des flavivirus, tels que ZIKV et/ou DENV, est généralement asymptomatique (~70% des cas) ou provoque des symptômes pseudo-grippaux légers et spontanément résolutifs (~30% des cas) (Bhatt et al. 2013, Musso & Gubler 2016). Les manifestations cliniques de l'infection par ces virus sont très variées : fièvre modérée ou élevée (ZIKV<38,5°C ; DENV<40°C), maux de tête, nausées, fatigue, douleurs articulaires, douleurs musculaires, conjonctivite, troubles digestifs, et notamment des éruptions maculo-papuleuses (rash) retrouvées chez 90% des patients infectés (Gubler 1998, Petersen et al. 2016) (**Figure 21**). La période d'incubation varie généralement de 3 à 12 jours, suivie d'une période symptomatique de 2 à 7 jours. L'infection par ces flavivirus se traduit souvent par des symptômes bénins étroitement liés et confondants qui compliquent le diagnostic de l'infection. En revanche, l'infection par ZIKV et/ou DENV peut entraîner des complications graves, notamment neurologiques (ZIKV) ou hémorragiques (DENV), qui peuvent causer la mort en l'absence d'une assistance médicale appropriée.



**Figure 21 : Symptômes associés à l'infection par ZIKV et DENV**

Les principaux symptômes de l'infection par ZIKV et DENV, présentés dans un tableau comparatif. Le symbole « + » étant associé à la fréquence d'apparition des symptômes pour un virus donné. *Figure adaptée de (CDC 2019) et (Halstead 1988)*

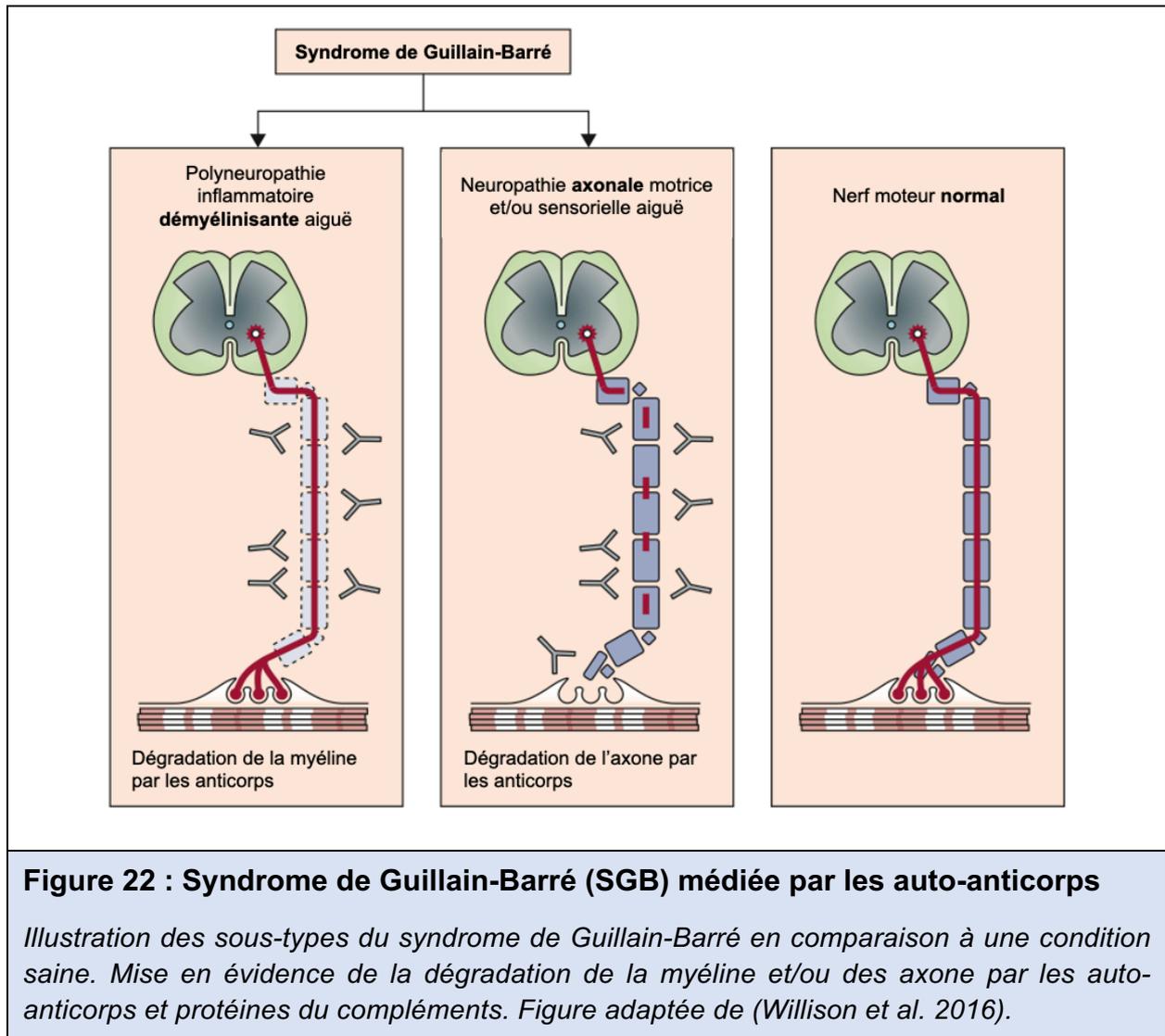
### III.4.1. Syndrome neurologique et congénital associé à l'infection par le virus Zika

Au cours des épidémies récentes en Polynésie française et au Brésil, l'infection par ZIKV a été associée à d'importants troubles neurologiques tels que le syndrome de Guillain-Barré (SGB) chez l'adulte ou le syndrome congénital à virus Zika (SCZ) chez les fœtus de mères infectées. On estime que le SGB et le SCZ surviennent respectivement dans 0,02% et 1% des infections par ZIKV (Cao-Lormeau et al. 2016).

#### III.4.1.1. Le syndrome de Guillain-Barré (SGB)

Chez l'adulte, le SGB a été la première complication sévère de l'infection par ZIKV à être rapportée. Une corrélation temporelle avait notamment été observée entre l'épidémie de ZIKV et l'augmentation de l'incidence du SGB en Polynésie française en 2013 (Oehler et al. 2014). Le SGB est une maladie à médiation immunitaire caractérisée par une démyélinisation du système nerveux périphérique qui entraîne une paralysie ascendante aiguë et progressive, pouvant atteindre les muscles respiratoires (Muñoz et al. 2017). Cette pathologie est donc le résultat d'une réponse auto-immune aberrante initiée par un mimétisme antigénique du virus qui déclenche chez l'individu la production d'auto-anticorps dirigés contre la myéline. Ces auto-anticorps se fixent sur la gaine de myéline, activent les lymphocytes T cytotoxiques et le système du complément qui altèrent les membranes des axones des nerfs périphériques et leurs racines rachidiennes, perturbant les communications neuronales (**Figure 22**). Le SGB provoque donc chez l'individu infecté une réduction de l'autonomie qui se manifeste par une faiblesse progressive des membres, des douleurs musculaires, des paralysies, et des dysfonctionnements pulmonaires sévères pouvant entraîner un arrêt respiratoire (Willison et al. 2016).

Chez l'adulte, d'autres complications neurologiques non liées au SGB ont été rapportées chez des patients infectés par ZIKV, notamment des encéphalites et méningo-encéphalites (inflammation de l'encéphale et des méninges), des myélites (inflammation de la moelle épinière) ou des radiculites (inflammation des nerf rachidiens). Plus rarement, des associations entre l'infection par ZIKV et le développement de thrombocytopénie, de manifestations ophtalmologiques (uvéïte) ou cardiaques ont été également décrites (Furtado et al. 2016, Minhas et al. 2017).



#### III.4.1.2. Le syndrome congénital à virus Zika (SCZ)

Les conséquences de l'infection par ZIKV pendant la grossesse ont commencé à être décrites lors de l'épidémie survenue au Brésil en 2015. La microcéphalie a été la première malformation congénitale associée à cette infection. Par la suite, le terme « Syndrome congénital à virus Zika (SCZ) » a été créé pour décrire l'ensemble des malformations congénitales associées à l'infection par ZIKV : microcéphalie sévère, calcifications sous-corticales, structures cérébrales anormalement formées ou absentes (ventriculomégalie et lissencéphalie), anomalies et malformations oculaires, contractures congénitales et retard de croissance (Freitas et al. 2020). On estime que l'infection par ZIKV pendant la grossesse peut entraîner des malformations congénitales dans 5% à 13% des cas, ainsi qu'un nombre important de fausses couches et cela même si les symptômes maternels ne semblent pas avoir d'incidence sur la perte fœtale ou le SCZ.

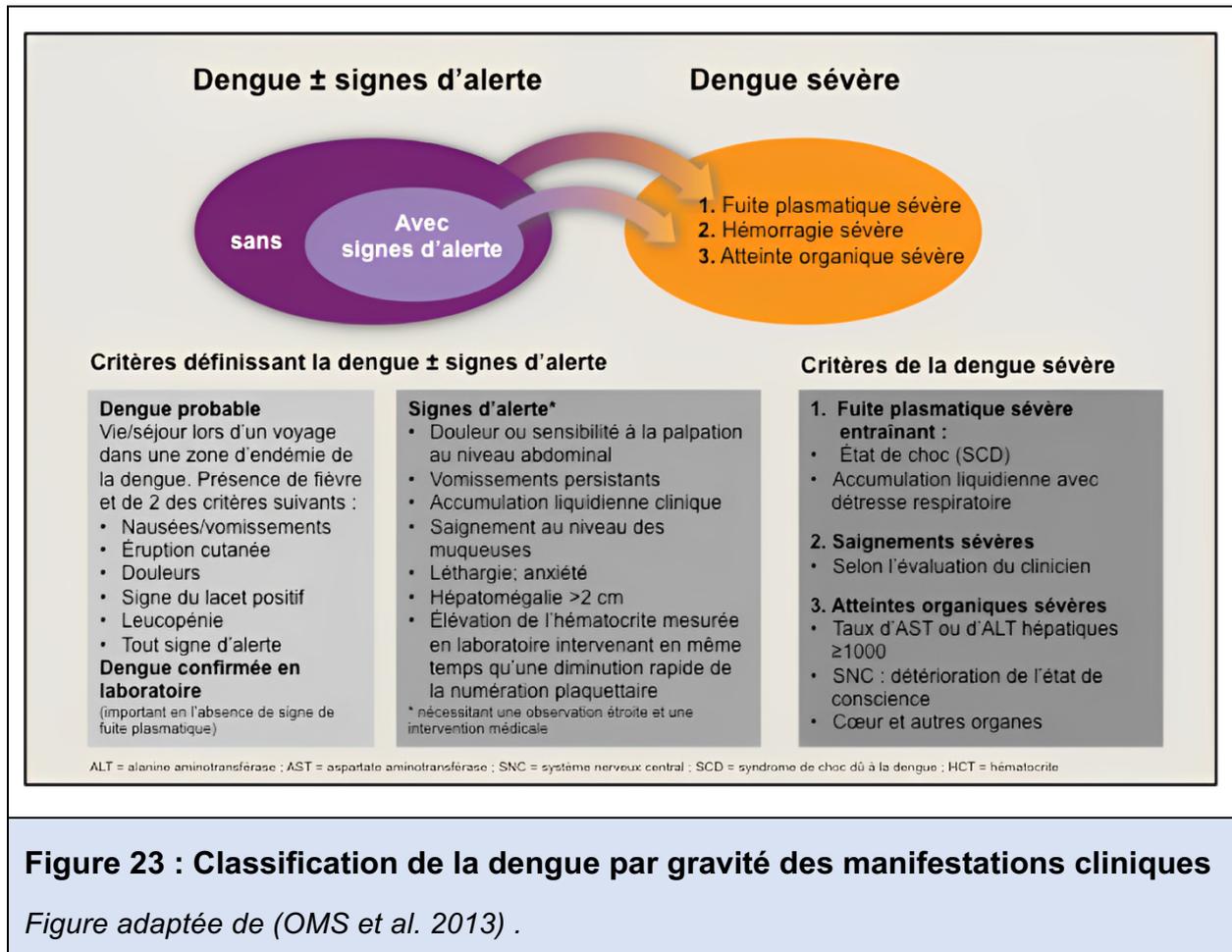
L'âge gestationnel au moment de l'infection a un impact sur le risque d'apparition du SCZ. Bien que la transmission verticale puisse se produire tout au long de la grossesse, l'infection par ZIKV durant le premier et second trimestre de gestation est associée à un risque accru de complications liées au SCZ (Brasil et al. 2016).

Parmi les anomalies du développement cérébral les plus communes lors d'une infection par ZIKV on retrouve notamment la microcéphalie. Cette malformation est définie par une circonférence crânienne inférieure à la normale. Au cours de l'infection d'une femme enceinte, la microcéphalie survient chez l'enfant lorsque ZIKV traverse la barrière placentaire et gagne le cerveau du fœtus. La microcéphalie résulte de la réplication de ZIKV dans les cellules souches neurales du cerveau en cours de développement (Garcez et al. 2016). L'infection par ZIKV entraîne l'arrêt du cycle cellulaire, une inhibition de la différenciation cellulaire et la mort par apoptose de ces cellules, causant une diminution critique du volume cérébral (Li et al. 2016).

#### III.4.2. Syndrome hémorragique associé à l'infection par le virus de la Dengue

Avant 2009, la Dengue était classifiée en trois catégories distinctes : la dengue classique (DF, de l'anglais Dengue fever), la dengue hémorragique (DHF, de l'anglais Dengue hemorrhagic fever) et le syndrome de choc de la dengue (DSS, de l'anglais Dengue shock syndrome). Cependant, en 2009, l'OMS révisa cette classification de la dengue pour la diviser en deux principales catégories : la dengue classique (avec ou sans signes d'alerte) et la dengue sévère (Ajlan et al. 2019) (**Figure 23**). Dans de rares cas, l'infection par DENV peut évoluer vers des symptômes plus graves. Des signes d'alerte indiquant une possible progression vers un dengue sévère peuvent apparaître pendant la phase de défervescence, généralement entre les jours 3 et 7 de la maladie, sous la forme de : douleurs abdominales, d'une hépatomégalie caractérisée par une élévation des taux de transaminases, des manifestations hémorragiques au niveau des muqueuses ou des vomissements persistants.

Il est important de noter que dans le cas d'une infection par DENV, la présence d'anticorps spécifiques à un sérotype favoriserait le développement des formes sévères de la dengue lors d'une infection secondaire par un autre sérotype (Guzman et al. 2013). Ce phénomène se nomme l'ADE (de l'anglais, Antibody-Dependant Enhancement) et sera décrits plus en détail dans la section « *III.7. Physiopathologie et immunopathologie des flavivirus* », page 88.



La dengue sévère se caractérise par une fuite plasmatique et vasculaire, une thrombocytopénie, une coagulopathie, des lésions hépatiques et des manifestations hémorragiques, en particulier dans l'intestin, qui sont la conséquence d'une perte de la fonction de barrière des cellules endothéliales. La dengue sévère peut évoluer vers une forme mortelle de la maladie, la dengue sévère avec syndrome de choc (DSC), si la fuite plasmatique et/ou le saignement conduisent à un volume critique de plasma perdu qui serait suffisant pour induire un choc hypovolémique (Kalayanarooj 2011). Un syndrome de choc prolongé peut entraîner une détresse respiratoire, une défaillance des organes, une hypotension et une mortalité dans les 12 à 36 heures suivant l'apparition du choc hypovolémique s'il n'est pas traité par une restauration rapide du volume plasmatique (Guzman & Harris 2015).

### III.5. Diagnostic en laboratoire

Le diagnostic de l'infection par les flavivirus ZIKV et/ou DENV, ce fait généralement suite à une consultation médicale sur la base d'une apparition de signes cliniques associés à l'infection chez le patient. Il existe classiquement deux méthodes de diagnostic : **1)** le diagnostic moléculaire qui permet la détection directe de composés nucléiques et/ou protéiques du virus, et **2)** le diagnostic sérologique qui permet la détection des anticorps produits par le système immunitaire lors de l'infection virale (Musso & Desprès 2020). Le choix du test de diagnostic va alors principalement dépendre de la date d'apparition des signes cliniques et nécessitera la réalisation de prélèvements biologiques adaptés : sang total, sérum, plasma, urines, ...

#### *III.5.1. Diagnostic moléculaire*

Le diagnostic moléculaire est utilisé lors de la phase aiguë de l'infection, jusqu'à 5 à 7 jours suite à l'apparition des premiers signes cliniques chez le patient. Durant cette phase, la réplication virale est toujours active et va permettre la détection de composés nucléiques et/ou protéiques du virus dans les échantillons biologiques.

La détection du génome viral est réalisée par RT-qPCR (de l'anglais, Reverse transcription - Quantitative polymerase chain reaction). La RT-qPCR est couramment utilisée en raison de sa grande sensibilité, de sa spécificité, de son faible coût de production et de sa rapidité d'exécution. Cette technique permet la détection et la quantification de l'ARN génomique viral à l'aide d'une étape de transcription inverse puis d'une amplification par PCR sur échantillon biologique. Les cibles de la RT-qPCR sont généralement les gènes codant les protéines structurales et non-structurales spécifiques du virus (Scaramozzino et al. 2001, Moureau et al. 2007).

La détection directe des particules virales infectieuses est également possible par isolement du virus. En effet, les flavivirus ZIKV et DENV peuvent être identifiés, isolés et caractérisés à partir de prélèvements biologiques. L'isolement est réalisé par l'infection de lignées cellulaires de mammifères et/ou de moustiques en laboratoire à partir du prélèvement biologique. L'isolement du virus est aujourd'hui peu utilisé en raison de la grande technicité et durée de cette méthode qui nécessite un laboratoire de confinement de niveau 3, ainsi que du manque de sensibilité de cette méthode en comparaison à la RT-qPCR.

La détection des protéines virales est réalisée par ELISA (de l'anglais, Enzyme-linked immunosorbent assay). Cette technique permet la détection d'antigènes viraux sur échantillon biologique par la formation de complexe immun. À titre d'exemple, il existe des kits de diagnostic rapide commercialisés pour la détection de la protéine virale NS1 permettant le diagnostic de la Dengue chez l'Homme (Alcon et al. 2002). Durant la phase aiguë de l'infection, la NS1 est largement sécrétée et détectable dans le sang en corrélation avec la virémie du patient. Cette technique est couramment utilisée en période épidémique et permet l'obtention d'un résultat en moins de 15 min.

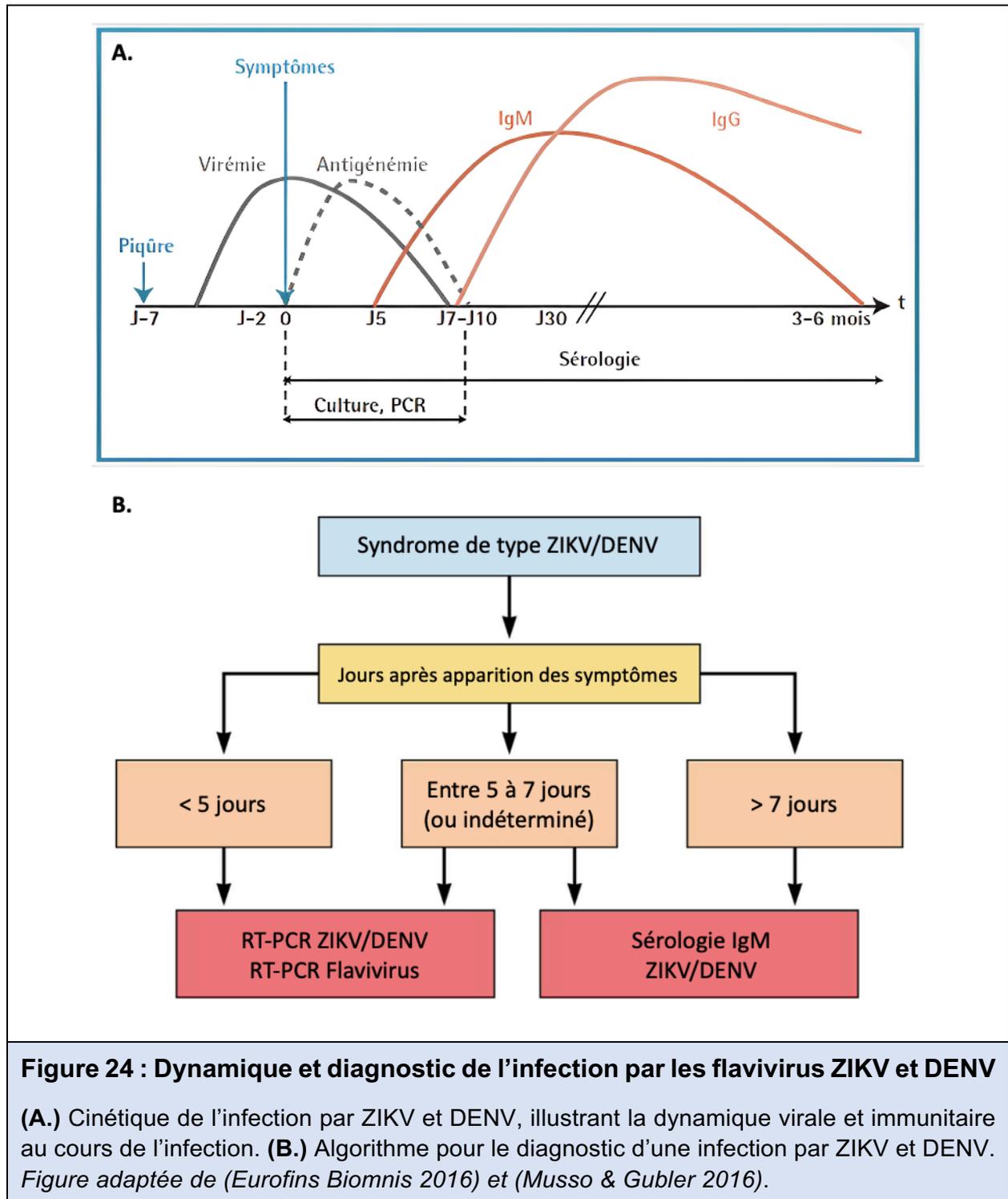
### *III.5.2. Diagnostic sérologique*

Une fois la phase aiguë de l'infection passée, le diagnostic de la maladie repose sur la détection d'anticorps spécifiques dans les échantillons biologiques du patient. La sérologie se base alors principalement sur la détection d'immunoglobuline M (IgM) et d'immunoglobuline G (IgG) spécifiques par ELISA (Musso & Desprès 2020). Les anticorps IgM sont détectables dans la circulation sanguine dès 5 jours et jusqu'à 12 semaines après l'apparition des premiers signes cliniques (**Figure 24**). Les anticorps IgG apparaissent plus tardivement et peuvent être détectables pendant plusieurs mois, voire années dans l'organisme. La présence d'anticorps IgM est donc révélatrice d'une infection récente alors que la présence d'anticorps IgG peut indiquer une infection récente mais également ancienne par le virus (Rabe et al. 2016).

Le diagnostic sérologique par la détection d'anticorps spécifiques est primordial en sachant que la majorité des infections par ZIKV et/ou DENV sont asymptomatiques. Cependant, la sérologie spécifique de ces virus est difficile à réaliser en raison de la réactivité croisée possible avec d'autres flavivirus (Rathore & St. John 2020). La confirmation de la spécificité et du pouvoir neutralisant des anticorps peut alors nécessiter la mise en place d'un test de séroneutralisation PRNT (de l'anglais, Plaque reduction neutralisation test). La technique consiste en la mise en contact du sérum du patient avec le virus recherché en culture cellulaire. Si les anticorps du sérum sont spécifiques et neutralisants, leur présence devrait mener à une réduction significative des effets cytopathiques observés (Pierson & Diamond 2008). Cette technique permet de caractériser et quantifier la quantité d'anticorps mais reste néanmoins longue et fastidieuse nécessitant un laboratoire de confinement de niveau 3, en plus d'avoir une sensibilité variable dépendant de la souche virale utilisée (Weingartl et al. 2003).

## - LES FLAVIVIRUS ZIKA ET DENGUE -

Les outils moléculaires et sérologiques permettant de diagnostiquer les infections par flavivirus se sont considérablement améliorés. Il existe aujourd'hui des tests de diagnostic de haute qualité qui permettent la détection d'antigènes et d'anticorps spécifiques. Cependant, la recherche dans ce domaine doit se poursuivre afin de mettre au point des méthodes toujours plus efficaces et moins coûteuses, afin d'étendre leur utilisation dans de nombreuses régions aux ressources limitées.



**Figure 24 : Dynamique et diagnostic de l'infection par les flavivirus ZIKV et DENV**

(A.) Cinétique de l'infection par ZIKV et DENV, illustrant la dynamique virale et immunitaire au cours de l'infection. (B.) Algorithme pour le diagnostic d'une infection par ZIKV et DENV. Figure adaptée de (Eurofins Biomnis 2016) et (Musso & Gubler 2016).

### III.6. Stratégies thérapeutiques, vaccinales et lutte antivectorielle

Actuellement, il n'existe aucune mesure préventive ou traitement spécifique de l'infection par les flavivirus DENV et ZIKV qui soit pleinement efficace. Les traitements sont alors basés sur la symptomatologie et ont pour but de limiter l'apparition de complications ou de symptômes plus sévères. Dans le cas d'une infection par ZIKV, la prescription d'antalgiques comme le paracétamol, l'aspirine et d'autres médicaments non stéroïdiens anti-inflammatoires (AINS) permet d'atténuer la douleur chez le patient. Toutefois dans le cas d'une infection par DENV, la prise d'aspirine ou d'AINS est à éviter en raison des propriétés anticoagulantes de ces médicaments et des risques hémorragiques qui y sont rattachés. Toutefois, une prise en charge adaptée de la Dengue, en association à une hydratation continue, permet de réduire le taux de mortalité de cette maladie à moins de 1% (WHO. 2023).

En l'absence de traitements disponibles, et compte tenu de la gravité des maladies associés à l'infection par DENV et ZIKV, de multiples études ont été lancées pour mettre au point de nouveaux antiviraux et développer de nouvelles stratégies vaccinales qui serait plus efficaces, plus sûrs et moins coûteuses.

#### III.6.1. Approches antivirales

Les antiviraux représentent un groupe de molécules qui permettent une inhibition ou un ralentissement de l'infection en perturbant le cycle de réplication viral. Les antiviraux peuvent être synthétiques ou naturelles, pouvant être isolés de plantes, de champignons, de levures ou de bactéries. Chaque jour, de nombreuses études et projets de recherche permettent d'identifier de nouvelles molécules antivirales en réalisant le criblage de chimiothèques ou en élargissant l'utilisation de composés pharmacologiquement actifs déjà approuvés afin de permettre leur repositionnement (García et al. 2017). Une des complications liées à l'élaboration et la découverte de nouveaux antiviraux réside partiellement dans la capacité des virus à évoluer et à développer des mécanismes de résistance. Pour cette raison les antiviraux doivent agir si possible à diverses étapes du cycle viral, soit en interagissant directement avec la particule virale ou en entravant les phases précoces et/ou tardives du cycle de réplication.

Dans l'élaboration de nouveaux antiviraux, les efforts se sont concentrés sur la recherche de molécules actives ciblant : **1)** Les protéines virales à activité enzymatique NS2B/NS3 et NS5 (Baz & Boivin 2019), **2)** les protéines membranaires qui sont nécessaires à la réplication virale NS2A et NS4B (Xie, Zou, Wang, et al. 2015), **3)** la protéine d'enveloppe E qui permet l'étape de fusion de la particule virale aux membranes cellulaires, et **4)** les composants cellulaires de l'organismes hôtes nécessaires à l'infection. Parmi ces molécules antivirales se trouvent des analogues nucléosidiques qui inhibent la polymérase (Ribavirine et Sofosbuvir), des inhibiteurs d'actions des caspases ou du protéasome (Emricasan ou Bortezomib), des inhibiteurs de synthèse des purines (Acide Mycophénolique), ou encore des inhibiteurs de l'interaction entre la protéine E et des récepteurs se trouvant à la surface cellulaire (Barrows et al. 2016, Zmurko et al. 2016, Bullard-Feibelman et al. 2017, Kamiyama et al. 2017, Clain et al. 2019, Haddad et al. 2020).

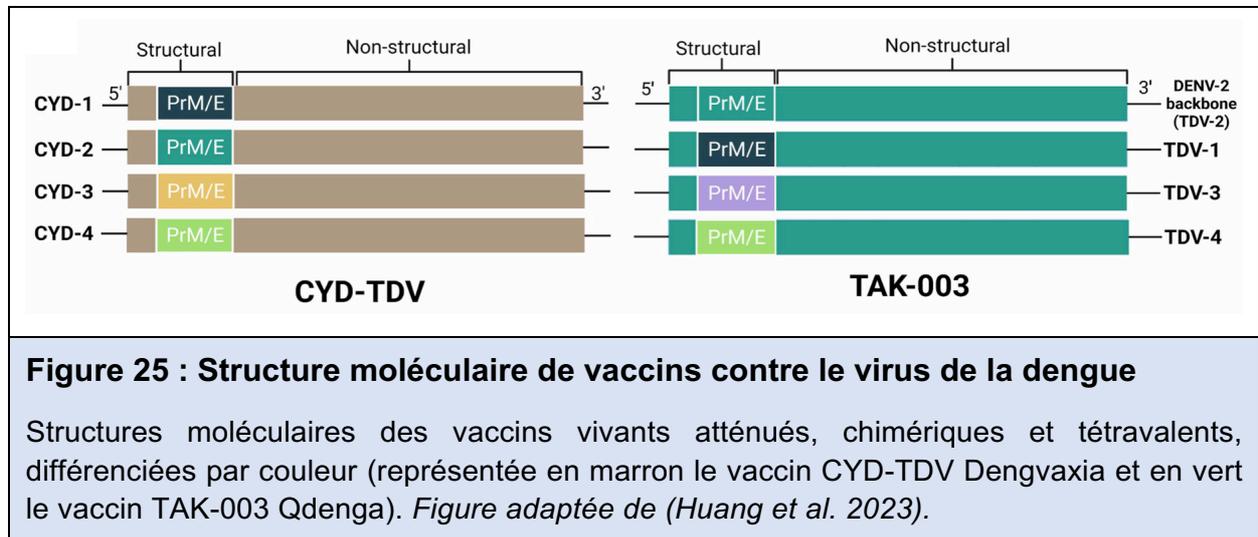
Cependant, même si plusieurs molécules antivirales prometteuses ont été identifiées, aucune d'entre elles n'a actuellement donné lieu à une autorisation de mise sur le marché. Le développement d'antiviraux est difficile et doit prendre en compte plusieurs paramètres tels que : la toxicité, l'efficacité, des tests *in vitro* et *in vivo* suffisamment avancés, un schéma thérapeutique simple à mettre en œuvre chez l'Homme, et être adapté pour une utilisation chez des cibles fragiles que sont les enfants, les personnes âgées ou encore les femmes enceintes.

### III.6.2. Approches vaccinales

Dans la lutte contre les maladies infectieuses et particulièrement les infections virales, la vaccination reste l'une des stratégies de lutte les plus efficaces à grande échelle (Plotkin 2014). Plusieurs catégories de vaccins se distinguent par leur mode de conception : les vaccins issus d'agents infectieux atténués ou inactivés, les vaccins synthétiques et/ou chimériques, les vaccins à ADN, à ARN ou encore à sous-unités. Depuis l'émergence des Flavivirus d'intérêt médical, de nombreuses recherches ont abouti à la conception de vaccins contre les virus YFV, JEV et DENV (Barrett & Higgs 2007, Halstead & Thomas 2010, Torres-Flores et al. 2022).

## - LES FLAVIVIRUS ZIKA ET DENGUE -

Le premier vaccin atténué, YF-17D, fut celui développé contre YFV par Max Theiler (Norrby 2007). À l'origine, le vaccin a été généré par des passages successifs de la souche virale YFV-Asibi sur des tissus de souris et de poulet. Le vaccin 17D est aujourd'hui utilisé comme base pour le développement d'autres vaccins ciblant différents flavivirus, ses régions non-structurales servant de support pour des vaccins chimériques. C'est notamment le cas du vaccin CYD-TDV Dengvaxia, qui repose sur le squelette du vaccin 17D dans lequel les protéines structurales de membrane (prM) et d'enveloppe (E) ont été substituées par les protéines de DENV (**Figure 25**). La protéine E étant le principal immunogène de l'immunité protectrice de l'hôte capable d'induire la production d'anticorps neutralisants (Durham et al. 2019).



Dengvaxia est le premier vaccin contre DENV développé et commercialisé par Sanofi-Pasteur depuis 2017. Dengvaxia est un vaccin vivant atténué, chimérique et tétravalent, dirigé contre les quatre sérotypes de la dengue (DENV-1 à DENV-4). Les résultats des essais cliniques de phase III menés en Asie et en Amérique latine ont montré l'efficacité du vaccin avec une meilleure immunogénicité pour le sérotype DENV-4 et une immunogénicité plus faible pour DENV-2 (Capeding et al. 2014, Villar et al. 2015). Par la suite, des investigations supplémentaires ont mis en évidence l'importance crucial d'une première infection préalable à la vaccination, afin de réduire le risque de développer des formes sévères de la maladie lors d'une infection post-vaccinale (Sridhar et al. 2018). L'utilisation de Dengvaxia n'est donc recommandée que chez les sujets âgés de 9 à 45 ans qui ont déjà été infectés par DENV et qui vivent dans des zones où le virus est présent de manière endémique avec une transmission élevée et une séroprévalence supérieure à 50 % (WHO. 2023).

## - LES FLAVIVIRUS ZIKA ET DENGUE -

Plus récemment en 2022, une autorisation de mise sur le marché a été accordée par la commission européenne à un nouveau vaccin nommé TAK-003 Qdenga. Développé par Takeda, Qdenga est un vaccin vivant atténué, chimérique et tétravalent, dirigé contre les quatre sérotypes de la dengue. La conception du vaccin repose sur le génome viral de la souche DENV-2 PDK-53 servant de squelette au sein duquel les protéines structurales prM et E ont été substituées par les protéines des autres sérotypes DENV-1, DENV-3 et DENV-4 (Osorio et al. 2016). En comparaison avec Dengvaxia, le vaccin Qdenga a la capacité non seulement de renforcer la réponse immunitaire humorale contre DENV, mais peut également induire une réponse immunitaire cellulaire grâce à la présence des régions non-structurales de DENV-2 (Osorio et al. 2016, Huang et al. 2023). Le vaccin présente une efficacité protectrice forte contre DENV-2 et moindre contre DENV-4. L'efficacité du vaccin Qdenga semble moins conditionné par le statut sérologique du sujet infecté et pourra être recommandé chez des sujets âgés de 4 ans et plus, indépendamment d'une exposition antérieure à l'infection.

Contrairement à la dengue, il n'existe actuellement aucun vaccin efficace contre ZIKV disposant d'une autorisation de mise sur le marché. Plusieurs candidats vaccins et stratégies ont été envisagés jusqu'à présent : des virus inactivés, des protéines d'enveloppe recombinantes associées à de l'ARN double brin afin de stimuler l'immunité, l'injection de protéines NS1 recombinantes, des vaccins à ARN, à ADN ou chimériques (Pardi et al. 2017, Bailey et al. 2019, Poland et al. 2019, Amaral et al. 2020, Wang et al. 2022)

Jusqu'à présent, la mise au point de stratégies vaccinales contre les flavivirus reste un défi complexe. Cette réalité se vérifie notamment pour DENV, où la présence de quatre sérotypes complique la recherche d'un vaccin tétravalent efficace. En ce qui concerne ZIKV, la conception d'un vaccin demeure tout aussi complexe en ayant pour objectif de protéger les femmes enceintes et leurs nouveau-nés des complications neurologiques résultant de l'infection par le virus (Schwartz 2018, Shan et al. 2019). Aujourd'hui, les bénéfices de la vaccination contre les flavivirus restent incontestables, bien que de nombreux défis restent à surmonter et des connaissances à combler.

### III.6.3. La lutte antivectorielle

Avec le peu de vaccin commercialisé sous certaines restrictions et l'absence de traitements efficaces, les seuls autres moyens de lutte contre DENV et ZIKV reposent actuellement sur la prévention, la protection individuelle et la lutte antivectorielle. L'objectif de la lutte antivectorielle (LAV) est de restreindre la transmission des arbovirus en réduisant la densité des moustiques vecteurs et des contacts entre les moustiques et l'Homme (Pates & Curtis 2005). À l'heure actuelle, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour le contrôle des populations de moustiques : **1)** La lutte mécanique, qui consiste à rechercher et détruire les gîtes larvaires tout en diminuant les risques de formations de nouveaux gîtes. **2)** La lutte chimique, qui repose sur l'utilisation de larvicides et/ou d'insecticides chimiques pour détruire les gîtes larvaires (Marcombe et al. 2012). Cette méthode doit être contrôlée afin d'éviter toute toxicité vis-à-vis de l'environnement et l'apparition de résistances chez les moustiques cibles. L'utilisation d'huiles essentielles de plantes se positionne à présent comme une solution innovante (Dias & Moraes 2014). **3)** La lutte génétique, qui regroupe les connaissances du matériel génétique des moustiques afin de perturber leur reproduction ou leur compétence vectorielle. La technique de l'insecte stérile (TIS) étant un bon modèle de cette méthode (Oliva et al. 2012, Oliva et al. 2021). **4)** La lutte biologique, par l'utilisation de prédateur, de parasites, de pathogènes ou de micro-organismes. Une alternative prometteuse récente étant l'utilisation de la bactérie intracellulaire *Wolbachia pipientis* pour la technique de l'insecte incompatible (TII) qui permet en théorie la suppression ou le remplacement des populations de moustiques sauvages par des populations non compétentes (Bourtzis et al. 2014).

### III.7. Physiopathologie et immunopathologie des flavivirus

#### III.7.1. Physiopathologie associée à l'infection par ZIKV et DENV

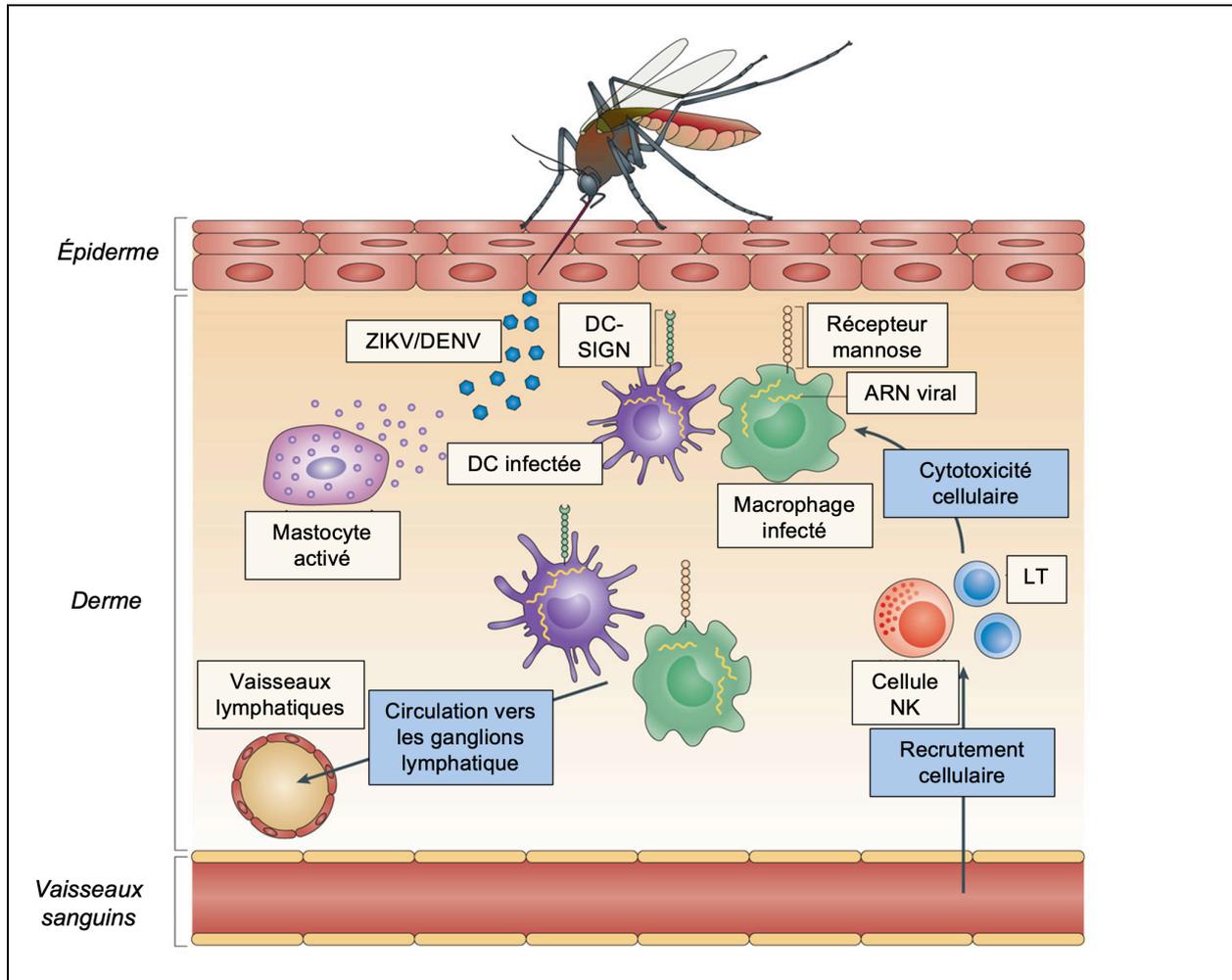
Les flavivirus, ZIKV et DENV, présentent un tropisme cellulaire et tissulaire étendu avec une grande variété de cellules se montrant permissives à leur infection. Suite à une piqûre de moustique, les cellules cutanées et lymphoïdes constituent le point de contact initial avec le virus (Briant et al. 2014). Au niveau cutané, les fibroblastes et les kératinocytes supporteront l'infection initiant la réplication du virus au site d'inoculation. Par la suite, le virus se propagera vers les ganglions lymphatiques en infectant les cellules lymphoïdes périphériques telles que les monocytes, macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques (Wu et al. 2000, Schmid et al. 2014, Schmid & Harris 2014, Troupin et al. 2016). Par l'intermédiaire des cellules lymphoïdes, ZIKV et DENV, seront transportés dans la circulation sanguine pour atteindre différents organes cibles et donner lieu à une infection dite systémique (**Figure 26**).

Les principales cibles de ZIKV sont des organes possédant une immunité privilégiée tels que le système nerveux, les tissus oculaires, les organes génitaux et le placenta (Prisant et al. 2016, Aagaard et al. 2017, Stassen et al. 2018, Ventura & Ventura 2018). En cohérence avec sa propension à induire des troubles neurologiques, ZIKV a la capacité d'infecter les cellules souches neurales, les cellules neurales progénitrices et les cellules gliales. L'infection de ces cellules par ZIKV induit une diminution de la croissance cellulaire, une dégradation des protéines de jonctions adhérentes, une inflammation localisée et une augmentation de la mort cellulaire, qui sont impliqués dans le développement de malformations congénitales chez les fœtus après infection (Garcez et al. 2016).

De nombreuses études montrent que DENV possède un tropisme étendu en privilégiant les cellules du système immunitaire, les cellules endothéliales ou encore les cellules hépatiques. L'infection des cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins peut entraîner une augmentation de la perméabilité vasculaire associée à une production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules du système immunitaire (Malavige & Ogg 2017). En cas de complications graves, ces perturbations peuvent entraîner des hémorragies multiples et une altération sévère de la fonction hépatique (Samanta 2015).

## - LES FLAVIVIRUS ZIKA ET DENGUE -

La sévérité de la maladie et la pathogénèse de l'infection par ZIKV et DENV sont influencées par de nombreux facteurs. Parmi ces facteurs figurent le statut immunitaire et génétique de l'hôte infecté, les facteurs de comorbidités, la virulence du pathogène et les interactions moléculaires entre le virus et l'organisme hôte. L'issue de la maladie dépend notamment de la réponse immunitaire innée et adaptative qui constituent ensemble la première ligne de défense de l'hôte après infection (Chong et al. 2019).



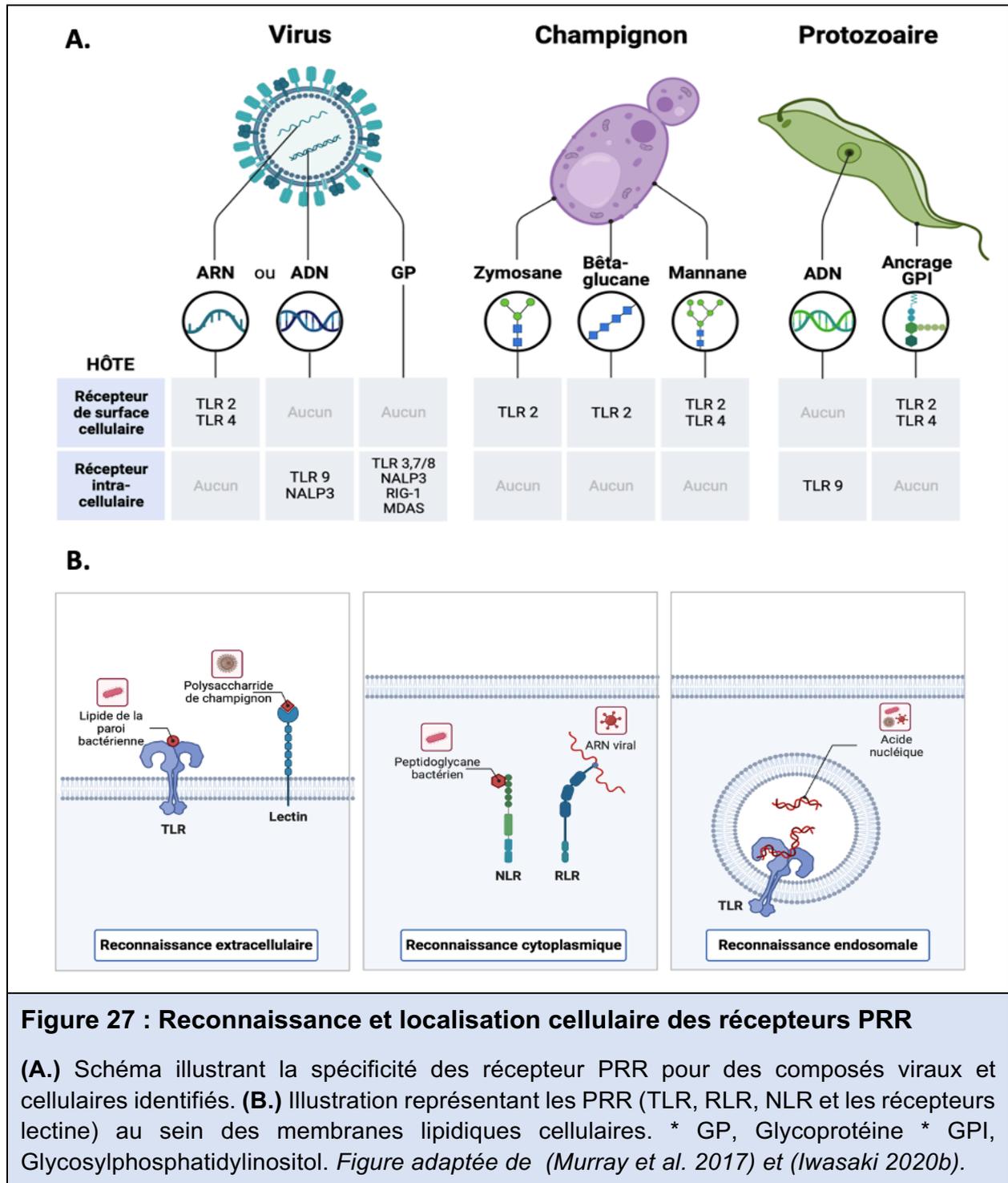
**Figure 26 : Réponse physiologique de l'hôte au site d'infection**

Injection cutanée des flavivirus ZIKV ou DENV par la piqûre d'un moustique femelle infecté. Les particules virales injectées vont infecter les cellules résidentes de la peau (macrophages, cellules dendritiques (DC, de l'anglais Dendritic cell), mastocytes). La réponse inflammatoire induite permet le recrutement des cellules NK (de l'anglais Natural killer) et des lymphocytes T. Après réplication les virus ZIKV et DENV vont se disséminer dans l'organisme par la circulation lymphatique. *Figure adaptée de (St. John et al. 2013).*

### III.7.2. La réponse immunitaire innée anti-ZIKV et anti-DENV

La réponse immunitaire innée est le premier mécanisme de défense contre l'invasion d'un pathogène dans l'organisme. Cette réponse immunitaire alerte les cellules spécialisées de la présence d'un pathogène et tente de contrôler l'infection jusqu'à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Lors d'une infection, une collaboration entre immunité innée et adaptative se mettra en place. La réponse immunitaire innée entraînant la synthèse de médiateurs et de molécules de co-activation des lymphocytes T, la mobilité cellulaire vers les tissus lymphoïdes secondaires et l'internalisation par phagocytose du pathogène puis la digestion de celui-ci au sein du phagolysosome. Les peptides issus de la digestion du pathogène seront alors exposés à la membrane des cellules immunitaires. Ces dernières migrent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate) où la réponse immunitaire adaptative sera initiée par présentation des antigènes aux lymphocytes T, permettant leur activation et différenciation.

Pour détecter l'invasion de pathogènes, les cellules de mammifères utilisent des récepteurs membranaires ou cytosoliques regroupés sous le nom de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, de l'anglais Pattern recognition receptor). Ces récepteurs sont des protéines capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, de l'anglais Pathogen-associated molecular pattern) ou associés aux dommages tissulaires (DAMP, de l'anglais Damage-associated molecular pattern). Les PRRs sont classés en 4 catégories : les récepteurs de type Toll (TLR, de l'anglais Toll-like receptor), les récepteurs de type RIG-I (RLR, de l'anglais Retinoid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor), les récepteurs de type NOD (NLR, NOD like-receptor) et les récepteurs de lectines de type C (CLR, C-type lectin receptor) (Kumar et al. 2011) (**Figure 27**). Et plus récemment, l'enzyme cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) a été identifiée comme un PRR pouvant détecter l'ADN cytosolique (Sun et al. 2013).



En ce qui concerne la reconnaissance des flavivirus, les récepteurs TLRs et les RLRs jouent un rôle majeur dans l'induction de la réponse antivirale. La fixation d'un ligand à ces récepteurs entraîne l'activation de protéines adaptatrices conduisant à la mise en place d'une cascade de signalisation qui entrainera la transcription de gènes codant pour de nombreuses chimiokines, interleukines et cytokines dont les interférons (IFNs) (Akira et al. 2006, Tisoncik et al. 2012, Turner et al. 2014).

### *III.7.2.1. Toll-Like Receptors (TLRs)*

Les TLRs sont des glycoprotéines transmembranaires exprimées en grande partie au niveau des cellules du système immunitaire. Ces récepteurs sont présents à la surface externe des membranes plasmiques des cellules ou sur les membranes internes des endosomes ou des lysosomes. Chaque TLR possède un domaine reconnaissant les motifs spécifiques des pathogènes et un domaine cytoplasmique activant les voies de signalisations permettant la mise en place d'une réponse cellulaire antivirale. Les TLRs reconnaissent une large variété de ligands incluant les peptidoglycanes bactériens (TLR1, -2 et -6), l'ARN double brin (TLR3), l'ADN (TLR9), l'ARN simple brin (TLR7 et -8) ou les lipopolysaccharides (TLR4) (Kawai & Akira 2006). Les TLR3 et TLR7, sont présents au niveau de la membrane des endosomes et semblent particulièrement impliqués dans la reconnaissance des ARNs viraux des flavivirus (Tsai et al. 2009, Vanwalscappel et al. 2018). La reconnaissance d'un ligand par les TLRs active des protéines telles que MyD88 ou TRIF qui vont activer à leur tour des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B et des facteurs de régulation de l'IFN comme les IRF3/7 conduisant à la production de molécules pro-inflammatoires dont l'IFN de type I (Kawasaki & Kawai 2014, Elong Ngono & Shresta 2018).

### *III.7.2.2. RIG-I-Like Receptor RLRs*

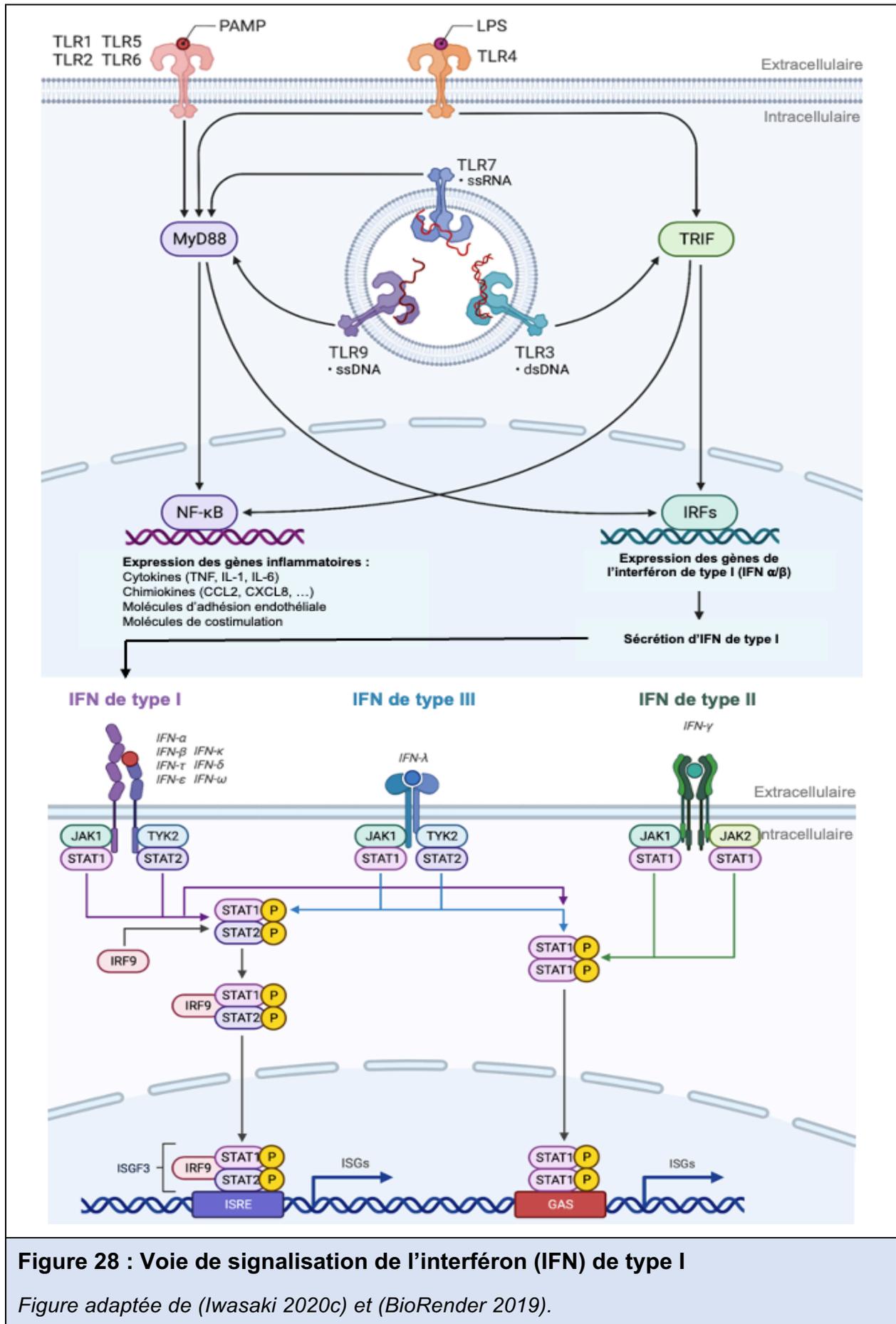
Les RLRs représentent une famille protéique comprenant : RIG-I, MDA5 (Melanoma differentiation-associated gene 5) et la protéine LGP2 (Laboratory of genetics and physiology protein 2), tous localisés dans le cytoplasme des cellules myéloïdes, épithéliales ou du système nerveux central (Loo & Gale 2011). Les récepteurs RIG-I et MDA5 possèdent un domaine hélicase qui reconnaît les ARNs viraux. RIG-I reconnaît préférentiellement des ARNs double brin avec un 5' triphosphate (Pichlmair et al. 2006), alors que MDA5 semble plus spécifique aux fragments d'ARN simple brin de haut poids moléculaire (Kato et al. 2008). LGP2 est un régulateur de la voie des RLRs qui interagit à la fois avec RIG-I et MDA5 (Sanchez David et al. 2019). Les récepteurs RIG-I et MDA5 possèdent deux domaines permettant l'activation des caspases et le recrutement du facteur protéique MAVS (Mitochondria antiviral-signaling protein). L'activation de la signalisation RIG-I/MDA-5 induit leur translocation au niveau de la membrane mitochondriale, activant MAVS et entraînant l'activation des facteurs de transcription IRF3/7 et NF- $\kappa$ B qui conduira à la mise en place d'une réponse antivirale par activation de la voie IFN (Seth et al. 2005).

*III.7.2.3. Activation et amplification de la réponse interféron de type I*

L'IFN est une cytokine pro-inflammatoire au cœur de la réponse immunitaire innée antivirale. Il existe différents types d'IFN que l'on peut classer en trois catégories, les IFN type I (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ), de type II (IFN- $\gamma$ ) et de type III (IFN- $\lambda$ ), selon les cellules productrices et leurs fonctions biologiques. Les IFNs de types I et III sont produits par des cellules infectées et sont impliqués dans des processus antiviraux alors que l'IFN de type II est produit par les lymphocytes et est essentiel pour la communication entre les différentes cellules immunitaires. Lors d'une infection par flavivirus, l'IFN de type I va en particulier limiter l'infection en activant l'expression de gènes qui limiteront la capacité des cellules infectées à répliquer le virus.

Physiologiquement, la production et la sécrétion d'IFN est un processus finement régulé dans nos cellules par des processus de contrôle et rétrocontrôle (**Figure 28**). La réponse à l'activation de l'IFN de type I est représentée comme une boucle d'amplification en deux étapes : **1)** L'induction de la réponse interféron est obtenue par l'activation des récepteurs PRRs et la translocation de l'IRF3 activée au noyau induisant la production d'IFN de type I par les cellules infectées. Une fois produits, l'IFN sera sécrété par la cellule pour permettre une signalisation autocrine et/ou paracrine. **2)** L'IFN de type I reconnaît un récepteur à la surface cellulaire nommé IFNAR constitué d'un hétérodimère de deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 (Pestka et al. 2004). Suite à l'activation des récepteurs IFNAR par l'IFN de type I, les deux kinases JAK1 (Janus kinase) et TYK2 (Tyrosine Kinase 2) associées aux domaines cytoplasmiques des récepteurs IFNAR sont phosphorylées et transmettent le signal aux facteurs de transcription STAT1 et STAT2 (Signal transducer and activator of transcription) qui seront phosphorylés à leur tour. Cette cascade d'activation conduit à la formation de l'hétérodimère STAT1/STAT2 qui migre dans le noyau et s'associe à IRF9 formant le complexe appelé ISGF3 (Interferon stimulated genes factor 3). Celui-ci active les éléments régulateurs stimulés par l'IFN (ISRE), favorisant l'expression de plus d'une centaine de gènes regroupés sous le nom de gènes stimulés par les IFNs (ISGs, de l'anglais Interferon-stimulated genes) (Schoggins & Rice 2011, Ivashkiv & Donlin 2014, Schneider et al. 2014).

- LES FLAVIVIRUS ZIKA ET DENGUE -



**Figure 28 : Voie de signalisation de l'interféron (IFN) de type I**

Figure adaptée de (Iwasaki 2020c) et (BioRender 2019).

Les ISGs représentent un large éventail de facteurs antiviraux qui assurent l'inhibition du cycle viral et l'élimination du pathogène. Les ISGs assurent de nombreuses fonctions qui peuvent être divisées en trois catégories : les effecteurs antiviraux qui ont une action directe contre les virus (OAS/RNase L, IFITM, Viperin, PKR), les régulateurs positifs de la voie de signalisation IFN (cGAS, IRF) et les inhibiteurs de la voie IFN (SOCs, Suppressor of cytokine signalling) (Fenner et al. 2006, Lin et al. 2009, Bailey et al. 2014, Schuler-Faccini et al. 2016, Vanwalscappel et al. 2018). D'autres ISGs sont exprimés dans une deuxième vague et agissent comme des répresseurs des mécanismes immunitaires innés, afin d'arrêter la réponse IFN après la résolution de l'infection virale (Schoggins 2014).

#### *III.7.2.4. Inhibition de l'immunité innée par les protéines virales*

Face aux mécanismes cellulaires mis en place lors de l'infection, les flavivirus ont développé des stratégies pour contrôler la réponse immunitaire innée. Ces stratégies ont pour objectif de favoriser la réplication virale tout en entravant la sécrétion d'IFN et/ou la transduction du signal par blocage des voies de signalisation.

À titre d'exemple, la reconnaissance de la protéine d'enveloppe E glycosylée diminue l'expression de TLR3 chez les macrophages (Kong et al. 2008). La sécrétion de la protéine NS1 inhibe la transduction du signal du TLR3, neutralise le système du complément et active l'inflammasome (Rastogi et al. 2016). Le complexe protéique NS2B-NS3 dégrade le facteur STING et la protéine JAK1 qui interviennent dans la production de nombreuses ISGs (Aguirre et al. 2012, Wu et al. 2017). La protéine NS3 par fixation au complexe RISC inhibe la dégradation des ARN viraux (Kakumani et al. 2015). Les protéines NS3 et NS4A entravent la synthèse d'IFN en limitant l'interaction de RIG-1 et MDA-5 avec la protéine MAVS (Dalrymple et al. 2015, Riedl et al. 2019). La protéine NS4B bloque l'action de DICER pour prévenir la dégradation de l'ARN viral (Kakumani et al. 2013). Les protéines NS4B et NS5 empêchent l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT1 et STAT2 (Muñoz-Jordán et al. 2005, Ashour et al. 2009). La protéine NS5 méthyle l'extrémité 5' du génome viral et le protège d'une détection par RIG-I (Chang et al. 2016). Enfin, les flavivirus produisent également des sfRNAs pour échapper à la détection et à la dégradation des ARNs viraux au cours de la réplication virale (Schnettler et al. 2012).

Certains mécanismes d'évasion semblent varier entre les souches d'une même espèce de flavivirus. À titre d'exemple, seule la NS4A de DENV-1, est capable de bloquer la signalisation de RIG-I en inhibant la phosphorylation de IRF3 (Dalrymple et al. 2015). L'apparition de mutations au sein des protéines virales participe également à cette stratégie d'évasion, comme l'apparition récente d'une mutation dans NS1 qui confère la capacité à cette protéine d'inhiber l'IFN de type I (Xia et al. 2018).

### III.7.3. La réponse immunitaire adaptative

Alors que l'immunité innée représente la première ligne de défense de l'hôte face à l'infection, l'immunité adaptative est impliquée dans l'élimination ciblée des pathogènes au cours des phases tardives de l'infection et dans la mise en place de la mémoire immunitaire. La réponse immunitaire adaptative passe par l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) et des lymphocytes T auxiliaires (CD4+) qui participent à l'activation des lymphocytes B, producteurs d'anticorps (Berger 2000).

#### III.7.3.1. La réponse cellulaire

Les chimiokines sécrétées sur le site d'inoculation du virus conduisent au recrutement des lymphocytes T sur le site de l'infection. Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) prolifèrent suite à l'identification de cellules infectées exposant à leur surface des peptides antigéniques liés au CMH de type I. Ces lymphocytes sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires (De Araújo et al. 2009), et lyse les cellules infectées par la libération de substances cytotoxiques (perforines et granzymes) ou par des interactions Fas-Fas ligand (Cattoretti et al. 1993, Putnak et al. 1996). Un équilibre dans la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T est alors nécessaire pour éviter les lésions tissulaires et l'apparition de maladies graves (King et al. 2007). Les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) contribuent au contrôle de l'infection par de multiples mécanismes dont la production de cytokines, l'activation et la maturation des lymphocytes B et une cytotoxicité directe (Luckheeram et al. 2012). Les lymphocytes B peuvent reconnaître des antigènes à l'état natif à la surface des pathogènes. Ces lymphocytes vont se comporter comme des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et présenter à leur surface des peptides antigéniques liés au CMH de type II, qui seront reconnus par les lymphocytes T auxiliaire (CD4+). Cela permettra l'activation et la différenciation des lymphocytes B (Pieper et al. 2013).

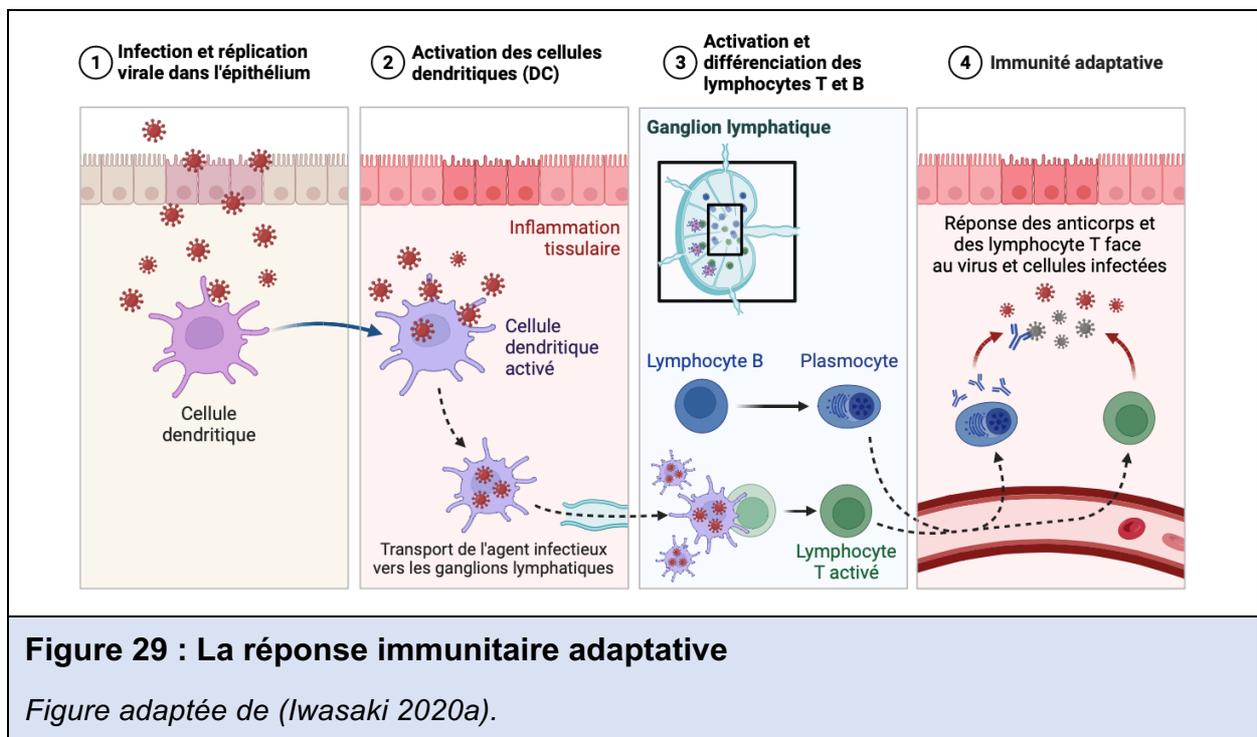
La mémoire immunitaire est constituée des lymphocytes B mémoires et des lymphocytes T mémoires qui proviennent de lymphocytes activés ne recevant plus de stimulation antigénique (Vitetta et al. 1991). Les lymphocytes B mémoire vont quitter les organes lymphoïdes secondaires pour la circulation sanguine et seront capables d'être rapidement sollicités en cas de seconde infection. Ces cellules vont continuer à se diviser très lentement pour maintenir un stock stable de lymphocytes B. Cette mémoire immunitaire est importante car elle permet une réponse de l'immunité rapide et efficace. En effet, après la détection d'un antigène déjà rencontré sur les CPAs, les lymphocytes T et les lymphocytes B vont être capables de s'activer à partir d'une concentration d'antigène beaucoup plus faible, de proliférer plus rapidement, de générer des récepteurs à l'antigène et des anticorps de meilleures affinités, en plus grande quantité et plus rapidement (Ratajczak et al. 2018).

### *III.7.3.2. La réponse humorale*

Lors d'une infection virale, la réponse humorale et lymphocytaire B, conduit à une production d'anticorps (IgM et IgG) pour éliminer efficacement les virus circulants (Dörner & Radbruch 2007) (**Figure 29**). Les IgM et IgG peuvent avoir des propriétés neutralisantes empêchant l'entrée du virus dans la cellule et sa dissémination aux cellules avoisinantes (Nybakken et al. 2005). Ces anticorps vont apparaître respectivement 3 à 7 jours et 8 à 12 jours après l'apparition des symptômes chez l'hôte infecté. Les IgM subiront une décroissance rapide de leur concentration après 15 jours, alors que les IgG pourront persister plusieurs années permettant l'établissement d'une immunité à long terme (Vaughn et al. 2000).

La grande majorité des anticorps neutralisants sont dirigés contre les protéines NS1, prM et E (Rey et al. 2018), en particulier l'EDIII qui intervient dans l'attachement de la protéine E aux récepteurs membranaires et qui expose à sa surface de nombreux épitopes antigéniques. En revanche, les anticorps à réactivité croisée dirigés par exemple contre la boucle de fusion conservée dans EDII ou contre la protéine prM sont faiblement neutralisants et pourrait favoriser une infection secondaire plus sévère (Rathore & St. John 2020). Ce mécanisme pourrait être expliquée par le phénomène d'ADE (Antibody dependent enhancement) qui est notamment décrit dans le cas des infections par DENV (Kulkarni 2020).

Des infections successives par différents sérotypes de DENV conduisent généralement à des formes sévères plus fréquentes (Rosen 1989). Ce phénomène d'exacerbation de la pathogénicité dépendant des anticorps est appelé « antibody-dependant enhancement » (ADE). Le mécanisme de facilitation dépend d'une formation de complexes immuns entre les virus infectieux et des anticorps non neutralisants ou sub-neutralisants (Guzman et al. 2013). Lors du phénomène d'ADE les anticorps dirigés contre le premier sérotype de DENV vont se fixer sur les particules virales d'un second sérotype, avec une moindre affinité. Ces particules virales complexées ne seront par conséquent pas inactivées.



**Figure 29 : La réponse immunitaire adaptative**

*Figure adaptée de (Iwasaki 2020a).*

Les complexes formés par le virus et les anticorps ont la capacité d'être endocytés par les macrophages et les monocytes grâce au récepteur aux chaînes lourdes des immunoglobulines (FcγR). Une fois à l'intérieur des cellules immunitaires, le virus non neutralisé conserve la capacité d'initier un cycle de réplication, même si ces cellules sont généralement résistantes à l'infection virale (Murphy & Whitehead 2011). Ce phénomène facilite l'entrée de DENV dans les cellules présentatrices d'antigènes, offrant ainsi une voie opportuniste d'infection des cellules immunitaires compétentes. Il a été démontré in vitro que ce phénomène pouvait s'étendre à d'autres flavivirus, tel que le virus ZIKV pour lequel la présence d'anticorps dirigés contre DENV pourrait induire une exacerbation de l'infectivité de ZIKV (Bardina et al. 2017).

D'autres voies de l'immunité sont également importantes dans le contrôle de l'infection par les flavivirus : le système du complément, les ARNs interférents, l'autophagie et en particulier le processus de mort cellulaire programmée nommée, apoptose, qui sera décrit plus en détail dans la partie suivante.

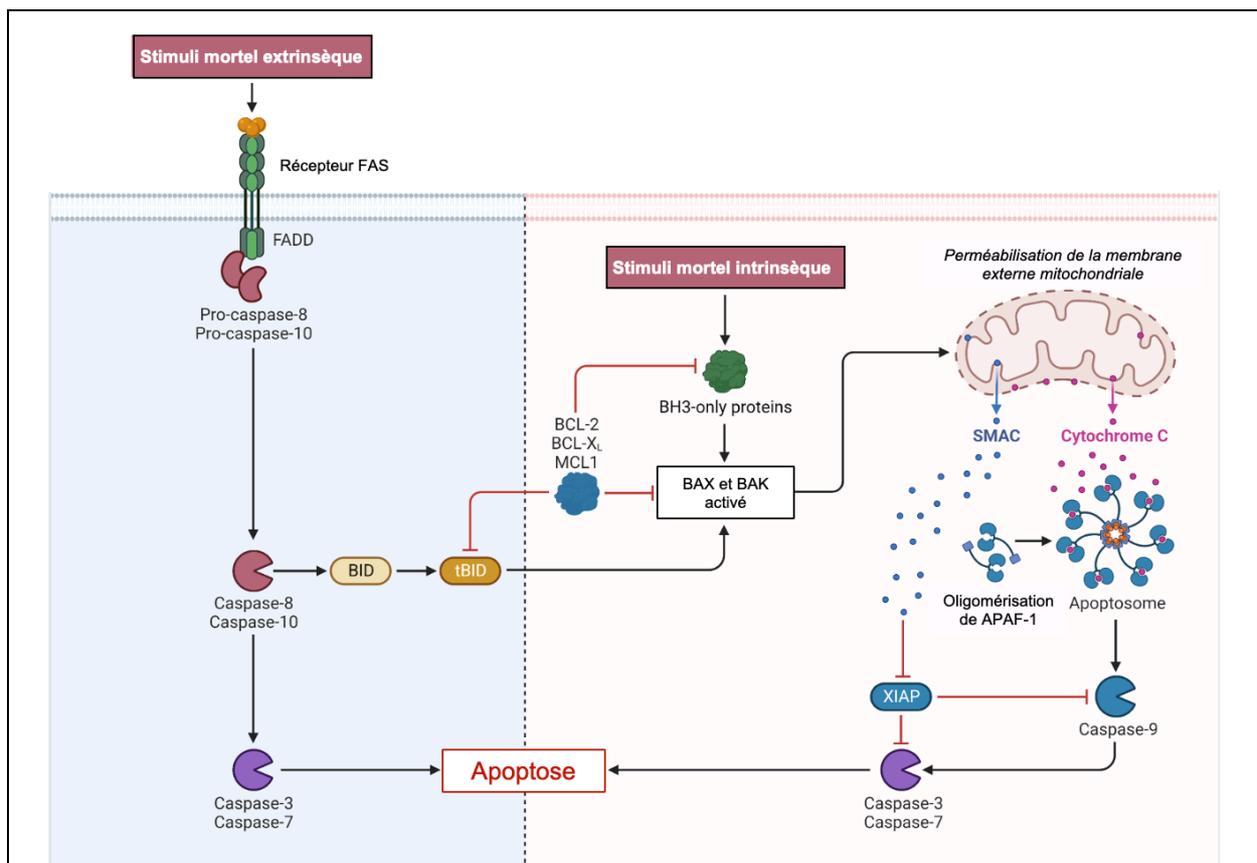
#### III.7.4. L'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire génétiquement programmée qui joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ce mécanisme de mort cellulaire planifiée permet l'élimination de cellules non-viables, endommagées, délétères, infectées, ou non nécessaires (Meier et al. 2000). Au cours de ce processus, l'apoptose facilite le recrutement des cellules immunitaires, notamment les macrophages, qui vont reconnaître les cellules mourantes et assurer leur élimination rapide en évitant le déclenchement des réponses inflammatoires (Depraetere 2000).

L'induction de l'apoptose au sein d'une cellule dépend de plusieurs signaux intra- et extracellulaires qui ensemble déclenchent l'activation de protéines spécialisées appelées caspases (Fink & Cookson 2005). Les caspases sont des enzymes exprimées, sous leur forme inactive, de manière constitutive au sein de nos cellules. Celles-ci s'activent soit par leur association avec des complexes protéiques de signalisation spécifiques (comme le complexe DISC pour la caspase 8 ou l'apoptosome pour la caspase 9), soit en réponse à l'activation d'autres caspases. Au total, 11 caspases ont été identifiées pour leur implication dans l'inflammation et l'apoptose. On peut distinguer les caspases en deux groupes : les caspases impliquées dans l'inflammation (Caspases 1, 4, 5 et 12) et les caspases impliquées dans l'apoptose (Caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10). Parmi les caspases directement impliquées dans l'apoptose, on distingue les caspases initiatrices (Caspases 2, 8, 9 et 10) qui répondent aux signaux déclencheurs et les caspases exécutrices (Caspases 3, 6 et 7) qui agissent comme les effecteurs finaux de l'apoptose en clivant de nombreux substrats cellulaires (Elmore 2007).

### III.7.4.1. La voie intrinsèque

L'induction intrinsèque de l'apoptose résulte de divers signaux intracellulaires qui influencent l'équilibre entre facteurs pro-apoptotique et anti-apoptotique, en particulier les protéines de la famille Bcl-2 (Bax, Bak, Bcl-x, ...). Ces protéines exercent leur action au niveau de la membrane mitochondriale externe en régulant sa perméabilité par la formation de pores membranaires (Westphal et al. 2011, Tait & Green 2013, Aubrey et al. 2018). La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie entraîne la libération du cytochrome-c, qui active APAF1 (de l'anglais, apoptosis protease activating factor-1). APAF-1 à son tour s'associera avec la pro-caspase 9 pour former un complexe macromoléculaire appelé apoptosome. L'apoptosome permettra l'activation de la caspase 9 (initiatrice) qui à son tour activera la caspase 3 (effectrice), marquant le début de la phase d'exécution de l'apoptose menant à la dégradation de nombreux substrats cellulaire dont la Poly ADP-ribose polymérase (PARP) (Malladi et al. 2009) (**Figure 30**).



**Figure 30 : Voie de signalisation de l'apoptose**

Figure adaptée de (Ona 2020)

#### *III.7.4.2. La voie extrinsèque*

L'induction extrinsèque de l'apoptose peut être déclenchée par une signalisation extracellulaire, qui implique des récepteurs de mort à la surface cellulaire, tels que les récepteurs TNFR (de l'anglais, Tumor necrosis factor receptors), les récepteurs Fas ou les récepteurs de mort (DR, Death receptor). Ces récepteurs cellulaires s'activent par liaison à leurs ligands respectifs (TNF, FasL, TRAIL), initiant la transmission du signal de mort, qui conduit à l'activation de la caspase 8 (initiatrice) suivie de l'activation des caspases exécutrices (Tummers & Green 2017).

#### *III.7.4.3. L'apoptose viro-induite*

Au cours d'une infection virale, la cellule infectée est soumise à une accumulation de plusieurs facteurs de stress. Parmi ces facteurs, on retrouve : **1)** l'activation du système immunitaire innée suite à la détection du virus, **2)** une surcharge en protéine au sein du réticulum endoplasmique, **3)** l'activation de la réponse UPR (Unfolded protein response) qui permet la dégradation de protéines mal repliées, **4)** une reprogrammation métabolique de la cellule par le virus, **5)** la production d'espèces réactives de l'oxygènes (ROS) et **6)** l'activation de l'autophagie. Tous ces facteurs de stress constituent autant de signaux qui serait potentiellement capables d'induire le processus de mort cellulaire par apoptose (Simon et al. 2000, Thyrell et al. 2002, Tabas & Ron 2011). Les protéines virales ont également la capacité de déclencher la réponse apoptotique. Les protéines structurales prM et E ont notamment été associées à l'apoptose induite par ZIKV et DENV (Liu et al. 2018, Li et al. 2019).

Au cours de l'infection, l'apoptose représente un obstacle pour le virus en interrompant la production de nouvelles particules virales. Par conséquent, tout retard dans le processus d'apoptose constitue un avantage crucial pour le virus, en lui offrant du temps supplémentaire pour la production d'une progénie virale. En co-évoluant avec leurs hôtes, les virus ont adaptés leur comportement pour contourner la réponse apoptotique ou l'exploiter à leur avantage. Les virus peuvent chercher à inhiber et/ou retarder l'apoptose afin de favoriser leur propre réplication, ou bien utiliser cette mort cellulaire pour faciliter leur dissémination tout en régulant les réponses immunitaires antivirales (Turpin et al. 2022).

## IV. Les protéines structurales de membrane (prM) et d'enveloppe (E)

Les protéines structurales prM et E jouent un rôle essentiel dans le cycle viral des flavivirus. En formant l'enveloppe virale ces protéines participent activement aux étapes d'entrée, de fusion, d'assemblage et de maturation virale, tout en représentant le principal antigène des flavivirus. Les protéines prM et E feront l'objet de mes travaux sur les virus ZIKV et DENV. Dans cette partie seront décrits la synthèse, la structure, le rôle et les fonctions connues de ces protéines virales.

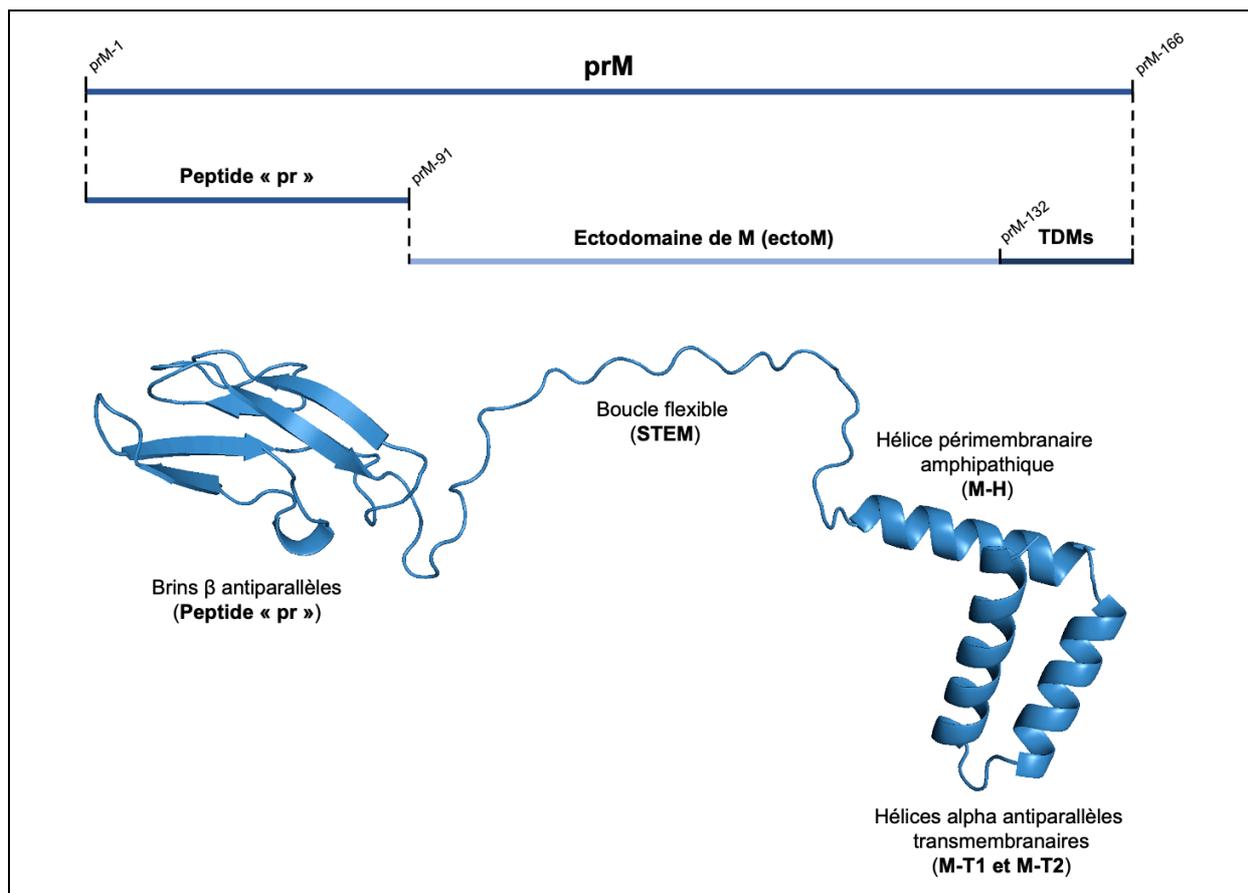
### IV.1. La protéine de membrane (prM/M)

#### IV.1.1. Synthèse de la protéine de membrane (prM/M)

La protéine prM (~ 26 kDa) est le précurseur glycosylé de la protéine structurale M qui est un composant majeur de l'enveloppe des flavivirus. Dans la polyprotéine virale, prM occupe la partie comprise entre 115 et 280 résidus, qui englobent le peptide « pr » (résidus 115-205) et la protéine M (résidus 206-280). Lors de la synthèse des protéines virales, le clivage entre les protéines C/prM, prM/E et E/NS1 nécessite un effort conjoint de la protéase NS2B-3 et des peptidases signal de l'hôte. La protéine de capsid (C) et prM sont liés entre eux par un peptide signal transmembranaire qui après clivage permettra la translocation de prM dans la lumière du RE.

#### IV.1.2. Structure de la protéine de membrane (prM/M)

La glycoprotéine prM (166 résidus d'acides aminés) se compose du peptide « pr » (résidus prM-1/91) suivi de la protéine M structurale de surface (résidus prM-92/166). Le peptide « pr » qui est en position N-terminale est organisé en sept brins  $\beta$  antiparallèles stabilisés par trois liaisons disulfures hautement conservées (Cys34-Cys68, Cys45-Cys80 et Cys53-Cys66) et contient un à trois sites de glycosylation (résidu N-69 pour ZIKV et DENV) (Chambers et al. 1990). La protéine M qui est en position C-terminale est divisée en trois régions : une boucle flexible N-terminale (Stem, résidus M-1/20), une hélice péri-membranaire amphipathique (M-H, résidus M-21/40) qui constitue l'ectodomaine de la protéine M, et de deux hélices alpha antiparallèles transmembranaires (M-T1 et M-T2, résidus M-41/75) formant une boucle en épingle à cheveux qui ancrent la prM à la membrane du RE (**Figure 31**).



**Figure 31 : Structure de la protéine précurseur de membrane prM**

Structure 3D de la protéine précurseur de membrane prM. La prédiction de la structure a été réalisée à l'aide du logiciel Swiss-Model et une séquence protéique Genbank (numéro de référence GenBank MN272404.1). Les images ont été élaborées à l'aide du logiciel PyMol.

### IV.1.3. Rôle et fonction de la protéine de membrane (prM/M)

#### IV.1.3.1. Rôle de protéine chaperonne

L'une des principales fonctions de la protéine prM/M est une activité de type chaperon aidant au repliement, à l'insertion dans la membrane, à la dimérisation et à la sécrétion de la protéine E (Konishi & Mason 1993). La présence de la protéine prM est essentielle, car en absence d'expression de celle-ci, la protéine E n'atteindra pas son état conformationnel final (Lorenz et al. 2002). La protéine prM garantit l'infectivité et l'intégrité du virion pendant le transport de la particule virale immature dans la voie de sécrétion. Pendant le transport des virions au travers du RE et de l'appareil de Golgi jusqu'à la surface cellulaire, la protéine prM agit comme un commutateur sensible au pH qui peut basculer sa conformation en fonction du pH environnant pour réguler l'état oligomérique de la protéine E. Ceci afin de prévenir tout réarrangement fusogénique prématuré ou fusion précoce dans des conditions de faible pH (Zheng et al. 2014).

Les particules virales immatures présentent 60 pointes trimériques de surface proéminentes et irrégulières. Chaque pic comprend un trimère d'hétérodimère prME. Dans cet état oligomérique, la protéine prM s'étend le long de la protéine E et pénètre dans la membrane lipidique pour former deux hélices antiparallèles. Le domaine « pr » de la protéine prM est positionné à l'extrémité externe de la protéine E, où il forme un bouclier qui protège le peptide de fusion de l'environnement cellulaire (Guirakhoo et al. 1991). Les peptides « pr » au sommet de chaque pointe trimérique sont les principaux contacts entre les protéines prM et E. Cette conformation est stable à pH neutre et provoque une gêne stérique qui bloque le site de clivage de la protéine prM avant l'entrée dans le réseau trans-golgien (Li et al. 2008). Le transit des virus dans les compartiments acides du trans-golgi entraîne un changement de conformation des protéines prM et E en fonction du pH, exposant le site de clivage aux furines de la protéine prM (résidu prM-91). Après le clivage protéolytique de la prM en sous-unités « pr » et M par des furines/subtilisines du compartiment post-golgien, le peptide « pr » clivé reste associé de manière non covalente à l'enveloppe virale jusqu'à ce qu'il soit libéré dans l'environnement extracellulaire à pH neutre. Ce changement de pH déstabilise une liaison hydrogène critique entre les résidus conservés du peptide « pr » (Asp-63) et de la protéine E (His-244), qui entraîne leur dissociation (Oliveira et al. 2017). Le clivage puis le relargage du peptide « pr » au sein des particules virales sont des étapes essentielles pour que celles-ci deviennent totalement infectieuses.

En plus de son rôle de chaperon pour la protéine E, l'interaction entre les protéines prM et E s'est avérée une étape essentielle pour l'assemblage des particules virales néo-synthétisées et leur sécrétion une fois qu'elles sont matures (Lin et al. 2010, Yoshii et al. 2012). La glycosylation de la protéine prM est essentielle à ces processus (Gwon et al. 2020). Outre son rôle structurel, la protéine membranaire (prM/M) aurait également de multiples fonctions au cours du cycle viral, permettant l'interaction de la particule virale avec des récepteurs cellulaires spécifiques (Che et al. 2013), jouant un rôle dans l'induction de l'apoptose dans les cellules infectées (Catteau, Kalinina, et al. 2003), interagissant avec diverses protéines cellulaires, y compris des protéines du cytosquelette (Brault et al. 2011), et en ayant un impact sur la dissémination et la transmission des flavivirus par leurs moustiques vecteurs (McElroy et al. 2006). Cependant, les fonctions de la protéine prM/M des flavivirus reste encore très peu connues.

*IV.1.3.2. Rôle dans la pathogénicité virale*

La protéine prM/M a récemment été associée à la pathogénèse induite par les flavivirus, la glycoprotéine structurale de membrane étant porteuse de déterminants de la virulence. Bien que les mécanismes impliqués soient encore peu caractérisés, la protéine prM semble jouer un rôle essentiel dans le cycle infectieux de ces virus.

À titre d'exemple, il a été démontré que l'hélice péri-membranaire de prM était impliquée dans l'entrée virale (Hsieh et al. 2011), et dans l'assemblage de nouvelles particules virales chez DENV (Pryor et al. 2004). Dans la région C-terminale de l'ectodomaine de la protéine prM, les résidus glutamate 32, tryptophane 34, leucine 36 et arginine 37 semblent être impliqués dans l'incorporation de la nucléocapside et la maturation des particules virales, alors que le résidu glutamate 22 semble promouvoir l'interaction des protéines prM et E (Hsieh et al. 2014). La protéine prM de ZIKV est associée à la croissance et à la pathogénèse du virus chez la souris (Inagaki et al. 2021), et la mutation S17N dans cette protéine semble associée à l'apparition d'une microcéphalie foetale (Yuan et al. 2017). La substitution d'un résidu leucine (L) par un résidu phénylalanine (F) en position 36 de la protéine M, dans les souches vaccinales YF-17D, semble être en partie responsable de l'incapacité de cette souche à infecter les moustiques et à s'y propager (McElroy et al. 2006). En revanche, la substitution du même résidu M-36 dans le JEV entraîne une atténuation complète du virus dans un modèle de souris (de Wispelaere et al. 2015).

Les protéines prM et M des flavivirus ont été décrites comme interagissant avec plusieurs facteurs cellulaires chez les mammifères hôtes et les moustiques vecteurs (Mairiang et al. 2013). L'ectodomaine de la protéine M de DENV est capable d'interagir avec les composants de la chaîne légère de la dynéine humaine (Tctex-1). L'inhibition de Tctex-1 réduit de manière significative la production de progénie virale, suggérant que Tctex-1 pourrait influencer l'assemblage ou la maturation du virus par le biais de ses interactions avec la protéine M (Brault et al. 2011). L'ensemble de ces observations suggère que la protéine prM joue également un rôle, non-structural, majeur dans le cycle infectieux.

#### *IV.1.3.3. Rôle dans l'induction de l'immunité innée*

La virulence et l'efficacité de réplication des flavivirus sont positivement corrélées à la capacité d'inhiber la production et le signal interféron de type I (IFN-I). La protéine prM joue un rôle important dans l'évitement de l'immunité innée de l'hôte en interagissant à la fois avec les protéines MDA5 et MAVS pour inhiber la production d'IFN-I. La protéine prM de ZIKV inhibe l'IFN-I induit par RIG-I, MDA5 et MAVS, tandis que la protéine prM de DENV-2 n'inhibe uniquement la production d'IFN- $\beta$  induite par MDA5. Mécaniquement, la protéine prM de ZIKV interagit à la fois avec les protéines MDA5 et MAVS, tandis que la protéine prM de DENV-2 se lie uniquement à MDA5 ou MAVS pour échapper à l'immunité innée. La protéine prM interfère avec la formation du complexe MDA5-MAVS, empêchant la translocation nucléaire et la dimérisation d'IRF3 pour inhiber la signalisation antivirale RLR et la production d'IFN-I (Sui et al. 2023).

#### *IV.1.3.4. Rôle de la protéine M mature dans l'induction de l'apoptose*

L'expression de l'ectodomaine de la protéine M (résidu M-1/40) des flavivirus DENV, YFV, JEV et WNV semble être capable d'induire l'apoptose dans les cellules humaines (Catteau, Kalinina, et al. 2003). De manière intéressante, la capacité de l'ectodomaine de M à induire l'apoptose nécessite l'activation de la caspase-3 et son transport dans la voie de sécrétion cellulaire (Catteau, Roué, et al. 2003). La capacité de la protéine M à promouvoir la mort a été limitée à un oligopeptide représentant les derniers acides aminés C-terminaux de l'ectodomaine de la protéine M. Au sein de cet oligopeptide les résidus M-33, M-35, M-38 d'une part et le résidu M-36 d'autre part semblent jouer un rôle crucial dans l'activité pro-apoptotique induite par ce peptide (Catteau, Kalinina, et al. 2003, Vanwalscappel et al. 2020). De plus, le résidu M-36 a déjà été identifié comme jouant un rôle important dans plusieurs aspects du cycle de réplication du virus : l'assemblage, la sécrétion et la modulation de la pathogénicité des flavivirus (Hsieh et al. 2014, de Wispelaere et al. 2016, Basset et al. 2020).

> *Le rôle pro-apoptotique de la protéine de membrane (prM/M) sera discuté plus en détail au cours de mes travaux dans les sections « Partie III : Travaux de recherche », page 121 et « Partie IV : Discussion générale et perspectives », page 179.*

## IV.2. La protéine d'enveloppe (E)

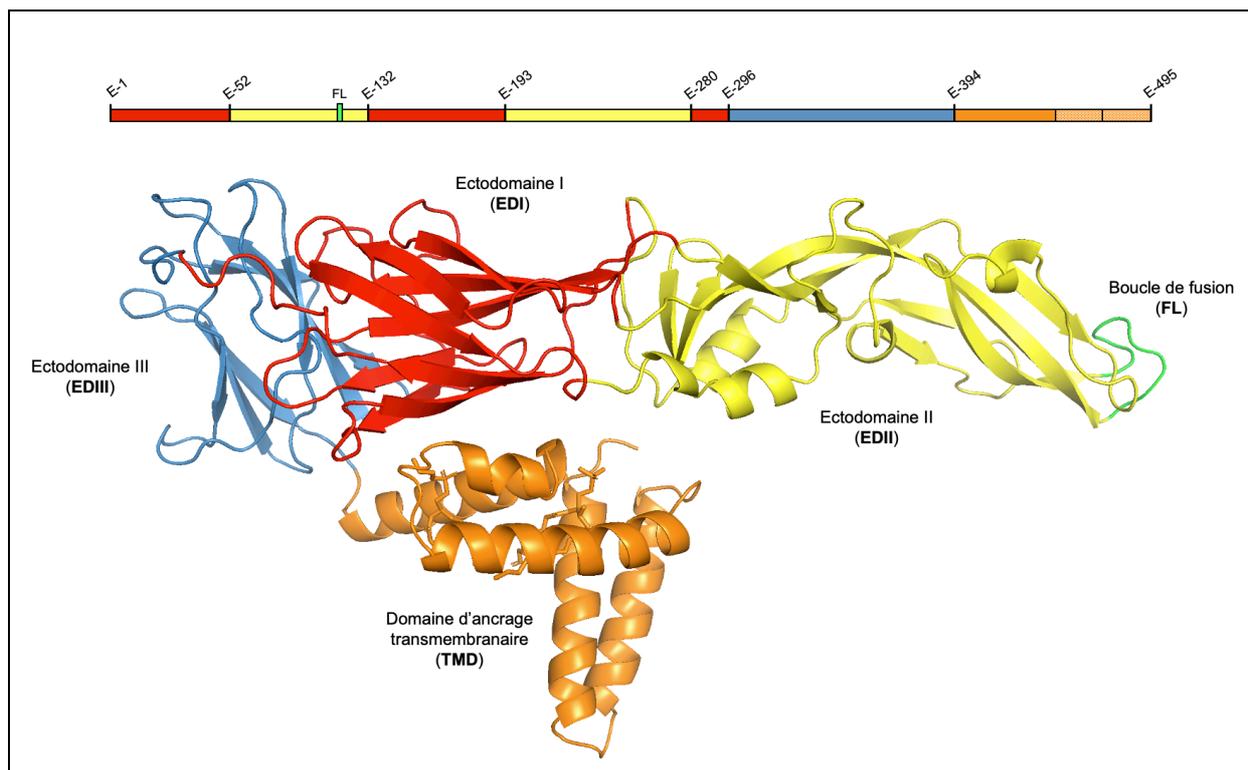
La protéine E est la principale protéine exposée à la surface du virion et joue un rôle fondamental dans le cycle viral des flavivirus. La protéine E assure à la fois la liaison aux récepteurs et la fusion avec la cellule cible (Heinz & Allison 2000). En outre, la protéine E suscite également une réponse des anticorps, étant le principal antigène des particules virales matures (Rey et al. 2018).

### IV.2.1. Synthèse de la protéine d'enveloppe (E)

La protéine E glycosylée est une protéine de fusion de classe II multifonctionnelle qui fait partie intégrante du virion. Dans la polyprotéine virale, le segment de la protéine E (résidus 281-775) est localisé dans le RE en étant associé à la protéine prM. La protéine d'enveloppe (E) est composée d'un ectodomaine dans sa partie N-terminale (résidus E-1/394) et de deux domaines transmembranaires dans sa partie C-terminale (résidus E-395/495). Comme la protéine prM, la protéine E est transloquée dans le RE lors du clivage des protéines de structure et reste ancrée à la membrane (Dey et al. 2021).

### IV.2.2. Structure de la protéine d'enveloppe (E)

L'ectodomaine N-terminal est constitué de trois domaines structuraux fonctionnels : le domaine I (EDI), le domaine II (EDII) et le domaine III (EDIII) qui sont reliés par des charnières flexibles qui assurent la mise en place des changements conformationnels irréversibles au cours du cycle de vie viral (Modis et al. 2004) (**Figure 32**). La région d'ancrage transmembranaire C-terminale comprend une tige (résidus E-395/451) qui est constituée de deux hélices amphipathiques associées à la membrane et d'une ancre transmembranaire (résidus E-452/495) constituée de deux hélices transmembranaires antiparallèles qui sont intégrées dans la membrane virale (Zhang et al. 2003). Les deux hélices transmembranaires (résidus E-452/479 et E482/495) de la protéine E fonctionnent de manière similaire à celles de la protéine prM, avec une séquence d'arrêt de transfert et une séquence de signal également présentes qui dirigent la localisation et le traitement appropriés de la protéine NS1.



**Figure 32 : Structure de la protéine d'enveloppe (E)**

Structure 3D de la protéine d'enveloppe E. La prédiction de la structure a été obtenue à partir de Genbank (numéro de référence GenBank MN272404.1) et réalisée à l'aide du logiciel Swiss-Model. Les images ont été élaborées à l'aide du logiciel PyMol.

#### IV.2.2. Rôle et fonction de la protéine d'enveloppe (E)

##### IV.2.2.1. L'ectodomaine I (EDI)

EDI est constitué de parties non contiguës de l'ectodomaine de la protéine E, composées d'environ 120 résidus répartis en trois segments principaux (résidus E-1/52, E-132/193, et E-280/296). EDI forme une structure en feuillet  $\beta$  à huit brins qui est située au centre de la protéine E. EDI est flanqué d'un côté par le dimère allongé EDII et de l'autre côté par le domaine EDIII de type immunoglobuline (Rey et al. 1995). La position centrale de ce domaine lui permet de fonctionner comme une charnière en forme de pont et de stabiliser le noyau protéique, cela en contribuant aux nombreux changements conformationnel que la protéine E doit subir pendant les étapes de maturation et de fusion du cycle viral (**Figure 33**). Des mutations dans la région charnière entre DI et DII peuvent atténuer DENV et WNV, suggérant que la capacité de EDI à être flexible est impérative pour la pathogenèse des flavivirus (Goo et al. 2017).

EDI contient un résidu asparagine (N) capable d'accepter une glycosylation pendant la maturation du virus. Cependant, l'emplacement de ce site de glycosylation n'est pas le même pour tous les flavivirus. À titre d'exemple, les quatre sérotypes de DENV contiennent tous un site de glycosylation lié à l'azote en position N-153, tandis que ZIKV en contient un en position N-154, qui est également plus long de cinq acides aminés (Cox et al. 2015). Curieusement, certaines souches de ZIKV de la lignée africaine ne contiennent aucun site de glycosylation alors que toutes les souches de ZIKV de la lignée asiatique sont glycosylées en N-154 (Carbaugh et al. 2019). La glycosylation de EDI est liée à la production efficace de virions, à la sensibilité au pH et à la neuroinvasivité des flavivirus (Carbaugh & Lazear 2020). La mutation d'un seul résidu qui abrogerait la glycosylation de EDI diminuerait les niveaux d'attachement cellulaire et la neurovirulence chez la souris (Beasley et al. 2005, Hanna et al. 2005).

#### *IV.2.2.2. L'ectodomaine II (EDII)*

EDII est constitué de segments non contigus de l'ectodomaine de la protéine E. EDII est un domaine de dimérisation, formé de deux structures en feuillets  $\beta$  reliées par des boucles flexibles et deux courtes hélices qui intercalent les trois segments d'EDI (résidus E-52/132 et E-133/280). Le domaine EDII est impliqué dans la dimérisation de la protéine d'enveloppe et dans la fusion des membranes virales et cellulaires lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte (Nicholls et al. 2020).

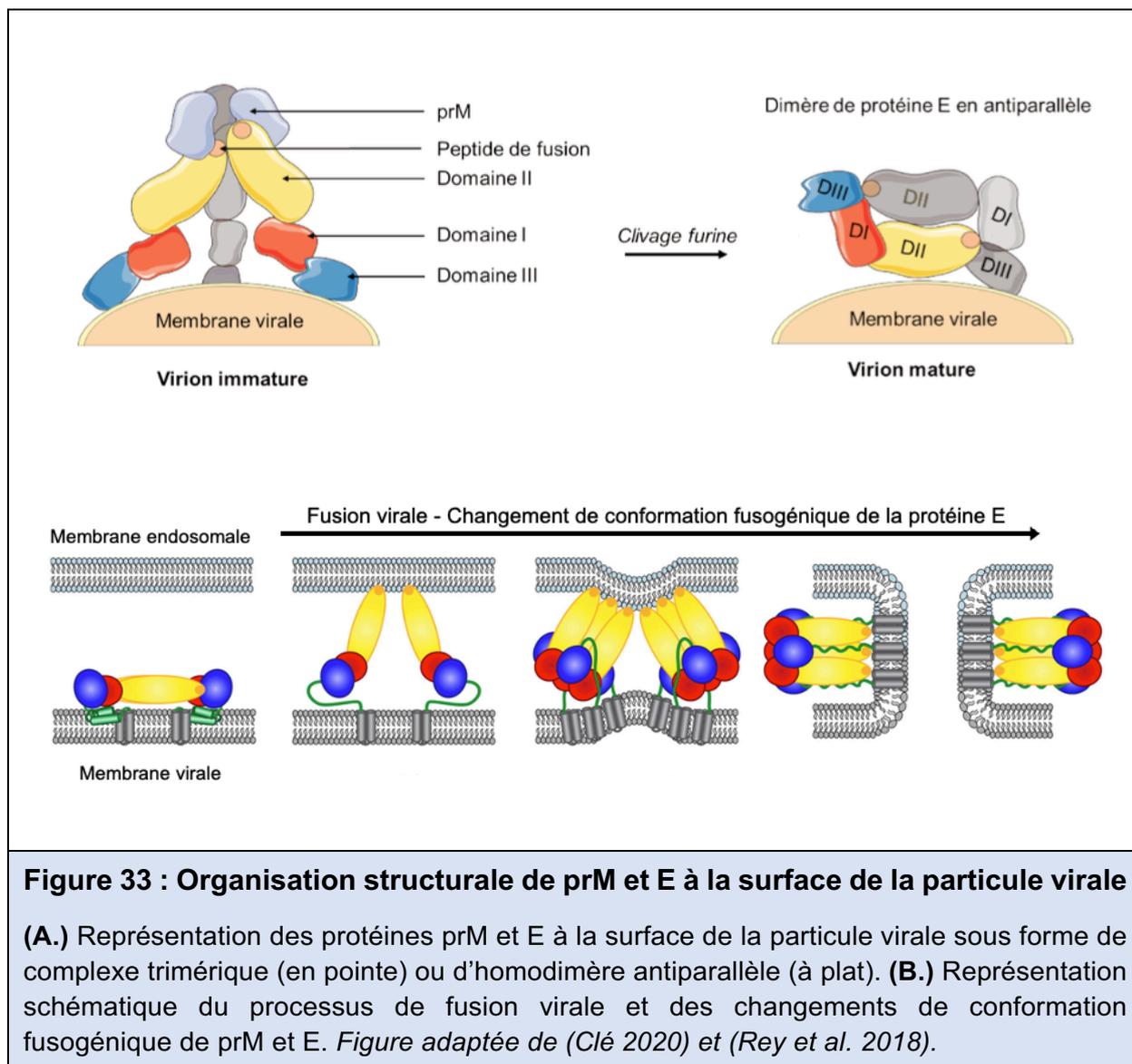
À son extrémité distale, EDII contient une boucle de fusion (FL, fusion loop) qui participe à l'interaction avec la membrane de la cellule hôte et sert de médiateur à la fusion des membranes virales et endosomales lors de l'entrée du virus. La boucle de fusion est une séquence hydrophobe hautement conservée de 13 acides aminés (résidu E-98/110) chez tous les flavivirus (Zhang et al. 2017). La boucle de fusion est protégée par prM dans le virus immature et par EDI et EDIII qui forment une poche hydrophobe à l'intérieur du dimère de E dans le virus mature. Cette boucle est cependant exposée lorsque l'environnement acide déclenche des changements de conformation de la protéine E, permettant son interaction avec la membrane endosomale pendant l'étape de fusion virale (Allison et al. 2001). D'autre part, EDII contient de nombreux peptides qui induisent des réactions immunogènes croisées, en particulier la boucle de fusion EDII qui permet la production d'anticorps neutralisants utilisés comme outils pour des nombreux candidats vaccins (Chiou et al. 2012).

En plus de EDI, il a été démontré que EDII des quatre sérotypes de DENV contient un autre résidu asparagine (N) capable d'accepter une glycosylation pendant la maturation du virus à la position N-67 (Lee et al. 2010). Parmi les flavivirus, seul EDII de DENV porte un N-glycane en position N-67, qui semble être crucial pour son interaction au récepteur DC-SIGN lors de l'attachement et de l'entrée virale (Goto et al. 2005, Carbaugh et al. 2019). La glycosylation de la protéine E a été rapportée comme facilitant la liaison aux récepteurs cellulaires et à la protection de la boucle de fusion en agissant comme un bouclier épitopique (Mukhopadhyay et al. 2005).

#### *IV.2.2.3. L'ectodomaine III (EDIII)*

EDIII contient une partie contiguë de résidus au sein de la protéine E (résidus E-296/394). EDIII est un domaine de type immunoglobuline présent dans la région C-terminale de l'ectodomaine de la protéine E. Ce domaine est relié à EDII par un lien flexible qui le place du côté opposé à EDI. EDIII forme une structure glomérulaire composée de 7 brins- $\beta$  antiparallèles. Les brins  $\beta$  se replient au sein d'un domaine immunoglobuline très conservé et relativement indépendant qui interagirait avec des récepteurs cellulaires (Volk et al. 2009). EDIII joue alors un rôle clé dans les étapes d'entrée du virus au sein de la cellule hôte en interagissant avec des récepteurs et facteurs d'attachement cellulaire (Modis et al. 2005). Ce domaine expose notamment les principaux épitopes de la particule virale ciblés par les anticorps neutralisants (Seligman & Bucher 2003, Pierson & Diamond 2008).

EDIII s'étend hors de la surface de la particule virale mature pour former des apophyses qui semblent contenir de nombreux épitopes antigéniques linéaires pour la liaison aux récepteurs de l'hôte et aux anticorps neutralisants (Chávez et al. 2010). Les épitopes neutralisants présents dans EDIII sont particulièrement conservés parmi plusieurs virus représentant la principale structure antigénique des flavivirus. À titre d'exemple, les épitopes EDIII sont notamment constitués des résidus E-307, E-333/351 et E-383/389 chez DENV (Lin et al. 2015). Les mutations dans EDIII affectent généralement le tropisme et la virulence de DENV, permettant au virus d'échapper à la neutralisation des anticorps. Ce domaine a été utilisé avec succès comme antigène pour le diagnostic sérologique et a attiré l'attention en tant que candidat prometteur pour le développement de nouvelles stratégies vaccinales (Chávez et al. 2010).



#### IV.2.2.4. Le domaine d'ancrage transmembranaire (TMD)

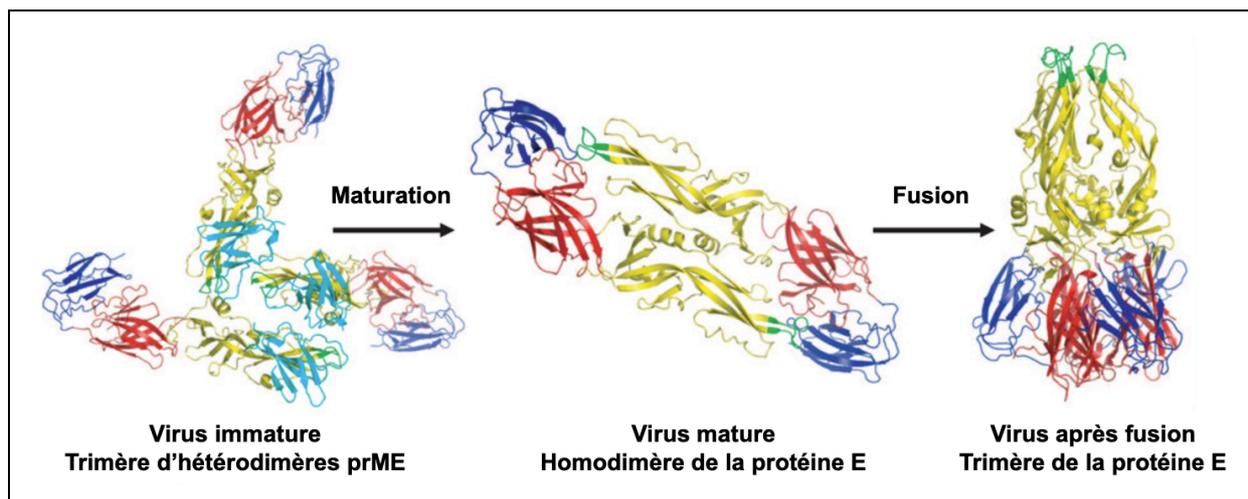
La région d'ancrage transmembranaire joue un rôle crucial lors de la fusion et de l'assemblage des virions en affectant l'interaction des protéines prM et E. Pour que la fusion ait lieu, il est nécessaire que EDIII subisse un changement conformationnel et que EDII s'allonge pour exposer la boucle de fusion à l'extrémité distale de EDII (Chao et al. 2014). Pour ce faire, la tige d'ancrage transmembranaire est réorganisée, modifiant sa conformation et permettant une stabilisation des trimères prME. Les monomères E sont ainsi inversés et les ancres transmembranaires se regroupent autour des boucles de fusion nouvellement exposées à la surface trimérique, ce qui entraîne la fusion de la membrane et la libération du génome. Il a été démontré qu'une perturbation de la relocalisation de EDIII ou une inhibition de la réorganisation de la tige d'ancrage membranaire inhibe l'infection par DENV (Liao & Kielian 2005).

En plus de servir d'ancre transmembranaire, les TMDs des protéines prM et E contiennent des séquences de rétention dans le RE qui servent à maintenir les protéines dans le réticulum et à empêcher leur dégradation prématurée avant que la production des protéines virales ne soit suffisante pour l'assemblage du virion (Op De Beeck et al. 2004). En étant insérés dans une membrane cellulaire, les domaines transmembranaires participent également au processus de bourgeonnement viral et sont nécessaires pour isoler les fractions de la membrane cellulaire qui deviendront des parties de l'enveloppe virale.

De manière intéressante, le remplacement de la tige d'ancrage transmembranaire de la protéine E de DENV-2 par celle de la protéine E du JEV augmente la sécrétion des protéines E de DENV (Chang et al. 2003). Cela suggère que la capacité de rétention des TMDs à la membrane du RE semble être spécifique au virus et pourrait être essentielle pour l'assemblage des virions. Il est également intéressant de noter que la présence de TMDs constituées de deux hélices transmembranaires à l'extrémité C-terminale de toutes les protéines E des flavivirus est tout à fait unique parmi les protéines de fusion virales de classe II, qui contiennent généralement toutes des TMDs constituées uniquement d'une seule hélice transmembranaire (White et al. 2008).

### IV.3. Interaction des protéines de membrane (prM/M) et d'enveloppe (E)

Peu de temps après la traduction de la polyprotéine et le clivage de celle-ci par les protéases cellulaires et virales, les protéines prM et E s'associent pour former des hétérodimères stables (Lorenz et al. 2002). Les hétérodimères prME se retrouvent alors ancrés à la membrane du RE par leurs domaines d'ancrage transmembranaires. Viennent les étapes d'assemblage, de maturation et d'entrée des flavivirus au sein de la cellule hôte qui feront appel à des organites tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les endosomes, qui présentent des disparités marquées en termes d'acidité (Demaurex 2002). Au cours de ces différentes étapes, les interactions hétérodimériques entre les protéines prM et E semblent être essentielles pour le bon réarrangement conformationnel de la protéine E suite aux variations de pH. Cette dernière pouvant adopter des états oligomériques variés : sous la forme de trimères d'hétérodimères prME dans les particules immatures, de dimères au sein des virus matures, ou de trimères lors de la fusion (Dey et al. 2021) (**Figure 34**).



**Figure 34 : États oligomériques de la protéine E au cours du cycle viral**

Dans la particule immature, la protéine E forme un trimère d'hétérodimères prME, qui doit se dissocier et former des homodimères de protéine E au cours de la maturation. Ceux-ci subissent ensuite une nouvelle réorganisation pour former des homotrimères E avant la fusion et l'entrée du virus. *Figure adaptée de (Perera et al. 2008)*

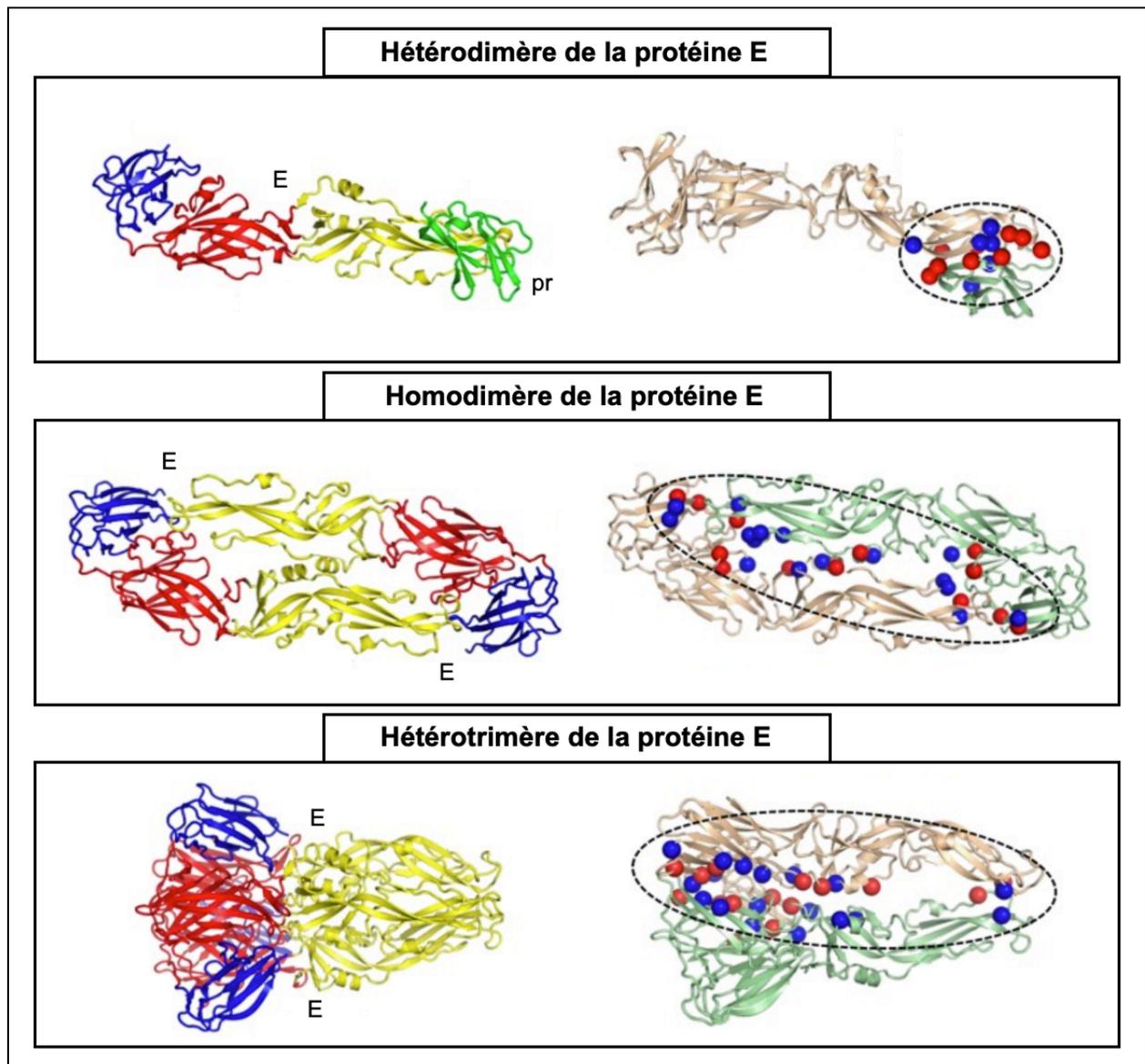
Le premier réarrangement majeur des hétérodimères prME se produit au cours de la maturation des particules virales. Les hétérodimères prME s'agencent en trimères pour former une structure en tripode inversé caractéristique des virions immatures chez les flavivirus. Dans le réseau trans-golgien des changements conformationnels irréversible induit par des variations de pH vont conduire au clivage de la protéine prM par les furines cellulaires. Au cours de cette maturation, 60 trimères d'hétérodimère prME vont se dissocier pour former 90 homodimères de la protéine E, qui s'associeront entre eux pour former 30 radeaux constitués de trois dimères parallèles (Sirohi et al. 2016).

Le deuxième réarrangement majeur des hétérodimères prME se produit lors de la fusion de la particule virale avec les membranes endosomales de la cellule hôte. L'environnement acide de l'endosome déclenche une trimérisation irréversible de la protéine E. Les homodimères antiparallèles de la protéine E se dissocient alors en monomères, qui se réassembleront en homo-trimères parallèles. Au sein de chaque trimère, l'EDII des protéines E se projette vers les membranes de la cellule hôte en exposant à leur extrémité le peptide de fusion (Mendes et al. 2012). Celui-ci s'insère dans la membrane endosomale entraînant des changements conformationnels de l'ectodomaine de la protéine E et permet le rapprochement des membranes cellulaires et virales (**Figure 33**).

L'association de l'hétérodimère prME est principalement stabilisée par des interactions hydrophobes et implique la participation de résidus sensibles au pH tels que : His, Lys, Arg, Asp ou Glu (Dey et al. 2021) (**Figure 35**). Les régions protéiques formant l'interface des sous-unités prM et E de l'hétérodimère présentent notamment une forte concentration de résidus facilement protonables. Ces régions sont principalement basiques dans la protéine E et acide dans la protéine prM. Lorsqu'il s'agit d'un homodimère E, l'interface est caractérisée par une prédominance de résidus chargés négativement dans un monomère, en complément des résidus chargés positivement du second monomère. Ces interactions électrostatiques complémentaires se retrouvent également au sein des homotrimères de E. Il est intéressant de noter que malgré la relativement faible homologie de séquence qu'il existe entre les protéines E de ZIKV et DENV, la conformation spécifique de la protéine E semble conserver. Cela souligne que la similitude de séquence n'est pas le seul facteur déterminant, mais que la conformation tridimensionnelle joue également un rôle crucial dans la fonctionnalité de la protéine E.

Au sein de la protéine prM, plusieurs résidus se sont révélés essentiels dans l'hétérodimérisation des protéines prM et E. À titre d'exemple, le résidu His en position prM-99 dans JEV (Lin & Wu 2005), le résidu Tyr en position prM-78 dans WNV (Fiacre et al. 2020), ou encore le résidu His en position M-39 dans DENV (Pryor et al. 2004), ont tous été identifiés comme étant cruciaux pour la formation et la stabilité des hétérodimères prME, ainsi que pour l'efficacité de l'assemblage viral. D'autre part, des études ont rapporté que la mutation du résidu Ile en position M-36 dans JEV et WNV (de Wispelaere et al. 2016, Basset et al. 2020), et des résidus prM-120/123/127 dans DENV (Hsieh et al. 2011), pouvait induire une atténuation virale qui serait également associée à une perturbation de l'assemblage du virus. Dans la même dynamique, Zhang et ses collègues ont également identifié chez DENV plusieurs résidus hautement conservés dans les protéines M et E qui interagissent les uns avec les autres pour former des "binding pockets" qui ont été décrits comme jouant un rôle crucial dans la stabilité de la particule virale (Xiaokang Zhang et al. 2013).

Les protéines prM et E sont donc essentiels au cours du cycle virale, aussi bien en terme structurale, que fonctionnel. L'interaction de ces deux protéines semblent primordiale, et pourrait être fortement impactée par la mutation de résidus conservés.



**Figure 35 : Interactions des protéines structurales prM et E**

Regroupement des résidus protonables dans l'assemblage des protéines structurales prM et E. Les résidus acides (Asp et Glu) et basiques (His, Lys, Arg) sont représentés par des sphères rouges et bleues, respectivement. L'interface protéine-protéine entre pr et E des flavivirus est enrichie en résidus protonables, qui fournissent une base structurelle pour la détection du pH et les changements de conformation. \*Seuls deux des trois monomères de l'homotrimer E sont représentés pour plus de clarté. *Figure adaptée de (Dey et al. 2021).*



# **Partie II : Rationnel & Objectifs**

Le virus de la Dengue (DENV) et le virus Zika (ZIKV) sont des flavivirus majeurs en termes de santé publique. Depuis ces dernières décennies, nous assistons à une expansion rapide de la dengue particulièrement associée au sérotype DENV-2 du génotype Cosmopolitan, qui s'accompagne d'une sévérité accrue de la maladie dans un nombre croissant de régions tropicales et subtropicales de la planète. Les territoires du sud-ouest de l'océan Indien (SOOI) ont récemment connu des épidémies fulgurantes de dengue, avec plusieurs dizaines de milliers de cas d'infection signalés à l'île de La Réunion entre 2018 et 2023. Malheureusement, peu d'informations sont disponibles sur les caractéristiques biologiques et le potentiel épidémique des souches virales qui circulent dans cette région. La région SOOI est un carrefour d'activités commerciales et de déplacements humains qui favorise la circulation active des flavivirus. La présence de moustiques vecteurs et des conditions environnementales favorables serait alors propice à l'endémicité de DENV et une potentielle introduction de flavivirus apparentés, comme ZIKV, en particulier sur l'île de La Réunion.

Devant ce constat, notre unité de recherche l'UMR PIMIT basée à La Réunion, a lancé plusieurs programmes de recherche portant sur l'étude des protéines virales connues pour leur rôle dans le pouvoir pathogène des flavivirus DENV et ZIKV. L'objectif principal de ces études étant d'apporter de nouvelles connaissances d'un point de vue virologique sur la biologie des flavivirus, leurs déterminants viraux et leurs mécanismes d'action en relation avec leur hôte et vecteur moustique. À titre d'exemple, des travaux antérieurs menés au sein de notre unité de recherche ont permis de caractériser la glycoprotéine non-structurale 1 (NS1) de la souche épidémique de DENV-2 à La Réunion en 2018-19 (Ogire et al. 2021, Ogire et al. 2023). Cela en comparant l'expression de protéines NS1 recombinantes obtenues de ce virus et d'une seconde souche épidémique du génotype Cosmopolitan qui avait été isolée d'un cas clinique en Tanzanie en 2014.

Dans la continuité des travaux développés au sein de l'UMR PIMIT, mon sujet de thèse s'est orienté sur la caractérisation des protéines structurales de membrane (prM/M) et d'enveloppe (E) des flavivirus DENV et ZIKV. Mon objectif principal étant l'identification puis la caractérisation des déterminants viraux présents au sein des protéines prM/M et E qui pourraient influencer sur le pouvoir pathogène de DENV et ZIKV. Cela afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques et de développer de nouveaux outils virologiques qui pourront faire l'objet de stratégies de lutte efficace.

Au début de ma thèse, mon équipe d'accueil développait un projet d'étude sur les protéines prM/M et E de ZIKV. Ces travaux se focalisaient d'une part sur l'étude des propriétés biologiques de la glycoprotéine E en analysant le rôle antigénique de la boucle de glycosylation (GL, de l'anglais Glycan loop) et d'autre part sur la capacité de la protéine prM/M à induire les mécanismes de mort cellulaire par apoptose. Les flavivirus DENV et ZIKV étant grandement apparentés, j'ai décidé de me former à l'analyse des protéines structurales de DENV en m'associant au projet de recherche déjà lancé sur ZIKV. Mon implication dans ces travaux menés sur ZIKV m'a permis de m'initier à la caractérisation des protéines prM et E de la souche épidémique DENV-2 qui fut responsable de la première vague épidémique de dengue à La Réunion en 2018-19. J'ai alors développé un projet de recherche sur la caractérisation des glycoprotéines prM et E de DENV-2 du génotype Cosmopolitan produites sous la forme de protéines recombinantes exprimées dans des lignées cellulaires d'origine humaine. Mes travaux forment la première étude sur le sujet à ma connaissance et seront décrits plus en détails dans la section suivante « *Partie III : Travaux de recherche* », page 121. L'ensemble des travaux réalisés au cours de ma thèse se sont donc organisés autour de trois grands axes de recherche :

**Premier axe de recherche :** *Étudier le rôle de la boucle de glycosylation du virus Zika dans la réactivité antigénique de la protéine d'enveloppe (E).*

La protéine E représente l'antigène majoritaire des flavivirus en étant la principale protéine exposée à la surface de la particule virale. Il existe une différence importante entre les protéines d'enveloppe de DENV et ZIKV qui réside dans leur boucle de glycosylation (GL, de l'anglais glycan loop). En effet, la structure GL chez ZIKV est plus longue de 6 à 9 acides aminés supplémentaires par rapport à celle identifiée chez DENV. Au sein de la particule virale de ZIKV, la structure GL qui est exposée par un protomère de E aurait la capacité de recouvrir en partie son équivalent présent sur le protomère adjacent (Sirohi et al. 2016). Un tel chevauchement spatial pourrait influencer sur l'accessibilité des anticorps aux épitopes de neutralisation à la surface de la particule virale (Goo et al. 2018). Par conséquent, nous avons investigué l'importance de GL dans l'antigénicité de la protéine E et le rôle des résidus E-152, E-156 et E-158 qui diffèrent entre les GLs des lignées asiatiques et africaines de ZIKV (Article 1).

**Deuxième axe de recherche :** *Étudier la capacité de la protéine prM/M du virus Zika et du virus de la Dengue à induire les mécanismes de mort cellulaire par apoptose.*

Les résidus M-31/41 qui composent l'extrémité C-terminale de l'ectodomaine de la protéine M mature des flavivirus d'intérêt médical ont la propriété de déclencher la mort cellulaire par apoptose lorsqu'ils sont distribués dans un compartiment post-Golgien. Ce peptide pro-apoptotique de la protéine M avait été caractérisé chez DENV mais n'avait pas encore été identifié chez ZIKV avant le démarrage de notre étude. Sachant que l'induction de la mort cellulaire par apoptose est un effet cytopathique important dans l'infection par ZIKV, notre objectif a été d'évaluer la capacité de l'ectodomaine M de ZIKV à induire l'apoptose. Nous avons alors examiné l'activité pro-apoptotique de l'oligopeptide M-31/41 de ZIKV couplé à une protéine rapportrice GFP ou à un antigène associé aux tumeurs, dans l'objectif de démontrer la capacité de ces résidus à induire l'apoptose dans les cellules humaines (Article 2).

**Troisième axe de recherche :** *Identifier et caractériser les déterminants viraux des protéines prM et E qui pourrait influencer sur le pouvoir pathogène des souches virales DENV-2 du génotype Cosmopolitan dans la région SOOI.*

Indépendamment, les protéines prM/M et E ont des propriétés qui leurs sont propres au cours du cycle viral. La nécessité d'une forte interaction entre ces deux protéines reste cependant essentielle pour leur fonctionnement biologique, en particulier durant les étapes précoces de l'assemblage des particules virales. L'analyse comparative des séquences des protéines M des souches DENV-2 de la région SOOI a permis d'identifier une substitution peu fréquente d'une Ile en Val à la position M-36. Ce résidu fait partie de la région C-terminale de l'ectodomaine M de DENV, qui est impliquée dans la capacité du virus à induire l'apoptose. En outre, dans la topologie de l'hétérodimère prME, le résidu M-36 se retrouve à l'interface entre la protéine M et le domaine EDII de la protéine E qui contient la boucle de fusion. Le résidu M-36 pourrait par conséquent jouer un rôle majeur dans la fonction et l'interaction hétérodimérique des protéines prM et E. Nous avons alors examiné l'impact de la mutation M-136V sur l'expression et la cytotoxicité des hétérodimères prME, ainsi que la capacité des résidus M-31/41 à induire l'apoptose (Article 3).

# **Partie III : Travaux de recherche**

## **I. Rôle des résidus E-152, E-156 et E-158 dans la réactivité antigénique de la boucle de glycosylation du virus Zika**

### **I.1. Contexte de l'étude**

La protéine d'enveloppe E de ZIKV est la principale glycoprotéine se trouvant à la surface de la particule virale et représente un des principaux antigènes du virus. Cette protéine est par conséquent une cible idéale pour les anticorps neutralisants (Chávez et al. 2010, Dai et al. 2016, Montecillo-Aguado et al. 2019, Zaidi et al. 2020). Comme décrit précédemment, l'ectodomaine de la protéine E est organisé en trois domaines structuraux distincts : le domaine I (EDI), le domaine II (EDII), et le domaine III (EDIII). Le domaine EDI de ZIKV contient un site de glycosylation au niveau du résidu E-154 qui est situé dans une boucle flexible constituée de vingt acides aminés que nous appellerons ici : la boucle de glycosylation (résidu E-145 à E-164) (Annamalai et al. 2017a, Fontes-Garfias et al. 2017, Hasan et al. 2017). Cette boucle de glycosylation semble jouer un rôle majeur dans l'antigénicité de la protéine E de ZIKV (Dai et al. 2016, Dai et al. 2018, Li et al. 2019), en affectant la disponibilité d'épitopes neutralisants à la surface de la particule virale (Bos et al. 2018, Goo et al. 2018, Bos et al. 2019, Frumence et al. 2019, Henderson et al. 2020, Qu et al. 2020).

Une analyse comparative faite entre la souche asiatique BeH819015 et la souche africaine prototypique MR766-NIID de ZIKV, a mis en évidence le rôle majeur de la boucle de glycosylation dans l'activité des anticorps neutralisants face aux deux souches virales (Frumence et al. 2019). L'analyse de séquence de la souche asiatique BeH819015 et de la souche africaine MR766-NIID a permis d'identifier la substitution de 3 acides aminés dans la boucle de glycosylation de ZIKV : E-I152T, E-T156I et E-H158Y. La souche asiatique BeH819015 est glycosylée en position E-154 contrairement à la souche africaine MR766. C'est la substitution du résidu Thr en Ile à la position E-156 qui entraîne la perte du motif de glycosylation N154/D155/T156 de ZIKV (Bos et al. 2019).

## I.2. Résumé de l'étude

Dans cette étude, nous évaluons le rôle des résidus E-152/156/158 comme déterminants antigéniques de la boucle de glycosylation de la protéine E de ZIKV. Pour ce faire nous avons eu recours à l'utilisation d'un peptide synthétique long de 20 acides aminés (<sup>1</sup>GSQHSGMTVNDIGYETDENR<sup>20</sup>) représentant la boucle de glycosylation du clone viral ZIKALIVax. ZIKALIVax est un clone viral chimérique non glycosylé possédant les protéines structurales de la souche épidémique asiatique BeH819015 et les protéines non structurales de la souche historique africaine MR766-NIID. Les résidus E-T152/I156/Y158 de MR766-NIID ont été introduit dans la protéine E de BeH819015 afin d'éliminer l'unique motif de glycosylation N154/D155/T156 (Bos et al. 2018, Bos et al. 2019, Frumence et al. 2019).

Au cours de cette étude nous avons tout d'abord testé la réactivité antigénique du peptide synthétique 1GSQHSGMTVNDIGYETDENR<sup>20</sup>. Le peptide synthétique représentant la boucle de glycosylation de ZIKALIVax était reconnu par les anticorps présents dans le sérum de souris infectées par ZIKALIVax. Nous avons démontré que l'immunisation de souris avec le peptide synthétique <sup>1</sup>GSQHSGMTVNDIGYETDENR<sup>20</sup> conjugué à la protéine porteuse immunogène KLH, pouvait entraîner la production d'anticorps réagissant à la boucle de glycosylation présentée sous forme de peptide ou présentée au sein d'une protéine recombinante EDI. Afin d'étudier le rôle des résidus E-152/156/158 sur la réactivité antigénique de la boucle de glycosylation, des substitutions d'acides aminés aux positions E-152, E-156 et E-158 ont été effectuées par mutagenèse dirigée au sein de la protéine recombinante EDI ou dans le peptide synthétique 1GSQHSGMTVNDIGYETDENR<sup>20</sup>. Nos résultats montrent que les résidus E-152/156/158 sont des déterminants clés de la réactivité antigénique de la boucle de glycosylation du ZIKV.

> *Les résultats de cette étude seront présentés et discutés plus en détail dans la section « I.4. Discussion de l'article 1 », page 140.*

### I.3. Article 1: Immune Reactivity of 20-mer Peptide Representing the Zika E Glycan Loop Involves the Antigenic Determinants E-152/156/158



Article

## Immune Reactivity of a 20-mer Peptide Representing the Zika E Glycan Loop Involves the Antigenic Determinants E-152/156/158

Etienne Frumence <sup>†</sup>, Juliano G. Haddad <sup>†</sup>, Bénédicte Vanwalscappel, Jessica Andries, Jason Decotter, Wildriss Viranaicken, Gilles Gadea and Philippe Desprès <sup>\*</sup>

Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Plateforme Technologique CYROI, Université de La Réunion, INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, 97491 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; Etienne.frum@gmail.com (E.F.); juliano.haddad@univ-reunion.fr (J.G.H.); benedicte.vanwalscappel@univ-reunion.fr (B.V.); jessica.andries85@gmail.com (J.A.); decotterjason@gmail.com (J.D.); wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr (W.V.); gilles.gadea@inserm.fr (G.G.)

<sup>\*</sup> Correspondence: philippe.despres@univ-reunion.fr; Tel.: +33-2620938806

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Received: 16 September 2020; Accepted: 3 November 2020; Published: 5 November 2020



**Abstract:** Mosquito-borne Zika virus (ZIKV) causes a severe congenital syndrome and neurological disorders in humans. With the aim to develop a live-attenuated ZIKV strain, we generated a chimeric viral clone ZIKALIVax with African MR766-NIID strain as backbone and the envelope E protein of epidemic Brazilian BeH810915 strain. The MR766-NIID residues E-T152/I156/Y158 were introduced into BeH810915 E protein leading to a nonglycosylated ZIKALIVax. Recently, we reported that the residues E-152/156/158 that are part of ZIKV glycan loop (GL) region might have an impact on the availability of neutralizing antibody epitopes on ZIKV surface. In the present study, we evaluated the antigenic reactivity of a synthetic 20-mer peptide representing the ZIKALIVax GL region. The GL-related peptide was effective for the detection of GL-reactive antibody in mouse anti-ZIKALIVax immune serum. We showed that the residue E-158 influences the antigenic reactivity of GL-related peptide. The ZIKALIVax peptide was effective in generating mouse antibodies with reactivity against a recombinant E domain I that encompasses the GL region. The GL peptide-reactive antibodies revealed that antigenic reactivity of E-domain I may be impacted by both residues E-152 and E-156. In conclusion, we proposed a role for the residues E-152/156/158 as key antigenic determinants of ZIKV glycan loop region.

**Keywords:** arbovirus; Zika virus; envelope protein; viral peptide; glycan loop region; peptide-based ELISA; immunogenicity; antigenic reactivity

#### 1. Introduction

Mosquito-borne ZIKV belonging to flavivirus genus of *Flaviviridae* family is the etiologic agent of Zika congenital syndrome and neurological disorders in humans [1–5]. ZIKV strains are mostly clustered into African and Asian lineages [6,7]. In the past decade, there has been unexpected expansion of the geographic distribution of ZIKV strains of Asian lineage and their rapid spread caused major epidemics in the South Pacific in 2013 and then South America including Brazil in 2015 [2,7,8]. Contemporary epidemics ZIKVs have been associated with birth defects as well as contaminations through various human body fluids [3–5,8].

Vaccination has been proposed as an efficient strategy to prevent ZIKV infection in humans [9–11]. It is now well established that elicitation of a protective antibody response is a critical step in the development of safe and efficient Zika vaccines [12–15]. The envelope E protein (504 aa) is responsible

for virus entry into the host-cell and represents a major target for ZIKV neutralization [16–27]. The ZIKV E ectodomain (residues E-1 to E-406) is divided into three structural envelope domains: Domain I (EDI), Domain II (EDII), and Domain III (EDIII) [1,9,17,19,25]. As depicted in Figure 6, the EDI domain contains 132 residues distributed in three spaced segments: The N-terminal residues E-1 to E-52, the central residues E-132 to E-193, and the C-terminal residues E-280 to E-296 [17,25]. EDI encompasses a flexible glycan loop GL (residues E-145 to E-164) region, which may be post-translationally N-glycosylated at N154 [27–29]. The 20 amino acids that compose Zika GL might have an influence on the conformation of E, in particular, on the accessibility of EDII, which encompasses the fusion loop region [30–34]. An important role has been also proposed for GL in relation with antigenic properties of Zika E protein [24–26].

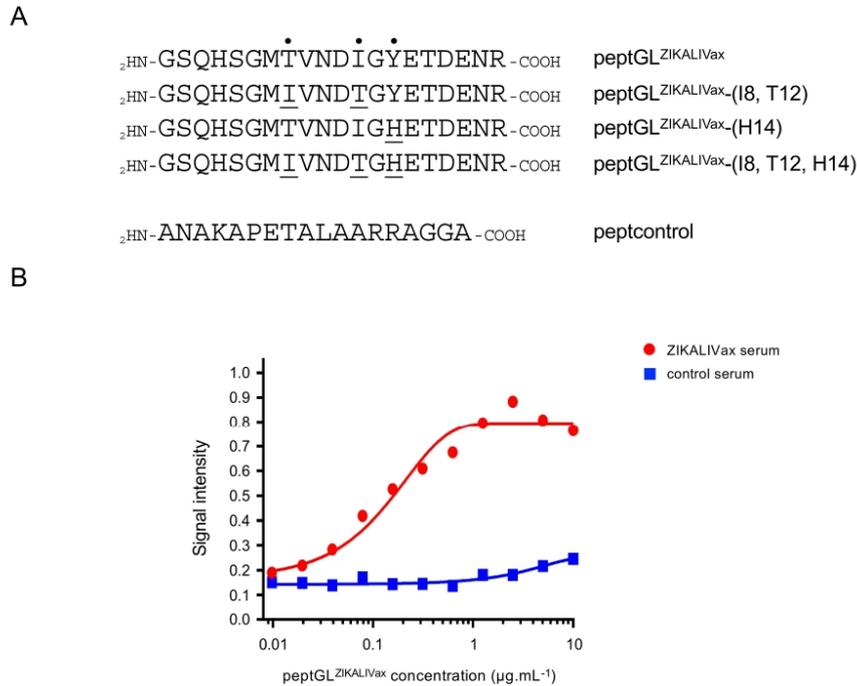
ZIKALIVax (also called ZIKBeHMR-2) is a chimeric viral clone with historical African strain MR766-NIID (Genbank access LC002520) as backbone and structural protein region from epidemic Brazilian viral strain BeH810915 (Genbank access KU365778) [35,36]. Similar to BeH810915, Asian-lineage ZIKV isolates associated with recent epidemics share the common sequon N154/D155/T156, located in the GL region where an N-glycan is attached to N154 [29,30]. Unlike what has been described with Asian-lineage ZIKV, the residue N154 of African-lineage MR766-NIID E protein lacks N-glycan due to residue Ile at the position E-156, leading to a loss of the sequon [32]. In view of the importance of N-glycosylation status in the virulence of flaviviruses including ZIKV, ZIKALIVax was designed as a nonglycosylated chimeric virus [36]. Consequently, the residues I152/T156/H158 present in BeH810915 E protein were replaced with the MR766-NIID residues T152/I156/K158 [36]. The residue Ile at position E-156 results in a loss of the unique N-glycosylation site into GL region leading to a nonglycosylated ZIKALIVax [36].

We reported that inoculation of live ZIKALIVax in adult BALB/c mice resulted in production of neutralizing anti-ZIKV E antibodies [36]. While ZIKALIVax induced anti-E antibodies that neutralize MR766-NIID with high titers by plaque reduction neutralization test and flow-cytometry neutralization test (FNT), the epidemic ZIKV strains of Asian lineage were weakly neutralized by anti-ZIKALIVax immune serum [36,37]. As BeH810915 and ZIKALIVax E proteins only differ by the amino-acid substitutions at positions E-152/156/158, we questioned whether these three residues, which are part of the GL region, influence the availability of neutralizing antibody epitopes on ZIKV surface (36). In the present study, we sought to evaluate the antigenic reactivity of a synthetic peptide representing the ZIKALIVax GL region. A recombinant E-Domain I (rEDI), which encompasses the GL region of ZIKALIVax, was also generated. Both GL-related peptide and rEDI were mutated to assess the impact of residues E-152/156/158 on immune reactivity of antibodies raised against the glycan loop region. Our results showed that residues E-152/156/158 are key determinants in antigenic reactivity of ZIKV GL region.

## 2. Results

### 2.1. Reactivity of a Synthetic Peptide Representing the ZIKALIVax Glycan Loop Region

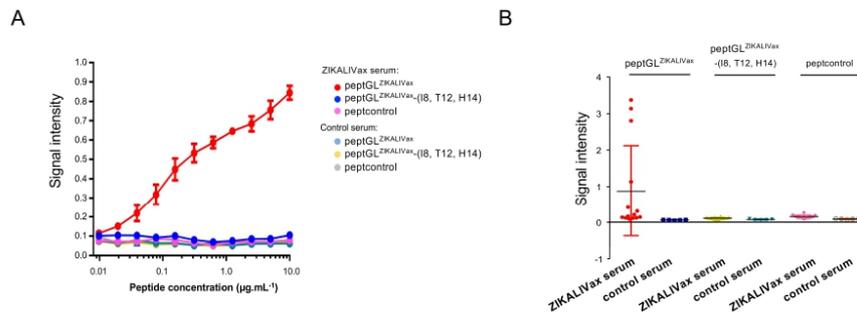
We sought to evaluate the antigenic reactivity of a 20-mer synthetic peptide named  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  representing the GL region (residues E-245 to E-264) of chimeric viral clone ZIKALIVax (Figure 1A). To investigate the impact of residues E-152/156/158 on antigenic reactivity of  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$ , a mutant  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  peptide bearing the amino acid changes Thr to Ile at position 8 (residue 152 as numbered in BeH819015 E protein), Ile to Thr at position 12 (residue E-156), and His to Tyr at position 14 (residue E-158) was generated (Figure 1A). It is of note that peptide mutant  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}_{\text{(I8, T12, H14)}}$  has complete similarity with BeH819015 GL region. An Ala-rich peptide of 18 amino-acid residues (hereafter titled  $\text{peptcontrol}$ ), which lacks potential B-cell epitope, served as a negative peptide control.



**Figure 1.** Reactivity of a peptide representing the ZIKALIVax glycan loop region through peptide-based ELISA. In (A), sequences of synthetic peptides representing the GL region from viral clone ZIKALIVax and mutants. The black points and underlined amino acids are positions that differ from peptGL<sup>ZIKALIVax</sup>. The irrelevant peptide peptcontrol is indicated. In (B), the optical density at 450 nm ( $O_{D_{450}}$ ) or signal intensity of samples tested in a dose-response curve of peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> in relation to anti-ZIKALIVax immune serum through peptide-based ELISA. Plates were coated with increasing concentrations of peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> and incubated with a pooled anti-ZIKALIVax immune serum (ZIKALIVax serum) at dilution 1:50. A pool of serum of mice that received heat-inactivated ZIKALIVax [33] at dilution 1:50 served as a negative serum control (control serum).

A pool of sera of mice that received live ZIKALIVax has ability to bind peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> by peptide-based ELISA (Figure 1B). As a negative control, no binding was observed with a pooled serum of mice that received heat-inactivated ZIKALIVax. A dose-response curve showed that peptide detection limit was about  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , whereas the plateau was reached at  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figure 1B). Thus, a peptide-based ELISA using peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> is suitable for detection of GL-reactive antibodies in mouse anti-ZIKALIVax immune sera. A concentration of  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$  (300 ng per well of a 96-well plate) of peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> was used for peptide-based ELISA in the following experiments.

We next examined the antigenic reactivity of anti-ZIKALIVax immune serum against mutant peptGL<sup>ZIKALIVax-(I8, T12, H14)}</sup> (Figure 2A). Heat-inactivated ZIKALIVax immune serum served as negative serum control, whereas peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> and peptcontrol were used as positive and negative peptide controls, respectively. There was no antigenic reactivity of anti-ZIKALIVax immune serum against mutant peptGL<sup>ZIKALIVax-(I8, T12, H14)}</sup> regardless of the peptide concentration tested (Figure 2A). Thus, anti-ZIKALIVax immune serum had peptide-reactive antibodies raised against peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> but not a mutant peptide representing the Beh819015 GL region.



**Figure 2.** Immunoreactivity of pept<sup>GLZIKALIVax</sup>. The O.D<sub>450</sub> or signal intensity of samples in dose-response curves of pept<sup>GLZIKALIVax</sup> and mutant peptide pept<sup>GLZIKALIVax</sup>-(I8, T12, H14) in relation to anti-ZIKALIVax immune serum (ZIKALIVax serum) at dilution 1:200 measured through peptide-based ELISA. Serum of mice that received heat-inactivated ZIKALIVax at dilution 1:200 served as a control serum. Peptcontrol peptide was used as a negative peptide control. In (A), plates were coated with increasing concentrations of peptides and incubated with a pooled ZIKALIVax immune serum. In (B), peptides at concentration of 3 µg mL<sup>-1</sup> were incubated with 14 individual anti-ZIKALIVax immune sera.

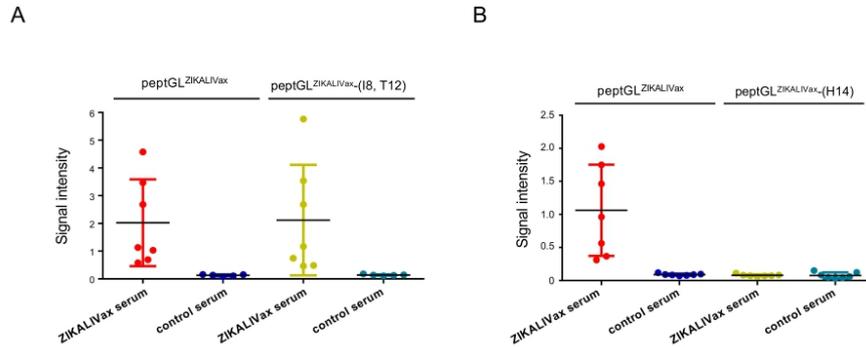
We examined the antigenic reactivity of 14 individual anti-ZIKALIVax immune sera against pept<sup>GLZIKALIVax</sup> and mutant pept<sup>GLZIKALIVax</sup>-(I8, T12, H14) by peptide-based ELISA (Figure 2B). The GL-reactive antibodies were readily detected for one-third of serum samples, whereas no recognition was observed with mutant peptide regardless of individual serum tested. Thus, individual variation in antibody response to pept<sup>GLZIKALIVax</sup> can occur in inbred laboratory mice inoculated with live ZIKALIVax.

As shown in Figure 1A, the peptide pept<sup>GLZIKALIVax</sup> is composed of amino-acids T8 and I12 but I8 and T12 in mutant pept<sup>GLZIKALIVax</sup>-(I8, T12, H14). We asked whether amino-acid permutation (Thr, Ile) at positions 8 and 12 might play a role in antigenic reactivity of pept<sup>GLZIKALIVax</sup>. Consequently, a mutant pept<sup>GLZIKALIVax</sup>-(T8, I12) was generated and tested with individual anti-ZIKALIVax immune sera (*n* = 7) showing a marked immune reactivity at serum dilution 1:200 (Figure 3A). Peptide-based ELISA showed that the permutation (I8, T12) has no impact on reactivity of anti-ZIKALIVax immune sera with pept<sup>GLZIKALIVax</sup> (Figure 3A). Next, we examined whether His residue at peptide position 14 contributes to the lack of pept<sup>GLZIKALIVax</sup> recognition by anti-ZIKALIVax immune sera. For this purpose, we generated a new mutant pept<sup>GLZIKALIVax</sup>-(H14) bearing the amino-acid change Tyr-to-His at peptide position 14 (Figure 1A). In contrast to what was been observed with the other amino-acid changes T8I and I12T, the mutation Y14H caused a lack of reactivity of pept<sup>GLZIKALIVax</sup> with anti-ZIKALIVax immune sera (Figure 3B). Thus, a Tyr residue at position 14 greatly influences the antigenic reactivity of pept<sup>GLZIKALIVax</sup>. Taken together, these results showed that a synthetic 20-mer peptide representing ZIKALIVax GL reacts as antibody epitope. We identified an important role for the polar residue at position E-158 in antigenic reactivity of ZIKV GL region in relation with anti-ZIKALIVax immune sera.

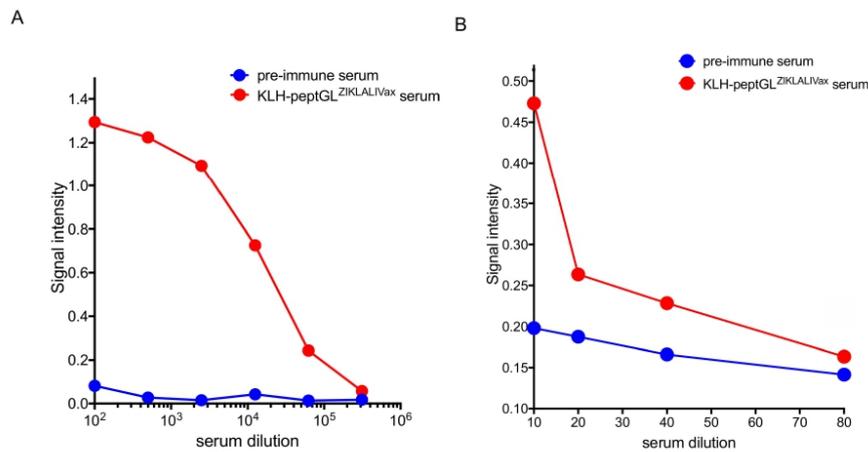
## 2.2. Immunogenicity of Pept<sup>GLZIKALIVax</sup> in Mice

To evaluate the immunogenicity of pept<sup>GLZIKALIVax</sup> in inbred laboratory mice, the 20-mer peptide was N-terminally coupled to Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) protein carrier. A group of five adult BALB/c mice were immunized with 20–30 µg of KLH-pept<sup>GLZIKALIVax</sup> conjugate in a prime-boost schedule with two weeks lapsing between immunizations. Immune sera were collected three weeks after the third immunization and pooled. Peptide-based ELISA was performed to evaluate the ability of the protein-peptide conjugates to elicit antibody production of relevant specificity

(Figure 4). A dose-response curve showed that KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> conjugate was immunogenic in mice (Figure 4A). Pooled mouse immune sera were then tested on free peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> through a peptide-based ELISA (Figure 4B). A weak antigenic reactivity of anti-KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> immune sera was detected with peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> at the lower dilution of serum.



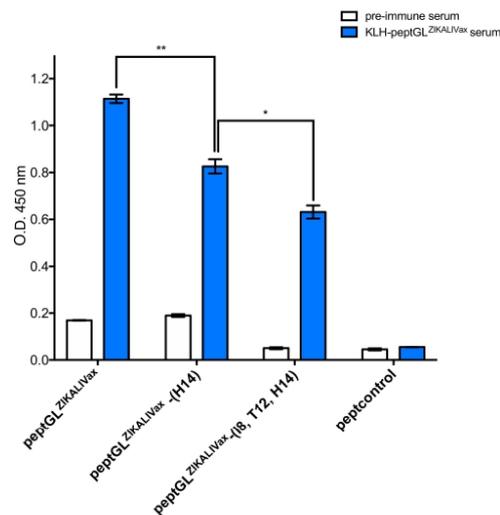
**Figure 3.** Immunoreactivity of peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> mutants with anti-ZIKALIVax immune serum. The O.D<sub>450</sub> or signal intensity of individual anti-ZIKALIVax immune sera in relation to peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> and its mutants at positions 8 and 12 (A) or 14 (B) measured through peptide-based ELISA. Peptides at concentration of 3 μg mL<sup>-1</sup> were incubated with individual anti-ZIKALIVax immune sera (*n* = 7) (ZIKALIVax serum) showing the higher reactivity with peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> at dilution 1:200 (Figure 2B). Serum of mice (*n* = 7) that received heat-inactivated ZIKALIVax at dilution 1:200 served as a control serum. Each closed circle represents an individual mouse.



**Figure 4.** Antigenic reactivity of mouse KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> immune sera. The O.D<sub>450</sub> or signal intensity of serum samples through peptide-based ELISA. Pre-immune sera and immune sera from BALB/c mice that received KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> conjugates were pooled and then tested with KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> conjugate (A) or free peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> (B) as coating antigen.

Serum samples of BALB/c mice twice inoculated with KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> conjugates were tested individually using peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> through peptide-based ELISA. Among the five individual KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> immune sera tested, only a serum sample from immunized

mouse S1-S1-RE (for Series 1-Right Ear) at dilution 1:200 was positive for GL peptide-reactive antibodies (Figure 5). Such a result suggests that  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  is poorly immunogenic in mice. The two mutants,  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}\text{-(I8, T12, H14)}$  and  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}\text{-(H14)}$ , were assayed with KLH- $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  immune serum S1-RE through peptide-based ELISA (Figure 5). The GL peptide-reactive antibodies were capable of reacting with the two  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  mutants but at a lower extent as compared to  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$ . The amino-acid change T8I decreased GL peptide recognition by KLH- $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  immune serum S1-RE (Figure 5). The GL peptide-reactive antibodies showed a much lower reactivity with mutant  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}\text{-(I8, T12, H14)}$  representing BeH819015 GL region. Taken together, these results showed that KLH- $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  immune serum S1-RE has ability to react with GL region of ZIKALIVax. However, the efficiency of antibody binding to ZIKV GL region was weaker with epidemic viral strain BeH819015, which differs from ZIKALIVax by the amino-acid substitutions at positions E-152/156/158.

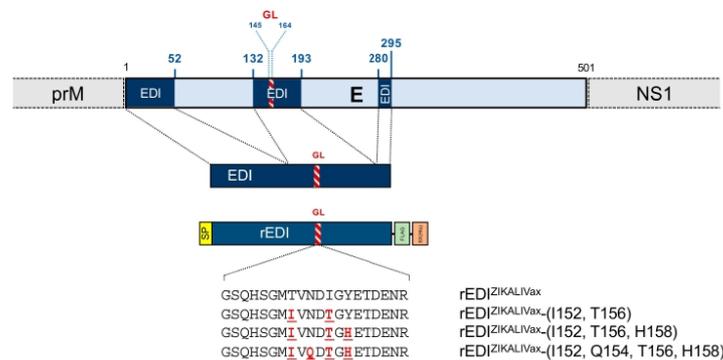


**Figure 5.** KLH- $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  immune serum reacts with  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$ . The O.D.<sub>450</sub> or signal intensity of mouse pre-immune and KLH- $\text{peptGL}^{\text{MR766}}$  immune serum S1-RE (KLH- $\text{peptGL}^{\text{MR766}}$  serum) at dilution 1:200 in relation to  $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  and mutant peptides through peptide-based ELISA. Peptcontrol was used as a negative peptide control. The results are the mean ( $\pm$ S.D.) of three repeats. Statistical values correspond to differences between peptides. Pairwise comparisons were performed and statistically significant comparisons are shown as \*\*  $p < 10^{-3}$ , \*  $p < 10^{-2}$ .

Using a flow cytometry neutralization test (FNT) (37), we were unable to detect ZIKV neutralizing antibodies in KLH- $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  immune serum S1-RE (Figure S1A). Moreover, there was no synergic effect of GL-peptide reactive antibody with anti-E mAb 4G2, which recognizes an EDII epitope involved in flavivirus neutralization (Figure S1A). The reactivity of KLH- $\text{peptGL}^{\text{ZIKALIVax}}$  immune serum S1-RE with ZIKV was also tested on Vero cells infected with viral strain MR766-NIID. By immunofluorescence (IF) analysis, no positive signal was observed in ZIKV-infected cells (Figure S1B). Thus, these virological assays did not allow us to demonstrate that GL peptide-reactive antibodies have ability to react with live ZIKV.

### 2.3. Antigenic Reactivity of ZIKALIVax rEDI in Relation with GL Peptide-Reactive Antibody

The above results prompted us to determine whether KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> immune serum S1-RE can recognize GL region into a recombinant EDI domain (rEDI) that regroups 132 discontinuous amino-acid residues of Zika E protein. A recombinant rEDI was, therefore, constructed by joining together the three ZIKV E segments (residues 1 to 52), (residues 132 to 193), and (residues 280 to 294), which compose EDI of ZIKALIVax using a mammalian codon-optimized synthetic gene (Figure 6). The middle EDI segment contains the 20 residues E-145 to E-164 of the GL sequence. The synthetic gene coding for recombinant ZIKALIVax EDI (rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>) was inserted into pcDNA3 expression vector to generate a recombinant plasmid pcDNA3/rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>. The rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> sequence was preceded by a heterologous signal peptide to target the recombinant viral protein into the secretory pathway and ended with two spaced C-terminal tags, the FLAG and 6 × (His) epitopes in tandem (Figure S2A).

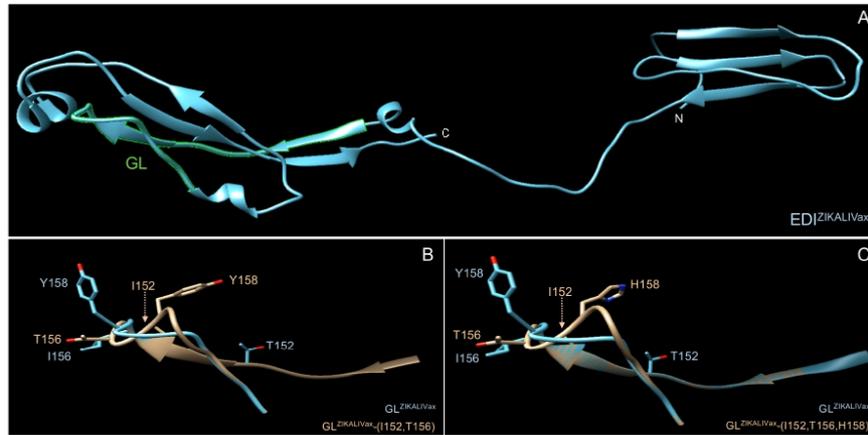


**Figure 6.** Schematic representation of ZIKALIVax rEDI constructs. The organization of the E protein into ZIKV polyprotein with its three segments composing the EDI domain is shown on top. The EDI residues are numbered as those in the E protein of ZIKALIVax. The glycan loop (GL) sequence of E is shown as a red, hatched segment. The rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> sequence is preceded by a N-terminal heterologous signal peptide (SP) and followed by the spaced two C-terminal FLAG and 6x(His) tags in tandem. The rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> gene was inserted into plasmid vector pcDNA3. Directed mutagenesis was performed on rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> sequence to generate three mutants. The amino-acid substitutions introduced into rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> are indicated in red bold.

The amino-acid substitutions T152I, I156T, and Y158H were introduced in pcDNA3/rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> by directed mutagenesis to generate a mutant plasmid pcDNA3/rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156, H158) (Figure 6). As a control, we generated a mutant rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(T152, Q154, I156, Y158) bearing the amino-acid change Asn to Gln at position E154. It is expected that mutation Q154 causes a loss of the N-glycosylation site of mutant rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156, H158). According to the role of N-glycosylation in antigenic reactivity of Zika E protein [29,30], the amino-acid substitutions T152I and I156T were introduced into rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> leading to a N-glycosylation sequon Asn-Asp-Thr into the rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> GL region (Figure 6).

Using BepiPred-2.0 web site (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) to predict B-cell epitopes located into proteins [38], GL region was identified as a potential antibody epitope in both rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(T152, I156, Y158) mutant, the latter representing the BeH819015 GL sequence (Figure S2B). A 3D structure prediction of ZIKALIVax rEDI was performed using PHYRE<sup>2</sup> protein fold recognition server (Figure 7). Structural analysis of rEDI showed that the mutations E-T152I and E-I156T may have an effect on GL conformation. The presence of these two mutations might also affect

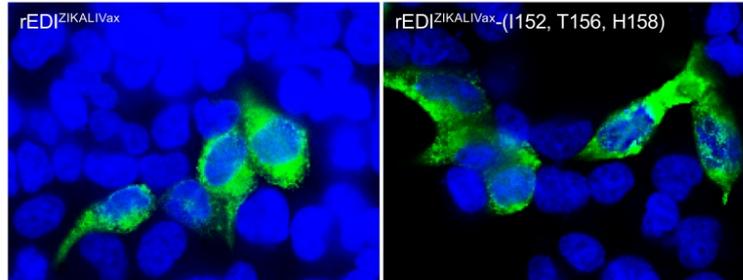
the positioning of residue E-158 into GL region (Figure 7). Thus, the GL region structure might be impacted by the residues E-152 and E-156.



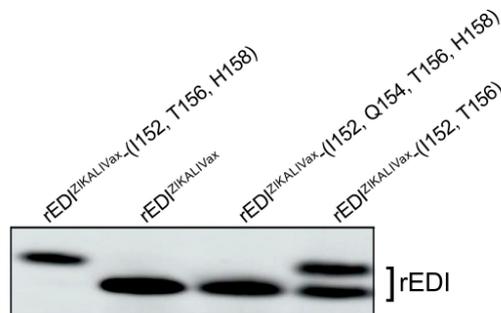
**Figure 7.** Structural features of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>. Tridimensional structure prediction of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and its mutants was performed by comparative modeling on PHYRE<sup>2</sup> protein recognition server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>). The predicted structures were analyzed with Chimera, a program for interactive visualization of tridimensional molecules. In (A), predicted structure of ZIKALIVax rEDI with GL region in green. The two C-terminal tags of rEDI are not presented. In (B,C), the ZIKALIVax GL region structure (GL<sup>ZIKALIVax</sup>) was compared to GL mutants bearing the two mutations E-T152I, and E-I156T (B) or the three mutations E-T152I, E-I156T, and E-Y158H (C). The hatched arrow indicates the position of residue I152 in the 3D structure of GL mutant.

We first evaluated the expression level of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and its mutant rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156, H158) by IF assay (Figure 8A). Human epithelial HEK-293T cells were transfected 24 h with plasmids expressing rEDI tagged with 6 × (His) epitope at the C-terminus. IF assay with anti-6 × (His) antibody readily detected intracellular expression of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and its mutant rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(T152, I156, Y158) in transfected HEK-293T cells (Figure 8A). There was no obvious change in the subcellular distribution between the two rEDI. Immunoblot assay on RIPA cell lysates was performed for assessing rEDI protein expression in transfected HEK-293T cells (Figure 8B). Anti-FLAG antibody detected the expression of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and its three mutants in HEK-293T cells. We observed that rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> migrated faster than mutant rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156, H158). The fact that rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and mutant rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, Q154, T156, H158) have comparable migration profiles is consistent with a lack of glycan linked to rEDI. We can, therefore, consider that the faster migration of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> is essentially due to the absence of N-glycosylation. In contrast to what was observed with rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156, H158), the rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156) mutant migrated as two closely spaced bands, suggesting that N-linked protein glycosylation of rEDI was not finalized in HEK-293T cells (Figure 8B). Structural protein analysis of glycosylated rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> mutants did not allow us to observe a conformational change explaining the lower occupancy of the N-glycosylation site in rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156) (Figure S3). Thus, it is unlikely that polar residue Tyr at position E-158 of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156) mutant may have an effect on glycan-protein linkage leading to partially glycosylated rEDI.

A



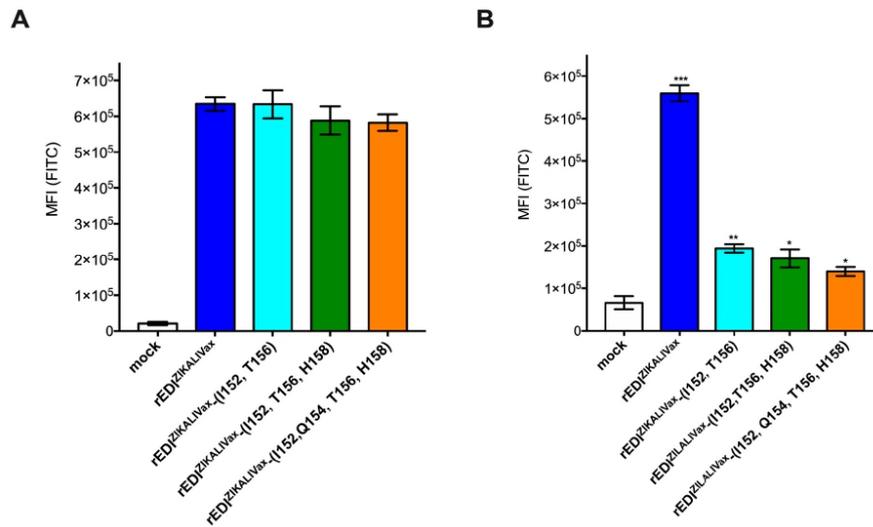
B



**Figure 8.** Expression of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> in HEK-293T cells. HEK-293T cells were transfected 24 h with plasmids pcDNA3 expressing rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> or its mutants. In (A), IF assay was performed on fixed and permeabilized cells with anti-6x(His) monoclonal antibody (mAb) as primary antibody. Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG antibody as secondary antibody. The nuclei were stained with DAPI (blue). Immunostained cells were visualized with a fluorescent microscope. The same magnification of  $\times 100$  was used throughout. In (B), immunoblot was performed on RIPA lysates obtained from transfected cells expressing rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> or its mutants using anti-FLAG antibody.

FACS analysis was performed to evaluate the reactivity of KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> immune serum S1-RE with rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and its three mutants expressed in HEK-293T cells (Figure 9). Anti-FLAG antibody showed that their expression levels were similar at 24 h post-transfection (Figure 9A). As shown in Figure 9B, KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> immune serum S1-RE has ability to react with rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> expressed in HEK-293T cells. The mean fluorescence intensity (MFI) values of GL peptide-reactive antibody and anti-FLAG antibody were similar, indicating a high level of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> antigenic reactivity in relation with GL peptide-reactive antibodies. Introduction of amino-acid substitutions E-T152I, E-I156T, and E-Y158H reduced by at least 70% the antigenic reactivity of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> (Figure 9B). Analysis of mutant rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156) revealed that the two amino-acid substitutions E-T152I and E-I156T decreased recognition of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>. Given that amino-acid change E-I156T generates a potential sequon Asn-Asp-Thr into GL region of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> (Figure S2), the amino-acid substitution N154Q was introduced in glycosylated mutant rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>-(I152, T156, H158) (Figure 9B). The loss of the N-glycosylation site showed no effect on immunoreactivity of mutant rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>. Thus, it seems unlikely that the glycan linked to N154 may play a role in the weaker reactivity of GL

peptide-reactive antibody in relation with rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> mutants bearing the mutations E-T152I and E-I156T (Figure 9B). Taken together, these results showed that GL peptide-reactive antibody has ability to recognize the GL region into a reconstituted EDI of ZIKALIVax regardless of the presence of a glycan linked to N154. The two residues E-152 and E-156 might have a key role in the antigenic reactivity of GL region in relation with a change in GL structural conformation.



**Figure 9.** Recognition of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> in relation with peptGL<sup>ZIKALIVax</sup>-reactive antibody. HEK-293T cells were transfected 24 h with plasmids expressing rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> or its mutants or mock-transfected (mock). FACS analysis was performed to detect expression of rEDI in transfected cells. For FACS analysis, cells were incubated with anti-FLAG antibody (A) or KLH-peptGL<sup>MR766</sup> immune serum S1-S1-RE (KLH-peptGL<sup>MR766</sup> serum) (B) as primary antibody and then Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG antibody as secondary antibody. The MFI values of FITC were determined. The error bars represent standard errors of two independent experiments. In (A), MFI values generated by the three rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> mutants in comparison with rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>. In (B), MFI values generated by rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and its mutants in comparison with mock. Pairwise comparisons were performed and statistically significant comparisons are shown as \*\*\*  $p < 10^{-2}$ , \*\*  $p < 10^{-1}$ , \*  $p < 0.05$ . The nonstatistically significant comparisons are not indicated.

### 3. Discussion

Recently, we designed the chimeric viral clone ZIKALIVax as a prototype of live-attenuated ZIKV strain for the development of vaccine candidates against Zika disease [36]. ZIKALIVax is a nonglycosylated ZIKV with structural protein region from Asian BeH819015 strain and African MR766-NIID strain as viral backbone [36]. It is of note that MR766 is a laboratory-adapted viral strain since the first isolation in Uganda in 1947. The E protein of ZIKALIVax, which relates to BeH819015 sequence, was modified with the three amino-acid substitutions I152T, T156I, and H158Y, leading to a lack of N-glycosylation site for GL into the E antigenic domain I. The amino-acid residues T152, I156, and Y158 were originally identified in viral strain MR766-NIID. Our in vivo experiments identified a role for the GL region in the reactivity of anti-ZIKALIVax immune serum in relation with ZIKV strains of different lineages [36,37]. Viral strain MR766-NIID as well as ZIKALIVax were highly sensitive to neutralization by the mouse anti-ZIKALIVax immune serum. However, there was a weaker antibody-mediated neutralization of viral strain BeH819015 by anti-ZIKALIVax immune

serum, despite the fact that neutralizing antibody epitopes came from BeH819015 [36]. We postulated that glycan loop residues E-152/156/158 may have an impact on availability of neutralizing antibody epitopes on ZIKV surface [36].

The aim of our study was to better understand the role of glycan loop region in the antigenic properties of ZIKALIVax containing the mutations E-I152T, E-T156I, and E-H158Y in the BeH819015 E protein. For such a purpose, we decided to evaluate the antigenic reactivity of a synthetic 20-mer peptide GSQHSGMTVNDIGYETDENR representing the GL region of ZIKALIVax in relation with a mouse anti-ZIKALIVax immune serum. The B-cell epitope prediction model identified the ZIKALIVax GL peptide as a potential antibody epitope. Peptide-based ELISA revealed that a limited number of mice inoculated with ZIKALIVax were capable of reacting with the glycan loop peptide. This would suggest that the glycan loop region is weakly immunogenic in mice challenged with ZIKV.

We noted that a ZIKALIVax GL peptide mutant bearing the amino acid change Tyr to His at position 14 (referred to as residue E-158 in ZIKV) lacks antigenic reactivity in relation with anti-ZIKALIVax immune serum. It was observed that GL-reactive antibodies raised against Asian-lineage ZIKV were inefficient to recognize viral strain MR776 bearing a residue Y158 [34]. The H158 protonation in the GL region might have an effect on the low pH-dependent fusion step at the early stage of virus replication cycle [32]. This suggests an important role for residue E-158 in the structural arrangement of ZIKV. It would be, therefore, of great interest to determine whether a ZIKALIVax mutant bearing a mutation Y158H into the GL region has ability to produce higher levels of neutralizing antibodies against epidemic ZIKV strains of Asian lineage.

To evaluate the ability of ZIKALIVax GL peptide to induce production of GL peptide-reactive antibodies, the peptide conjugated to protein carrier KLH was administrated to a small group of adult BALB/c mice by the intradermal route. Only one individual from five immunized mice developed a significant level of GL peptide-reactive antibodies. The weak immunogenicity of ZIKALIVax GL peptide correlates with the limited number of individual anti-ZIKALIVax immune sera showing antibody reactivity with GL peptide. The mouse immune serum raised against ZIKALIVax GL peptide was capable of reacting with a peptide representing the GL region of viral strain BeH819015. Thus, immunization with ZIKALIVax GL peptide induces the production of GL peptide-reactive antibodies against ZIKV strains of African and Asian lineages. The serum specimen obtained from mouse inoculated with ZIKALIVax GL peptide was assayed with live ZIKV. The GL peptide-reactive antibodies were unable to neutralize ZIKV or even to recognize the authentic E protein. It cannot rule out that sensitivity of our assays was not sufficient to evaluate the binding capacity of GL peptide-reactive antibodies to live ZIKV. In flavivirus E dimers, the hydrophobic fusion-peptide (FP) loop within the E domain II (EDII) nests into a pocket at the interface between EDI and the E domain III [39]. Structural analysis of ZIKV identified GL as a region adjacent to FP loop that is inaccessible in the mature virus structure [18,19,31]. During the low-pH-triggered flavivirus fusion process, the E dimers undergo structural transitions leading to the exposure of the FP loop at the tip of EDII [40]. Although experimental evidence for such a hypothesis is still lacking, we proposed that accessibility of ZIKV GL region for antibody binding requires that ZIKV virion adopts a conformational transition, which results in a change in the oligomeric state of E.

The lack of antigenic reactivity of live ZIKV in relation with GL peptide-reactive antibodies prompted us to determine whether the E-Domain I, which encompasses the GL region, could be recognized by immune serum of mouse that received ZIKALIVax GL peptide. Consequently, a recombinant rEDI was generated by joining the three E segments that compose the 132-amino-acid-long residues of BeH819015 EDI. The introduction of the three amino-acid changes E-I152T, E-T156I, and E-H158Y in BeH819015 EDI resulted in ZIKALIVax EDI. Based on protein structural information from the 3D predicted structure of rEDI, the two amino-acid substitutions E-T152I and E-I156T might have an effect on GL conformation leading to a change in residue E-158 positioning. The serum specimen obtained from mouse inoculated with ZIKALIVax GL peptide reacts with ZIKALIVax rEDI expressed in HEK-293T cells. The impact of residues E-152, E-156, and E-158 on the antigenic

reactivity of ZIKALIVax rEDI was assessed through two mutants bearing the amino-acid changes E-T152I, E-I156T, and E-Y158H or only E-I152T and E-I156T. We showed that the mutations E-I152T and E-I156T reduced antigenic reactivity of ZIKALIVax rEDI in relation with GL peptide-reactive antibodies. In order to better understand the role of glycan linked to N154 in the antigenic reactivity of GL region, the amino-acid substitution E-N154Q was introduced into ZIKALIVax rEDI-(I152, T156, H158) mutant. We showed that the weaker antigenic reactivity of ZIKALIVax rEDI mutants bearing the mutation I156T in relation to GL-reactive peptide antibodies did not relate to glycan linked to N154.

In the present study, we demonstrated that a peptide representing the glycan loop region of chimeric viral clone ZIKALIVax reacts as a linear B-cell epitope. This is consistent with the previous reports on the immune reactivity of Zika patient sera with ZIKV GL region [34] and the ability of a recombinant soluble E protein of Asian-lineage ZIKV strain to induce the production of GL-reactive antibodies in mice [35]. Our data reveal that the three residues E-152, E-156, and E-158 have major impact on the antigenic reactivity of ZIKV glycan loop.

#### 4. Conclusions

A major role has been proposed for the E glycan loop region (residues E-151 to E-165) located in the domain I of the E protein in the neutralizing activity of anti-ZIKV antibodies [31–36]. It has been recently reported that glycan loop of Asian-genotype ZIKV encompasses a highly conserved linear epitope, with His residue at position E-158 playing a key role in the antibody binding [34]. Consistent with this finding, we showed that sera of mice that received live ZIKALIVax, which contains the E protein of contemporary epidemic strain BeH819015 with the residues E-152/156/158 from African strain MR766-NIID, are capable of reacting with a synthetic 20-mer peptide representing ZIKALIVax GL region. Our data demonstrated that polar amino acid at position E-158 greatly influences the antigenic reactivity of glycan loop region between African- and Asian-lineage ZIKV. The residues E-152 and E-156 are proposed to be critical for antigenic reactivity of glycan loop region in relation with the conformational state of E domain I. It is of note that N154-linked glycan has no effect on the binding of ZIKALIVax GL peptide-reactive antibodies to GL region of Asian-genotype ZIKV.

It has been reported that a GL-related peptide conjugated to viral nanoparticles has ability to induce antibodies raised against the glycan loop region of Asian-lineage ZIKV [34]. We demonstrated here that immunization of BALB/c mice with ZIKALIVax GL-peptide conjugated to an immunogenic protein carrier results in production of GL peptide-reactive antibodies capable of reacting with ZIKV strains of different lineages. We and others pointed out the major role of glycan loop region in the antigenic reactivity of ZIKV E protein [31–36]. Taken in consideration with the singularity of ZIKV glycan loop region among flavivirus E proteins, the 20-mer peptide GSQHSGMTVNDIGYETDENR representing the ZIKALIVax GL sequence could be of major interest in the design of a peptide-based ELISA for ZIKV infection serological diagnosis [41]. Such a peptide would be also of great interest to provide a clearer view on the involvement of glycan loop region into the E-Domain I on the availability of neutralizing antibody epitopes on ZIKV surface.

#### 5. Materials and Methods

##### 5.1. Cells and Reagents

Vero (clone E6) and HEK-293T cells were cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) growth medium supplemented with 5 to 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (Dutscher, Brumath, France) and antibiotics. Mouse anti-flavivirus E mAb 4G2 was purchased from RD-Biotech (Besançon, France). Mouse anti-DDDDK tag (binds to FLAG tag sequence) and mouse anti-6 × (His) mAbs were purchased from Abcam (Birmingham, UK). Donkey anti-mouse IgG, HRP conjugate, horseradish peroxidase (HRP) was purchased from ImmunoReagents (Raleigh, USA). Donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 conjugate, was purchased from Thermo Fisher Scientific (Les Ulis, France). DAPI was purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France).

### 5.2. Synthetic Zika Peptides

A synthetic peptide representing the 20 amino-acid residues GSQHSGMTVNDIGYETDNER of the envelope glycan loop of chimeric viral clone ZIKALIVax was chemically synthesized by Genecust (Boynes, France). ZIKALIVax GL peptide mutants and peptcontrol peptide were also produced by Genecust (Boynes, France). The peptides peptGL were provided free or conjugated to the carrier protein keyhole limpet hemocyanin (KLH) by Genecust (Boynes, France).

### 5.3. Mouse Immunization with Peptides

A group of adult BALB/c mice ( $n = 5$ ) were inoculated with 20–30  $\mu\text{g}$  of KLH-peptGL<sup>ZIKALIVax</sup> conjugates in Complete Freund's adjuvant (Sigma, France) by intradermal administration. Two weeks after primary immunization, mice were twice boosted with the same antigen in incomplete Freund's adjuvant with 2–3 weeks lapsing between immunizations. Mice were bled two weeks after the last immunization. Mouse immune sera were pooled or tested individually.

The protocols and subsequent experiments in mice were ethically approved by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation with reference APAFIS#23095-2019111814567346 v3 (1 April 2020). All animal procedures were performed in accordance with the European Union legislation for the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU). Experiments were conducted following the guidelines of the Office Laboratory of Animal Care at the Cyclotron and Biomedical Research CYROI platform.

### 5.4. Peptide-Based ELISA

A 96-well plate was coated with 0.1 mL of peptide diluted in PBS at 4 °C overnight. Plates were incubated with mouse sera diluted in PBS-Tween supplemented 3% milk at 37 °C. The plates were washed in PBS-Tween and then incubated in the presence of HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody. After washes in PBS-Tween, plates were incubated with TMB substrate solution (Thermo Fisher Scientific, les Ulis, France) and absorbance was measured at 450 nm.

### 5.5. Expression of Recombinant ZIKV EDI Proteins

A mammalian codon-optimized gene coding for a heterologous signal peptide, followed by the amino-acid residues (1–52), (132–193), and (280–295) that compose the EDI domain of chimeric viral clone ZIKALIVax and ended by FLAG and 6  $\times$  (His) tags in tandem with glycine-serine spacers, was synthesized by Genecust (Boynes, France) (Figure S2A). The synthetic EDI gene was cloned into *Nhe* I and *Not* I restriction site of the pcDNA3.1-Hygro plasmid to generate pcDNA3/ZIKV-rEDI<sup>ZIKALIVax</sup>. The different mutants of rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> were obtained by direct mutagenesis on pcDNA3/ZIKV-rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and all plasmids were sequence verified by Sanger method (GeneCust, Boynes, France). HEK-293T cells were transiently transfected with pcDNA3/ZIKV-rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> and mutants using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, les Ulis, France).

### 5.6. Immunoblot Assay

Cells were lysed with RIPA lysis buffer (Sigma, Lyon, France) containing protease inhibitors. Equal quantity of proteins was loaded on a 15% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. After blocking of the membrane in PBS supplemented with FBS and Tween-20, the blot was incubated with appropriate dilutions of anti-FLAG antibody as the primary antibody and then HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody as secondary antibody. The membrane was exposed on an Amersham imager 600 (GE Healthcare).

### 5.7. Immunofluorescence Assay

For IF analysis, cell monolayers grown on coverslips were fixed with 3.2% paraformaldehyde in PBS and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. Alternatively, cells were fixed using cold methanol:acetone for 30 min. Cells were incubated with appropriate dilutions of primary mouse antibody in PBS containing 1% bovine serum albumin and then with Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG antibody as secondary antibody in the same buffer. Nuclei were stained with DAPI. Vectashield reagent (Cinisciences, Nanterre, France) was used for mounting of the glass coverslips. A Nikon Eclipse E2000-U microscope was used to visualize the fluorescence. Fluorescent signal capture was allowed with a Hamamatsu ORCA-ER camera coupled to the imaging software NIS-Element AR (Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

### 5.8. Flow Cytometry Analysis

For flow cytometry assay, cells were seeded in 24-well plates and then transfected with pcDNA3/ZIKV-rEDI<sup>ZIKALIVax</sup> or mutants. After 18 h of transfection, cells were gently harvested by trypsinization, fixed with 3.7% FA in PBS, and then permeabilized with 0.15% Triton X-100 in PBS for 5 min. Samples were incubated with appropriate dilutions of mouse immune serum as primary antibody and then with Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG antibody as secondary antibody. Cells were analyzed with a Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France).

### 5.9. Statistical Analysis

An unpaired *t* test was used to compare quantitative data. GraphPad Prism was used for all statistical analysis.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4915/12/11/1258/s1>. Figure S1. Reactivity of mouse KLH-peptGLZIKALIVax immune serum with ZIKV E protein. Figure S2. Prediction of rEDI antibody epitopes in ZIKALIVax. Figure S3. Location of residue E-158 on the 3D structure of glycosylated rEDI.

**Author Contributions:** Conceptualization: E.F., W.V., G.G. and P.D.; methodology: E.F., J.G.H., W.V. and P.D.; formal analysis: E.F., J.G.H., W.V., G.G. and P.D.; investigation: E.F., W.V., B.V., J.G.H., J.A., J.D., G.G. and P.D.; resources: P.D.; data curation: E.F., J.G.H., W.V., G.G. and P.D.; writing—original draft preparation: P.D.; writing—review and editing: E.F., W.V., B.W., G.G. and P.D.; visualization: E.F., G.G. and P.D.; supervision: P.D.; project administration: P.D.; funding acquisition: P.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from INSERM-transfert (ZIKALIVax program, CoPoC N MAT-16225-A-02) and POE FEDER 2014-20 of the Conseil Régional de La Réunion (ZIKAlert program, n° SYNERGIE RE00001902). E.F. received funding from FEDER Région (ZIKALIVax 2.0 program, n° SYNERGIE RE0012406) and La Reunion University. J.G.H. and B.V. received funding from POE FEDER 2014-20 of the Conseil Général de La Réunion (ZIKAlert program, N SYNERGIE RE00001902). J.D. has a PhD degree scholarship from La Réunion island University (Ecole Doctorale STS), funded by the French ministry MEESR.

**Acknowledgments:** We are grateful to Hervé Pascalis for implementing computer data analysis. We thank the members of UM 134 PIMIT for their interest in this study. The authors are grateful to the animal testing laboratory A1 into technology platform CYROI.

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

### References

1. Barrows, N.J.; Campos, R.K.; Liao, K.C.; Prasanth, K.R.; Soto-Acosta, R.; Yeh, S.C.; Schott-Lerner, G.; Pompon, J.; Sessions, O.M.; Bradrick, S.S.; et al. Biochemistry and molecular biology of flaviviruses. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4448–4482. [CrossRef]
2. Weaver, S.C.; Costa, F.; Garcia-Blanco, M.A.; Nikos, V.; Ribeiro, G.S.; Saade, G.; Shi, P.Y.; Vasilakis, N. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. *Antivir. Res.* **2016**, *130*, 69–80. [CrossRef]
3. Gorshkov, K.; Shiryayev, S.A.; Fertel, S.; Lin, Y.W.; Huang, C.T.; Pinto, A.; Farhy, C.; Strongin, A.Y.; Zheng, W.; Terskikh, A.V. Zika virus: Origins, pathological action, and treatment strategies. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3252. [CrossRef]

4. Hussain, A.; Ali, F.; Latiwesh, O.B.; Hussain, S. A Comprehensive Review of the manifestations and pathogenesis of Zika virus in neonates and adults. *Cureus* **2018**, *10*, 3290. [[CrossRef](#)]
5. 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-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [[CrossRef](#)]
6. Beaver, J.T.; Lelutiu, N.; Habib, R.; Skountzou, I. Evolution of two major Zika virus lineages: Implications for pathology, immune response, and vaccine development. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1640. [[CrossRef](#)]
7. Hu, T.; Li, J.; Carr, M.J.; Duchêne, S.; Shi, W. The Asian lineage of Zika virus: Transmission and evolution in Asia and the Americas. *Virol. Sin.* **2019**, *34*, 1–8. [[CrossRef](#)]
8. Baud, D.; Gubler, D.J.; Schaub, B.; Lanteri, M.C.; Musso, D. An update of Zika virus infection. *Lancet* **2017**, *390*, 2099–2109. [[CrossRef](#)]
9. Heinz, F.X.; Stiasny, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* **2012**, *30*, 4301–4306. [[CrossRef](#)]
10. Fernandez, E.; Diamond, M.S. Vaccination strategies against Zika virus. *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *23*, 59–67. [[CrossRef](#)]
11. Poland, G.A.; Kennedy, R.B.; Ovsyannikova, I.G.; Palacios, R.; Ho, P.L.; Kalil, J. Development of vaccines against Zika virus. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, e211–e219. [[CrossRef](#)]
12. Stettler, K.; Beltramello, M.; Espinosa, D.A.; Graham, V.; Cassotta, A.; Bianchi, S.; Vanzetta, F.; Minola, A.; Jaconi, S.; Mele, F.; et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science* **2016**, *353*, 823–826. [[CrossRef](#)]
13. Sapparapu, G.; Fernandez, E.; Kose, N.; Cao, B.; Fox, J.M.; Bombardi, R.G.; Zhao, H.; Nelson, C.A.; Bryan, A.L.; Barnes, T.; et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *540*, 443–447. [[CrossRef](#)]
14. Zhao, H.; Fernandez, E.; Dowd, K.A.; Speer, S.D.; Platt, D.J.; Gorman, M.J.; Govero, J.; Nelson, C.A.; Pierson, T.C.; Diamond, M.S.; et al. Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. *Cell* **2016**, *166*, 1016–1027. [[CrossRef](#)]
15. Ngono, A.E.; Shresta, S. Immune response to dengue and Zika. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, *36*, 279–308. [[CrossRef](#)]
16. Mukhopadhyay, S.; Kuhn, R.J.; Rossmann, M.G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *3*, 13–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Zhang, X.; Jia, R.; Shen, H.; Wang, M.; Yin, Z.; Cheng, A. Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. *Viruses* **2017**, *9*, 338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kaufmann, B.; Rossmann, M.G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect.* **2011**, *13*, 1–9. [[CrossRef](#)]
19. Sirohi, D.; Chen, Z.; Sun, L.; Klose, T.; Pierson, T.C.; Rossmann, M.G.; Kuhn, R.J. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* **2016**, *352*, 467–470. [[CrossRef](#)]
20. Sirohi, D.; Kuhn, R.J. Zika virus structure, maturation, and receptors. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S935–S944. [[CrossRef](#)]
21. Heinz, F.X.; Stiasny, K. The antigenic structure of Zika virus and its relation to other flaviviruses: Implications for infection and immunoprophylaxis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2017**, *81*, e00055-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Barba-Spaeth, G.; Dejnirattisai, W.; Rouvinski, A.; Vaney, M.C.; Medits, I.; Sharma, A.; Simon-Lorière, E.; Sakuntabhai, A.; Cao-Lormeau, V.M.; Haouz, A.; et al. Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *536*, 48–53. [[CrossRef](#)]
23. Lee, I.; Bos, S.; Li, G.; Wang, S.; Gadea, G.; Desprès, P.; Zhao, R.Y. Probing molecular insights into Zika virus–host interactions. *Viruses* **2018**, *10*, 233. [[CrossRef](#)]
24. Li, G.; Bos, S.; Tssetsarkin, K.A.; Pletnev, A.G.; Desprès, P.; Gadea, G.; Zhao, R.Y. The role of prM-E proteins in historical and epidemic Zika virus-mediated infection and neurotoxicity. *Viruses* **2019**, *11*, 157. [[CrossRef](#)]
25. Dai, L.; Song, J.; Lu, X.; Deng, Y.Q.; Musyoki, A.M.; Cheng, H.; Zhang, Y.; Yuan, Y.; Song, H.; Haywood, J.; et al. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell Host Microbe* **2016**, *19*, 696–704. [[CrossRef](#)]
26. Dai, L.; Wang, Q.; Song, H.; Gao, G.F. Zika virus envelope protein and antibody complexes. *Subcell. Biochem.* **2018**, *88*, 147–168. [[CrossRef](#)]

27. Hasan, S.S.; Miller, A.; Sapparapu, G.; Fernandez, E.; Klose, T.; Long, F.; Fokine, A.; Porta, J.C.; Jiang, W.; Diamond, M.S.; et al. A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14722. [[CrossRef](#)]
28. Fontes-Garfias, C.R.; Shan, C.; Luo, H.; Muruato, A.E.; Medeiros, D.B.; Mays, E.; Xie, X.; Zou, J.; Roundy, C.M.; Wakamiya, M.; et al. Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 1180–1190. [[CrossRef](#)]
29. Annamalai, A.S.; Pattnaik, A.; Sahoo, B.R.; Muthukrishnan, E.; Natarajan, S.K.; Steffen, D.; Vu, H.L.X.; Delhon, G.; Osorio, F.A.; Petro, T.M.; et al. Zika virus encoding nonglycosylated envelope protein is attenuated and defective in neuroinvasion. *J. Virol.* **2017**, *91*, e01348-17. [[CrossRef](#)]
30. Carbaugh, D.L.; Baric, R.S.; LaZear, H.M. Envelope protein glycosylation mediates Zika virus Pathogenesis. *J. Virol.* **2019**, *93*, 00113–00119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Goo, L.; DeMaso, C.R.; Pelc, R.S.; Ledgerwood, J.E.; Graham, B.S.; Kuhn, R.J.; Pierson, T.C. The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. *Virology* **2018**, *515*, 191–202. [[CrossRef](#)]
32. Bos, S.; Viranaïcken, W.; Frumence, E.; Li, G.; Desprès, P.; Zhao, R.Y.; Gadea, G. The envelope residues E152/156/158 of Zika virus influence the early stage of virus infection in huma cells. *Cells* **2019**, *8*, 1444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Henderson, E.A.; Tam, C.C.; Cheng, L.W.; Ngonu, A.E.; Nguyen, A.V.; Shresta, S.; McGee, M.; Padgett, H.; Grill, L.K.; Shilman, M.M. Investigation of the immunogenicity of Zika glycan loop. *Virol. J.* **2020**, *17*, 15. [[CrossRef](#)]
34. Qu, P.; Zhang, C.; Li, M.; Ma, W.; Xiong, P.; Liu, Q.; Zou, G.; Lavillette, D.; Yin, F.; Jin, X.; et al. A new class of broadly neutralizing antibodies that target the glycan loop of Zika virus envelope protein. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 1–14. [[CrossRef](#)]
35. Bos, S.; Viranaïcken, 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](#)]
36. Frumence, E.; Viranaïcken, W.; Bos, S.; Alvarez-Martinez, M.T.; Roche, M.; Arnaud, J.D.; Gadea, G.; Desprès, P. A chimeric Zika virus between viral strains MR766 and BeH819015 highlights a role for E-glycan loop in antibody-mediated virus neutralization. *Vaccines* **2019**, *7*, 55. [[CrossRef](#)]
37. Frumence, E.; Viranaïcken, W.; Gadea, G.; Desprès, P. A GFP reporter MR766-based flow cytometry neutralization test for rapid detection of Zika virus-neutralizing antibodies in serum specimens. *Vaccines* **2019**, *7*, 66. [[CrossRef](#)]
38. Jespersen, M.C.; Peters, B.; Nielsen, M.; Marcatili, P. BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W24–W29. [[CrossRef](#)]
39. Rey, F.A.; Heinz, F.X.; Mandl, C.; Kunz, C.; Harrison, S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nat. Cell Biol.* **1995**, *375*, 291–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Stiasny, K.; Heinz, F.X. Flavivirus membrane fusion. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 2755–2766. [[CrossRef](#)]
41. Musso, D.; Desprès, P. Serological diagnosis of flavivirus-associated human infections. *Diagnostics* **2020**, *10*, 302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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



© 2020 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/>).

#### I.4. Discussion de l'article 1

La boucle de glycosylation située dans le domaine EDI semble jouer un rôle majeur dans l'antigénicité de la protéine E de ZIKV, en affectant la disponibilité d'épitopes neutralisants à la surface de la particule virale. Dans cette étude, nos données révèlent que les résidus E-152/156/158 de la protéine E jouent un rôle clé dans la réactivité antigénique de la boucle de glycosylation de ZIKV.

Les résidus E-152 et E-156 semblent essentiels pour la réactivité antigénique de cette boucle de glycosylation, et ceci en relation avec l'état conformationnel du domaine EDI de la protéine E. En effet, la prédiction de la structure tri-dimensionnel de EDI révèle que les substitutions d'acides aminés E-T152I et E-I156T pourraient avoir un effet majeur sur la conformation de la boucle de glycosylation entraînant par ailleurs un changement de positionnement du résidu E-158. Selon une étude récente menée par Qu et ses collègues, les anticorps réagissant à la boucle de glycosylation de la lignée asiatique de ZIKV seraient inefficaces pour reconnaître la souche virale MR776 portant un résidu Tyr à la position E-158 (Qu et al. 2020). En accord avec cette observation, nos résultats démontrent que la substitution d'un résidu Tyr en His à la position E-158 influence grandement la réactivité antigénique de la boucle de glycosylation de ZIKV. L'ensemble de ces données suggère un rôle clé pour le résidu E-158 dans l'arrangement structurale de la protéine E et la liaison d'anticorps potentiellement neutralisant à la surface de la particule virale.

De manière intéressante, nos résultats montrent que le rôle des résidus E-152/156/158 dans la réactivité antigénique de la boucle de glycosylation ne semble pas corrélé à la présence ou à l'absence d'un N-glycane à la position E-154. Cependant, la glycosylation des flavivirus constitue un déterminant majeur dans l'interaction entre le virus et la cellule hôte (Hebert et al. 1995, Ruddock & Molinari 2006, S. Kim et al. 2017), en jouant un rôle clé dans l'infectivité et l'assemblage des particules virales (Aebi 2013, Lei et al. 2015, Annamalai et al. 2017, Zhang et al. 2017, Routhu et al. 2019). Le nombre et la position des sites de glycosylation varient entre les différents flavivirus mais également au sein des différentes souches d'un même virus (Mandl et al. 1989, Post et al. 1992, Johnson et al. 1994, Ishak et al. 2001, Mukhopadhyay et al. 2005, Carbaugh & Lazear 2020). Alors que la protéine E du ZIKV possède un unique site de glycosylation à la position E-154, la protéine E de DENV

possède deux sites potentiels de glycosylation aux positions E-67 et E-153 (Hacker et al. 2009). Par conséquent en plus de constituer des déterminants viraux pour l'antigénicité de la boucle de glycosylation, la substitution des résidus E-152/156/158 conditionne l'état de glycosylation de la protéine E de ZIKV et pourrait donc jouer un rôle majeur dans l'assemblage (Fontes-Garfias et al. 2017), l'infectivité (Mossenta et al. 2017), le tropisme (Wen et al. 2018), et la pathogénèse du virus.

Des modifications conformationnelles de la boucle de glycosylation suite à la substitution des résidus E-152/156/158 pourraient impacter l'infectivité de ZIKV. De nombreuses études suggèrent que la boucle de glycosylation aurait une influence sur la conformation de la protéine E, en ayant un impact sur l'accessibilité du domaine EDII et l'exposition de la boucle de fusion à son extrémité (Goo et al. 2018, Sevana et al. 2018, Bos et al. 2019, Carbaugh et al. 2019, Henderson et al. 2020, Qu et al. 2020). L'analyse structurale de ZIKV identifie la boucle de glycosylation de EDI comme étant une région adjacente à la boucle de fusion de EDII (Kaufmann & Rossmann 2011, Sirohi et al. 2016, Goo et al. 2018). Une étude menée par Bos et ses collègues, démontre une contribution importante des résidus E-152/156/158 au cours des premières étapes de l'infection par ZIKV dans les cellules humaines (Bos et al. 2019). Les résidus E-152/156/158 de la souche asiatique BeH819015 seraient associés à une efficacité accrue de la fusion de la membrane virale au sein des cellules infectées en relation à des changements conformationnels de la protéine E et une augmentation de l'exposition de la boucle de fusion (Bos et al. 2019). D'autre part, la protonation du résidu His en position E-158 pourrait avoir un effet majeur au cours de l'étape de fusion de la particule virale (Bos et al. 2019). Les résidus histidine conservés à l'interface des domaines EDI et EDIII ont été décrits comme étant des capteurs de pH dans la fusion membranaire des flavivirus (Fritz et al. 2008). L'initiation de la fusion dépend de la protonation de ces résidus histidine permettant les changements conformationnels de la protéines E conduisant à l'exposition de la boucle de fusion, la fusion des membranes virales et cellulaires, ainsi que la libération de l'ARN viral (Stiasny & Heinz 2006, Smit et al. 2011, Stiasny et al. 2011).

En raison de l'importance des anticorps dans l'immunité contre les flavivirus et de l'émergence soudaine de ZIKV au cours des quinze dernières années, de nombreux efforts sont consacrés à la compréhension des déterminants antigéniques du virus afin de contribuer au développement d'un vaccin efficace (Heinz & Stiasny 2012, Fernandez & Diamond 2017, Poland et al. 2018). La production d'anticorps neutralisants ciblant la protéine E joue un rôle clé dans la protection contre l'infection par ZIKV (Dai et al. 2016, Sapparapu et al. 2016, Zhao et al. 2016). En tant qu'antigène le plus important des flavivirus, la protéine E a été choisie comme cible dans de nombreux développements et stratégies vaccinales. Dans une étude récente, Lebeau et ses collègues, ont identifié les résidus E-152/156/158 de la protéine E des souches asiatiques de ZIKV comme présentant un mimétisme moléculaire avec des protéines liées au syndrome de Guillain-Barré (SGB) et au développement de l'auto-immunité suite à l'infection par ZIKV (Lebeau et al. 2021). L'utilisation de notre peptide synthétique 1GSQHSGMTVNDIGYETDENR20, qui possède les résidus E-152/156/158 de la souche africaine MR766-NIID, pourrait donc être d'un intérêt majeur pour étudier plus avant l'implication de la boucle de glycosylation du domaine EDI sur la disponibilité des épitopes d'anticorps neutralisants à la surface du ZIKV et aider à la conception d'un futur vaccin sûr, spécifique et efficace. Un tel peptide pourrait également être utilisé dans la conception de test ELISA permettant le diagnostic sérologique de l'infection par ZIKV grâce à la détection d'anticorps spécifique de la boucle de glycosylation de la protéine E (Zhao et al. 2016).

## **II. Rôle des résidus M-31/41 dans l'activité pro-apoptotique du virus Zika**

### **II.1. Contexte de l'étude**

L'induction de la mort cellulaire par apoptose est un effet cytopathique important dans l'infection par ZIKV (Frumence et al. 2016, Souza et al. 2016, Turpin et al. 2022). Il est alors intéressant de savoir quels déterminants viraux seraient responsables de l'apoptose induite dans les cellules infectées par ce virus. La protéine de membrane prM/M de ZIKV est la seconde protéine majoritaire se trouvant à la surface de la particule virale. La protéine prM/M a été décrite comme jouant un rôle majeur dans de multiples processus lors de l'infection par les flavivirus (Mukhopadhyay et al. 2005). Outre son importance dans l'entrée, la morphogénèse et la maturation de la particule virale (Murray et al. 2008, Apte-Sengupta et al. 2014), des études récentes démontrent que la protéine prM/M semble être le support de déterminants viraux associés à la pathogénicité des flavivirus (de Wispelaere et al. 2015, Yuan et al. 2017, Basset et al. 2020). La protéine prM/M est exprimée sous la forme du précurseur protéique prM, qui est clivée au cours du cycle viral dans un compartiment post-Golgi. Ce clivage mène à la production de la forme mature de la protéine de membrane M qui est constituée d'un ectodomaine de 40 acides aminés (M-1/40) suivi d'une région d'ancrage transmembranaire (Stadler et al. 1997).

Il a récemment été rapporté que l'expression de la protéine M mature de DENV pouvait entraîner l'activation de l'inflammasome (Pan et al. 2019), alors que la protéine M de ZIKV a été décrite comme interagissant avec la membrane plasmique cellulaire et semblerait agir comme une viroporine facilitant l'entrée du virus dans la cellule hôte (Brown et al. 2019, Brown et al. 2021, Tomar et al. 2022). Historiquement, Catteau et ses collègues ont démontré que l'expression de l'ectodomaine M de DENV conjuguée à une protéine rapportrice GFP pouvait déclencher l'apoptose dans des cellules d'hépatome humain (Catteau, Kalinina, et al. 2003). Une analyse mutationnelle a permis de restreindre la séquence virale pro-apoptotique à un oligopeptide représentant les derniers résidus d'acides aminés C-terminaux M-32/40 de l'ectodomaine M de DENV (Catteau, Kalinina, et al. 2003). L'induction de l'apoptose était associée à une localisation de l'oligopeptide M-32/40 dans un compartiment post-Golgi, conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial et une activation de la

caspase 3 effectrice de l'apoptose (Catteau, Roué, et al. 2003). La protéine M mature semblerait donc jouer un rôle majeur dans l'apoptose induite par les flavivirus.

## **II.2. Résumé de l'étude**

Dans cette étude, nous évaluons la capacité des résidus M-31/41 de ZIKV à induire l'apoptose dans des cellules d'hépatome et d'adénocarcinome pulmonaire humain. Pour ce faire, l'oligopeptide 31RVENWIFRNPG41 (ci-après nommé ZAMP pour Zika Apoptosis M Peptide) représentant les résidus M-31/41 de la souche asiatique BeH819015 de ZIKV, a été couplé à l'extrémité C-terminale d'une protéine rapportrice GFP et d'un antigène associé aux tumeurs. Les constructions résultantes ont été évaluées pour leur capacité à déclencher l'apoptose dans différents types de cellules tumorales. Nous avons démontré que les protéines recombinantes associées à l'oligopeptide ZAMP avaient la capacité de déclencher l'apoptose dans les cellules tumorales humaines par activation des caspases 3 et 7. Nous avons par conséquent démontré la capacité de ZAMP à conférer une activité pro-apoptotique à un antigène associé à une tumeur humaine. En outre, nos résultats révèlent de manière intéressante que les résidus M-33/35/38 semblent jouer un rôle essentiel dans l'activité pro-apoptotique associée à l'oligopeptide ZAMP.

*> Les résultats de cette étude seront présentés et discutés plus en détail dans la section « II.4. Discussion de l'article 2 », page 160.*

## II.3. Article 2: Zika M Oligopeptide ZAMP Confers Cell Death-Promoting Capability to a Soluble Tumor-Associated Antigen through Caspase-3/7 Activation



International Journal of  
Molecular Sciences



Article

### Zika M Oligopeptide ZAMP Confers Cell Death-Promoting Capability to a Soluble Tumor-Associated Antigen through Caspase-3/7 Activation

Bénédicte Vanwalscappel <sup>†</sup>, Juliano G. Haddad <sup>†</sup>, Roba Almokdad, Jason Decotter , Gilles Gadea and Philippe Despres <sup>\*</sup>

Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97491 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; benedicte.vanwalscappel@univ-reunion.fr (B.V.); juliano.haddad@univ-reunion.fr (J.G.H.); mokdadroba@gmail.com (R.A.); jason.decotter@univ-reunion.fr (J.D.); gilles.gadea@inserm.fr (G.G.)

\* Correspondence: philippe.despres@univ-reunion.fr; Tel.: +262-262938806

<sup>†</sup> These authors contributed to equally to this work.

Received: 8 November 2020; Accepted: 14 December 2020; Published: 16 December 2020



**Abstract:** Mosquito-borne Zika virus (ZIKV) is an emerging flavivirus of medical concern associated with neurological disorders. ZIKV utilizes apoptosis as a mechanism of cell killing. The structural M protein may play a role in flavivirus-induced apoptosis. The death-promoting capability of M has been restricted to an oligopeptide representing the residues M-32/40. Here, we evaluated the apoptosis inducing ability of the residues M-31/41 of ZIKV. The ZIKV M oligopeptide was associated to a soluble form of GFP (sGFP) and the resulting sGFP-M31/41 construct was assessed in Huh7 cells. Expression of sGFP-M31/41 can trigger apoptosis in Huh7 cells through caspase-3/7 activation. The translocation of sGFP-M31/41 in the endoplasmic reticulum was a prerequisite for apoptosis induction. The residues M-33/35/38 may play a critical role in the death-promoting activity of sGFP-M31/41. The effect of ZIKV M oligopeptide defined as ZAMP (for Zika Apoptosis M Peptide) on expression of a tumor-associated antigen was assayed on megakaryocyte-potentiating factor (MPF). Expression of MPF-ZAMP construct resulted in caspase-associated apoptosis activation in A549 and Huh7 cells. ZIKV has been proposed as an oncolytic virus for cancer therapy. The ability of the Zika M oligopeptide to confer death-promoting capability to MPF opens up attractive perspectives for ZAMP as an innovative anticancer agent.

**Keywords:** arbovirus; Zika virus; M protein; viral oligopeptide; apoptotic cell death; viral apoptosis inducer; caspase-3/7 activation; tumor cells; tumor-associated antigen; anticancer agent; anticancer virotherapy

#### 1. Introduction

Zika virus is an emergent mosquito-borne, enveloped RNA virus belonging to the flavivirus genus of the *Flaviviridae* family. ZIKV is a neurotropic pathogen that mainly targets the central nervous system (CNS) [1], leading to several neurological diseases such as congenital neurological disorders and Guillain–Barré syndrome in adults [2,3]. ZIKV strains are clustered into two major lineages, the African and Asian genotypes [4], the latter being responsible for the current epidemics with a million cases of infection reported, in particular in South America. In addition to its conventional transmission by infected mosquito bite, human-to-human sexual or maternal-to-fetal transmission has been confirmed during the recent epidemics.

Like other flaviviruses such as dengue virus (DENV), yellow fever virus (YFV), and West Nile virus (WNV), ZIKV contains a single genomic RNA encoding a large polyprotein that is co- and post-translationally processed into three structural proteins C (capsid protein), prM (the intracellular precursor of the small membrane M protein), and E (envelope protein) followed by nonstructural proteins NS1 to NS5. The processing of prM in mature M protein (75 amino-acid residues) by the host furin/subtilisin protease family occurs in a post-Golgi compartment leading to the release of mature and infectious virus particles. The mature M protein consists of an ectodomain (hereafter referred to as ectoM) composed of amino acids M-1/40 followed by a transmembrane-anchoring region including two transmembrane domains (TMDs). It is of note that dengue M sequences are highly conserved among the four serotypes unlike other structural proteins.

It has recently been reported that expression of mature DENV M protein leads to inflammasome activation [5]. Historically, it had been demonstrated that expression of DENV ectoM conjugated to a reporter protein such as GFP can trigger apoptosis in human hepatoma cells [6]. The death-promoting activity is associated with a localization of DENV ectoM protein in a post-Golgi compartment [6]. Mutational analysis allowed the proapoptotic viral sequence to be restrained to the last C-terminal amino-acid residues M-32/40 of DENV ectoM which had been named ApoptoM [6]. Although the mechanism of ApoptoM-mediated cell death still needs to be better understood, apoptosis triggered by ApoptoM was associated with a mitochondrial dysfunction leading to activation of apoptosis executioner caspase-3 [7]. In the present study, we wondered whether the residues M-31/41 of epidemic Brazilian ZIKV strain BeH819015 could trigger apoptosis in human hepatoma and pulmonary adenocarcinoma cells. For this purpose, the ZIKV M oligopeptide representing the residues M-31/41 of BeH819015 was positioned at the C-terminus of reporter GFP and a tumor-associated antigen. We showed that recombinant proteins carrying the ZIKV residues M31/41 have the ability to trigger apoptosis in human cells through caspase-3/7 activation.

## 2. Results

### 2.1. Apoptosis-Inducing Ability of a Recombinant GFP Protein Carrying the ZIKV Residues M-31/41

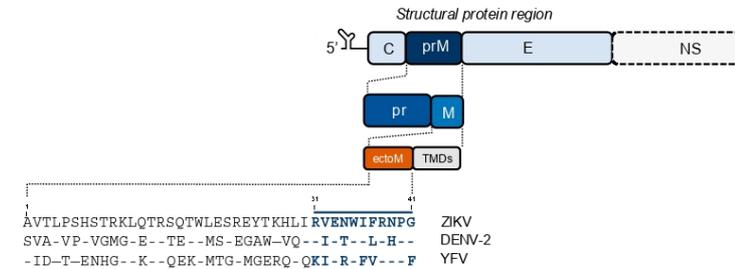
We investigated whether the residues M-31/41 from epidemic ZIKV strain BeH819015 could trigger apoptosis as previously observed with DENV and YFV (Figure 1A). Consequently, we generated a soluble recombinant GFP (sGFP) protein in which the ZIKV M oligopeptide was added to its C-terminus (Figure 1B). The sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> construct was preceded by the ZIKV prM signal peptide corresponding to the last amino-acid residues of BeH819015 C protein (Figure 1B). A same design of GFP-based constructs was applied for residues M-31/41 of DENV-2 and YFV to serve as positive controls. A sGFP construct with only the glycine-serine spacer at the C-terminus was used as a negative control (Figure 1B).

Given that human hepatoma cells were susceptible to death-promoting activity of DENV and YFV M ectodomains [6], transfection with plasmids expressing recombinant sGFP was performed in Huh7 cells. FACS analysis showed that GFP expression rate was similar between Huh7 cells expressing sGFP with or without M-31/41 sequence, indicating that the different GFP constructs were suitable for further characterization (Figure S1).

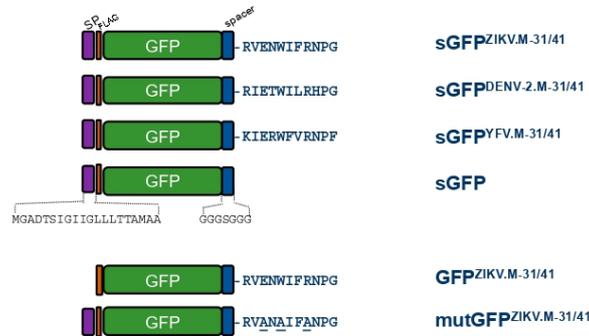
To determine whether expression of sGFP proteins carrying the different M oligopeptides has an effect on cell membrane integrity, Huh7 cells were transfected with vector plasmids expressing either sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup>, sGFP<sup>DENV-2.M-31/41</sup>, or sGFP<sup>YFV.M-31/41</sup> (Figure 2). The sGFP construct was used as a control. Cell membrane integrity was evaluated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release (Figure 2). At 24 h post-transfection, no significant change in LDH activity was observed in transfected Huh7 cells whatever the recombinant GFP constructs tested. At 48 h post-transfection, LDH activity increased in Huh7 cells expressing the sGFP constructs as compared to control (Figure 2). Only the sGFP<sup>YFV.M-31/41</sup> construct was slightly more cytotoxic compared to other sGFP constructs. From these

results, it has been estimated that 24 h was the more appropriate time-point of transfection to assess the death-promoting capability of sGFP constructs with the flavivirus M oligopeptides in Huh7 cells.

**A**



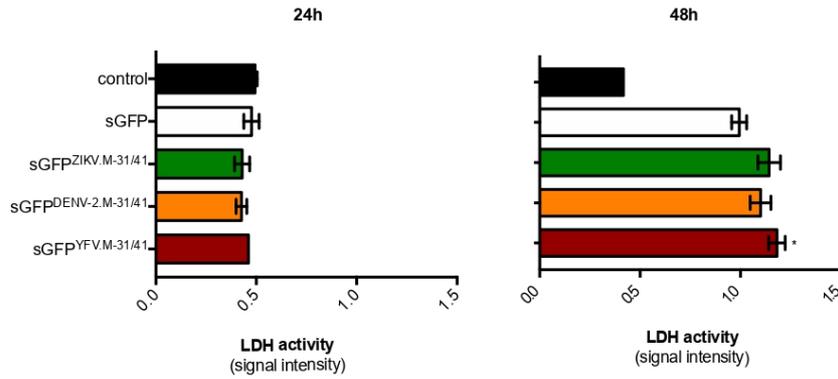
**B**



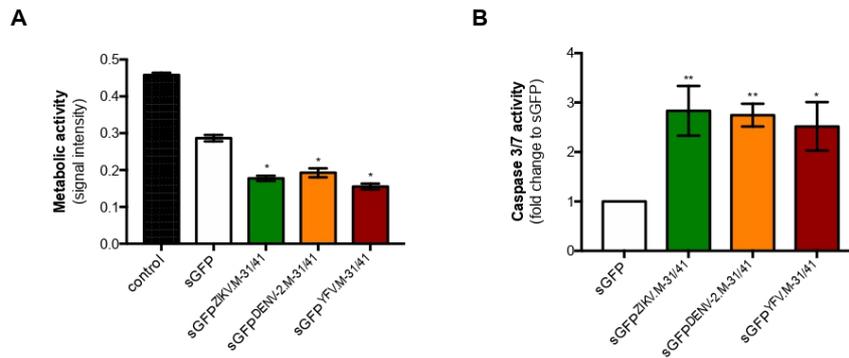
**Figure 1.** Schematic representation of the GFP-M oligopeptide constructs. In (A), a schematic representation of mature prM protein that is structured into a “pr” polypeptide followed by the residues M-1/41 which compose the M ectodomain and ending in a transmembrane anchoring region with two transmembrane domains (TMDs). The residues M-1/41 of epidemic Brazilian ZIKV strain BeH819015, epidemic La Reunion 2018 DENV-2 strain RUJol and YFV 17D vaccine strain are listed. The last C-terminal residues of flavivirus M ectodomain are underlined. In (B), the GFP constructs are preceded at the N-terminus by the signal peptide (SP) of ZIKV prM protein followed by a FLAG epitope. The soluble sGFP-M oligopeptide constructs are ended by a glycine–serine spacer followed by the residues M-31/41 of ZIKV, DENV-2 or YFV. The sGFP construct is restricted to a glycine–serine spacer at its C-terminus. The GFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> construct is a mutant lacking in prM signal peptide. The mutGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> construct was made by replacing the residues M-E33/W35/R38 with alanine. The three Ala mutations in mutGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> are underlined.

We evaluated whether sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> expression had an effect on the metabolism of Huh7 cells by measuring MTT activity at 24 h post-transfection (Figure 3). As expected, both GFP<sup>DENV.2.M31/41</sup> and GFP<sup>YFV.M31/41</sup> had a significant impact on cell metabolic activity as compared to control sGFP (Figure 3A). A comparable reduction was observed with sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> indicating that ZIKV M oligopeptide had an effect on the metabolic activity of Huh7 cells. To determine whether the sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> construct had the ability to trigger apoptosis in Huh7 cells, caspase activation was assessed by measuring the enzymatic activity of caspases 3 and 7 which are two key effectors of the apoptosis signaling pathway (Figure 3B). Using a caspase-3/7 assay kit, we found a 2.5-fold increase in caspase enzymatic activity in Huh7 cells expressing GFP<sup>DENV.2.M-31/41</sup> and GFP<sup>YFV.M-31/41</sup>, consistent with their ability

to trigger apoptosis in human hepatoma cells [6]. A comparable caspase-3/7 enzymatic activity was detected in Huh7 cells expressing the sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> construct (Figure 3B). Like DENV-2 and YFV, the residues M-31/41 of ZIKV strain Beh819015 had apoptosis-inducing ability in hepatoma cells through caspase-3/7 activation.

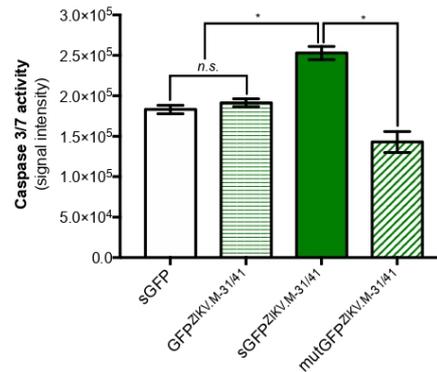


**Figure 2.** Effect of sGFP-M31/41 constructs on cell membrane integrity. Huh7 cells were transfected 24 h (left) or 48 h (right) with plasmids expressing sGFP or sGFP-M31/41 constructs, or mock-transfected cells (control). LDH activity was measured and cell membrane permeability was expressed as signal intensity (O.D.). The results are the mean ( $\pm$ SEM) of three (24 h) or six independent experiments (48 h). Statistical analysis for comparing sGFP-M constructs with sGFP was performed and noted (\*  $p < 0.01$ ); differences that were not statistically significant are omitted.



**Figure 3.** Expression of sGFP-M31/41 constructs affects cell viability. Huh7 cells were transfected 24 h with plasmids coding for sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup>, sGFP<sup>DENV-2.M-31/41</sup>, or sGFP<sup>YFV.M-31/41</sup> or mock-transfected (control). The sGFP plasmid construct served as a control. In (A), the level of cell metabolic activity was measured using MIT assay and expressed as signal intensity (O.D.). The results are the mean ( $\pm$ SEM) of six independent assays. Statistical analysis for comparing sGFP-M constructs with sGFP was performed and noted (\*  $p < 0.0001$ ). In (B), Caspase 3/7 enzymatic activity was expressed as the fold change of caspase enzymatic activity in assay relative to sGFP. The results are the mean ( $\pm$ SEM) of six independent assays. Statistical analysis for comparing sGFP-M constructs with sGFP was performed and noted (\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.01$ ).

It has been demonstrated that intracellular trafficking of DENV M ectodomain is essential for apoptosis induction [6]. To evaluate whether the same prerequisite exists for ZIKV M oligopeptide, the signal sequence for ER-targeting has been removed from the sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> construct leading to a GFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> mutant (Figure 1B). The level of caspase-3/7 enzymatic activity was not significantly different in Huh7 cells expressing the GFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> mutant or the sGFP construct lacking in residues M-31/41 (Figure 4). Thus, the triggering of apoptosis in Huh7 cells involves a transport of soluble GFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> in the secretory pathway.



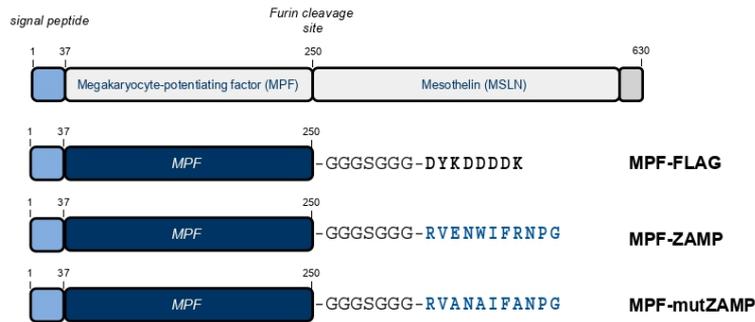
**Figure 4.** Caspase-associated apoptosis activation requires the signal peptide of sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> and involves the residues M-E33/W35/R38. Huh7 cells were transfected 24 h with plasmids expressing sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> or its mutants lacking a signal peptide (GFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup>) or bearing the Ala residues at positions M-33/35/38 (mutGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup>). The sGFP plasmid construct served as a control. Caspase 3/7 enzymatic activity was measured using a caspase-3/7 assay kit, and the O.D. values were expressed as signal intensity. The results are the mean ( $\pm$ SEM) of three independent experiments. Statistical analysis for comparing sGFP-M constructs with sGFP was performed and noted (\*  $p < 0.0001$ ; n.s.: nonsignificant).

We next assessed the possibility of generating a mutant of sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> which had lost its death-promoting activity. It is of note that the residues E-33/35/38 are identical among the M proteins of ZIKV, DENV-2 and YFV (Figure 1A). Moreover, the residue Tryp at position M-35 is strictly conserved among flavivirus M sequences suggesting an important role in apoptosis mediated by flavivirus M ectodomain. By direct mutagenesis, three amino-acid substitutions M-E33A/W35A/R38A were introduced into a sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> construct leading to a mutGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> mutant (Figure 1B). As shown in Figure 4, there was a comparable increase in caspase-3/7 enzymatic activity in Huh7 cells expressing mutGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> and sGFP control. Thus, introduction of Ala residues at three positions M-33/35/38 dramatically reduced the capacity of sGFP<sup>ZIKV.M-31/41</sup> to trigger apoptosis suggesting a critical role for M-E33/W35/R38 in the death-promoting activity of the C-terminal amino-acids of ZIKV M ectodomain.

## 2.2. ZIKV M Oligopeptide Confers Death-Promoting Capability to MPF

We wondered whether association of ZIKV residues M-31/41 to a human tumor-associated antigen could trigger caspase-associated apoptosis. Mesothelin (MSLN, 630 amino-acid residues) is a tumor-associated antigen which is overexpressed in many human cancers [8]. The megakaryocyte-potentiating factor (MPF, 250 amino-acid residues) is a N-terminal cleavage product from preprotein MSLN [9] (Figure 5). As a human tumor antigen, soluble MPF is released into the circulation serving as a biomarker for the prognosis of lung cancers. The oligopeptide RVENWIFRNPG (hereafter referred to as ZAMP for Zika Apoptosis M Peptide) representing the ZIKV

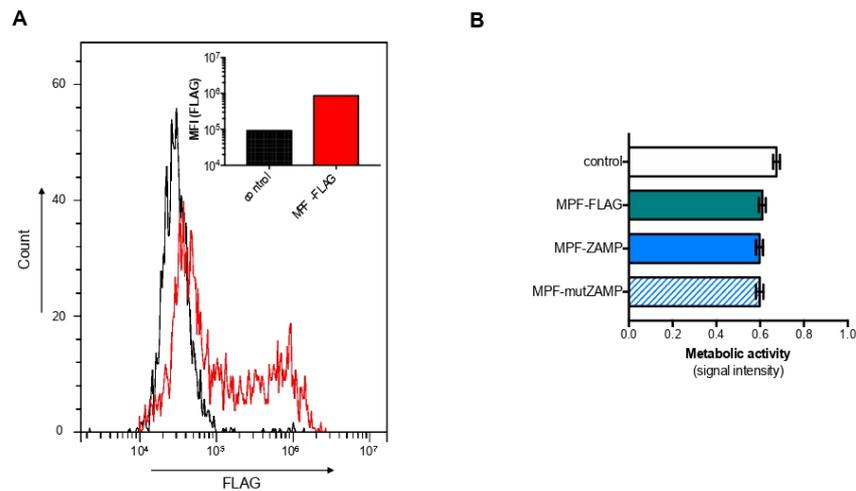
M-31/41 residues was joined to the C-terminus of MPF (Figure 5). The gene coding for human MPF ended by a glycine–serine spacer and ZAMP was inserted into pcDNA3 plasmid. The authentic signal peptide of MPF was used for translocation of MPF-ZAMP into the secretory pathway. A recombinant MPF protein tagged with a FLAG epitope in place of ZAMP was used as a control (Figure 5). Given that the death-promoting activity of mutZAMP had been lost due to mutations on residues M-33/35/28 (Figure 4), a MPF-mutZAMP mutant was made by replacing the residues M-E33/W35/R38 of ZAMP with alanine (Figure 5).



**Figure 5.** Schematic representation of MPF-ZAMP constructs. At the top, the organization of 69-kDa preprotein mesothelin (MSLN) that is processed into MPF (megakaryocyte-potentiating factor) and membrane-anchored MSLN by furin protease. The signal peptide of MSLN (residues 1/37) is indicated as a blue box. At the bottom, the MPF constructs with at the C-terminus, a Gly–Ser spacer followed by a FLAG epitope or ZIKV M oligopeptide ZAMP. The MPF-mutZAMP construct was made by replacing the three residues M-E31/W35/538 of ZAMP with alanine.

To validate the expression of our recombinant MPF in human cells, human embryonic kidney HEK-293T cells were transfected with a plasmid expressing MPF-FLAG protein. FACS analysis detected a high expression level of MPF-FLAG in HEK-293T cells using anti-FLAG antibody (Figure 6A). The effects of MPF-ZAMP expression on cell viability were examined by measuring MTT activity. At 48 h post-transfection, there was no change in metabolic activity of HEK-293T cells expressing MPF-ZAMP or MPF-mutZAMP as compared to MPF-FLAG (Figure 6B). Thus, expression of a recombinant MPF bearing ZAMP or its defective mutant had no effect on the viability of HEK-293T cells. The absence of sensitivity of HEK-293T cells to ZAMP expression is consistent with a previous report on a lack of proapoptotic activity of DENV ApoptoM in these cells [6].

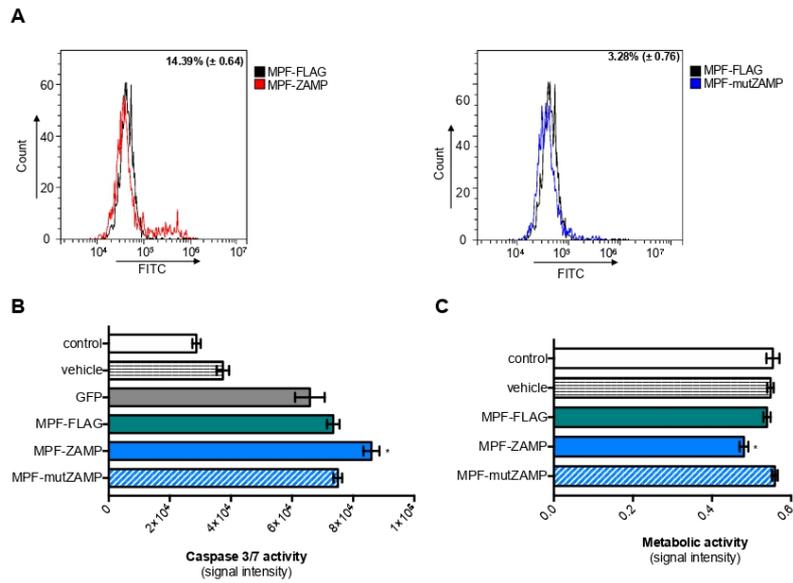
Given that MPF is a biomarker of lung cancers [10], pulmonary adenocarcinoma A549 cells were tested with plasmids expressing MPF-ZAMP proteins. FACS analysis using anti-FLAG antibody showed that expression of the MPF-FLAG protein was efficient in A549 cells as observed with HEK-293T cells (Figure S2). The death-promoting activity of MPF-ZAMP in A549 cells was assessed by measuring the rate of early apoptosis using the Annexin V affinity assay, which detects phosphatidylserine (PS) translocation to the outer layer of the cell membrane. At 24 h post-transfection, expression of MPF-ZAMP resulted in a significant increase in the rate of Annexin V-positive A549 cells by at least 14% as compared to control MPF-FLAG (Figure 7A). No Annexin V-positive A549 cells were detected with MPF-mutZAMP mutant.



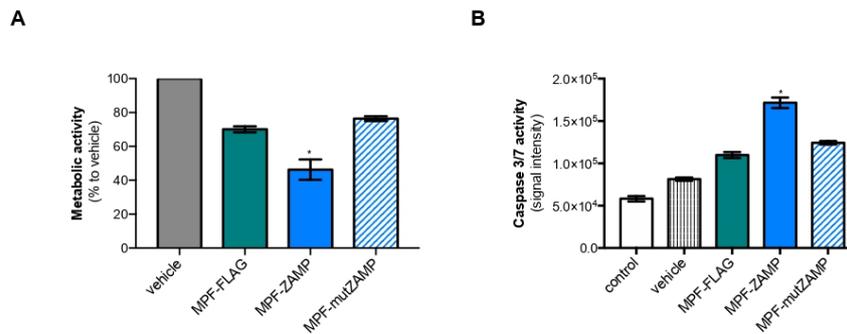
**Figure 6.** ZAMP associated to MPF has no effect on HEK-293T cells. Cells were transfected 24 h (A) or 48 h (B) with plasmids expressing MPF-FLAG, MPF-ZAMP, MPF-mutZAMP, or mock-transfected (control). In (A), FACS analysis was performed on cells expressing MPF-FLAG using anti-FLAG antibody. The percentage and the mean of fluorescence intensity (MFI) of positive cells are shown. In (B), the level of metabolic activity was measured using an MTT assay and expressed as signal intensity (O.D.). The results are the mean ( $\pm$ SEM) of four independent assays. Statistical analysis for comparing MPF constructs with MPF-FLAG was performed and nonstatistical differences were observed.

We next evaluated whether expression of MPF-ZAMP induces caspase activation in A549 cells. A GFP plasmid construct was used as a control of caspase activity in transfected cells. At 24 h post-transfection, a comparable level of caspase-3/7 enzymatic activity was detected in A549 cells expressing MPF-FLAG or GFP. The level of caspase-3/7 enzymatic activity was significantly higher in A549 cells expressing MPF-ZAMP compared to MPF-FLAG (Figure 7B). However, there was no difference in caspase-3/7 activity between MPF-mutZAMP and MPF-FLAG (or GFP) in A549 cells consistent with the fact that Ala mutant of ZAMP has no ability to trigger apoptosis. We examined whether the induction of apoptosis in A549 cells expressing MPF-ZAMP was associated with an impact on cell metabolism activity (Figure 7C). Using a MTT assay, we showed that expression of MPF-ZAMP but not MPF-FLAG or MPF-mutZAMP significantly reduced the level of metabolic activity in A549 cells. Taken together, these results showed that ZAMP has the ability to confer death-promoting capability to MPF.

We wondered whether MPF-ZAMP could trigger apoptosis in human hepatoma cells such as Huh7 cells. A MTT assay showed that expression of MPF-ZAMP resulted in a dramatic loss of metabolic activity in Huh7 cells at 24 h post-transfection. Consequently, the impact of MPF-ZAMP expression on the level of cell metabolism activity was examined at 18 h post-transfection. At this timepoint of transfection, the level of metabolic activity was significantly reduced in Huh7 cells expressing MPF-ZAMP as compared to MPF-FLAG or MPF-mutZAMP (Figure 8A). The effect of MPF-ZAMP on cellular metabolism coincided with a high level of caspase-3/7 enzymatic activity in Huh7 cells (Figure 8B). At 24 h post-transfection, a comparable level of caspase-3/7 activation was detected in Huh7 cells expressing MPF-mutZAMP or MPF-FLAG. There was a lack of proapoptotic activity for the ZAMP mutant bearing the Ala mutations (Figure S3). We can conclude that expression of MPF-ZAMP induces caspase-associated apoptosis activation in Huh7 cells as it has been observed with A549 cells.



**Figure 7.** Expression of MPF-ZAMP triggers apoptosis in A549 cells. A549 cells were transfected 24 h with plasmids expressing MPF-FLAG, MPF-ZAMP, MPF-mutZAMP or GFP or transfectant alone (vehicle) or mock-transfected (control). In (A), A549 cells were transfected with plasmids expressing MPF-ZAMP or MPF-mutZAMP. Cells in apoptotic state were quantified by staining with FITC-labeled Annexin V. The percentage of Annexin V-positive cells was determined by FACS analysis. The results are the mean ( $\pm$ SEM) of two independent assays. In (B), caspase 3/7 enzymatic activity was measured using a caspase-3/7 assay kit, and the O.D. values were expressed as signal intensity. The results are the mean ( $\pm$ SEM) of four independent assays. Statistical analysis for comparing MPF constructs with GFP was performed and noted ( $* p < 0.001$ ); any nonstatistically significant comparisons are omitted. In (C), the level of metabolic activity was measured using an MTT assay and expressed as signal intensity (O.D.). The results are the mean ( $\pm$ SEM) of three independent assays. Statistical analysis for comparing MPF constructs with MPF-FLAG was performed and noted ( $* p < 0.001$ ); differences that were not statistically significant are omitted.



**Figure 8.** Expression of MPF-ZAMP triggers apoptosis in Huh7 cells. Huh7 cells were transfected with plasmids encoding MPF-FLAG, MPF-ZAMP, MPF-mutZAMP or transfectant alone (vehicle) or mock-transfected (control). In (A), the level of metabolic activity in Huh7 cells was determined at 18 h post-transfection using an MTT assay. The results were expressed as a percentage of cell metabolic activity in each assay relative to that in the vehicle and the results were the mean ( $\pm$ SEM) of four independent assays. Statistical analysis for comparing MPF constructs with MP-FLAG was performed and noted ( $* p < 0.001$ ); any nonstatistically significant comparisons were omitted. In (B), caspase 3/7 enzymatic activity was measured at 18 h post-transfection using a caspase-3/7 assay kit, and the O.D. values were expressed as signal intensity. The results were the mean ( $\pm$ SEM) of six independent assays. Statistical analysis for comparing MPF constructs with MPF-FLAG was performed and noted ( $* p < 0.0001$ ); any nonstatistically significant comparisons were omitted.

### 3. Discussion

Flaviviruses expose on their surface the structural proteins E and M, the latter being cleaved from its glycosylated precursor form prM into immature virus particles during their exocytic transit towards extracellular compartments [11]. The mature M protein comprises a 40-residue-long ectodomain followed by a membrane anchoring region composed of two transmembrane domains. Little is still known about the role of small integral membrane M protein in the biology and pathogenicity of flaviviruses. A role has been evoked for M in flavivirus assembly [12–15]. Recently, a channel activity has been designated to ZIKV M protein promoting virus entry into the host-cell [16]. Historically, we identified a role for the M ectodomain in apoptotic cell death triggered by DENV and YFV [6]. It has been found that proapoptotic activity of the DENV M ectodomain essentially relates to its last C-terminal amino-acid residues which compose a viral apoptosis inducer named ApoptoM [6]. Expression of ApoptoM results in mitochondrial membrane permeabilization leading to caspase-3 activation [6,17].

ZIKV can trigger apoptotic cell death in vitro as well as in vivo [18–21]. The structural proteins prM and E have been associated with apoptosis mediated by ZIKV [22]. In the present study, we demonstrated that the last C-terminal residues M-31/41 of the ZIKV M ectodomain from Brazilian viral strain BeH819015 have death-promoting activity through caspase-3/7 activation. To our knowledge, this is the first time that a proapoptotic activity has been assigned to the ZIKV M oligopeptide RVENWIFRNPG for which the acronym ZAMP (for Zika Apoptosis M Peptide) has been proposed. We noted that the ZAMP sequence shares at least 60% of its identity with the counterpart from DENV-2 but less than 30% with YFV, despite the fact that the death-promoting activity of the last C-terminal residues of the M ectodomain is conserved among the three flaviviruses. We identified the residues M-33/35/38 as playing a key role in the proapoptotic activity of ZAMP. Noteworthy, the residue Tryp to position M-35 is strictly conserved among flavivirus M proteins. Although it is highly likely that ZIKV cannot tolerate a change of the three residues M-33/35/38 together, it would be of great interest to assess the contribution of each the three residues in relation to the death-promoting activity of

ZIKV. We reported that the amino-acid substitution M-L36F which differentiates wild-type YFV to live attenuated YFV vaccine strains abolished the capacity of the M ectodomain to trigger apoptosis [6]. The mutation M-L36F has been also involved in a loss of neurovirulence for Japanese encephalitis virus, a close relative to ZIKV [23]. It will be of great interest to investigate the role of residue M-36 in the pathogenic properties of ZIKV. Such a study could be beneficial for the further development of live attenuated strains as Zika vaccine candidates [24].

The apoptosis signaling pathways involved in ZAMP-mediated cell death still remain to be investigated. Our previous studies on DENV M ectodomain have shown that the triggering of apoptosis involves the trafficking of viral sequences into the secretory pathway [6]. We showed that ZAMP-mediated apoptosis requires the translocation of the M oligopeptide into the secretory pathway. Flavivirus infection causes a consistent increase in the amount of the proapoptotic Bax [25,26]. A dysregulation of MCL-1 expression associated with the inhibition of antiapoptotic BCL-XL protein as well as caspase 8 activation contribute to apoptosis mediated by flaviviruses [27]. In the ER, Sphingosine Kinase SPHK2 can generate proapoptotic ceramides through the production of sphingosine 1-phosphate which acts as an intracellular signaling molecule. Interestingly, SPHK2 has been shown to interact with DENV proteins leading to apoptotic cell death [28]. How this relates to ZAMP will have to be addressed in the future.

In the present study, we demonstrated that ZAMP association with MPF which relates to tumor-associated antigen mesothelin can trigger apoptosis in hepatoma and pulmonary adenocarcinoma cells. Expression of MPF with ZAMP protein results in PS translocation to the outer leaflet of the plasma membrane and caspase-3/7 activation leading to a loss of cell metabolic activity without affecting cell membrane permeability. A lack of apoptosis was observed in HEK-293T cells expressing ZAMP as it has been already reported with the proapoptotic M sequence of DENV-2 [6]. Transformed HEK-293T cells are defective in terms of p53 protein activation [29] that has been described to be the central component in the complex network of apoptosis signaling pathways [30]. The fact that ZAMP induces caspase-3/7 activation in A549 cells having a functional p53 protein [31] as well as p53-deficient Huh7 cells [32] do not sustain a major role for p53-dependent signaling pathway in apoptosis mediated by ZAMP. The megakaryocyte-potentiating factor is part of the tumor-associated antigen (TAA) mesothelin. Over the past several decades, several useful TAAs have been identified and characterized for their biochemical properties. TAAs represent a group of normal nonmutant molecules and can be subdivided into four major categories according to expression pattern: (1) cancer-testis antigens such as MAGE-1 are expressed in a wide range of different cancers including melanoma, bladder cancer and neuroblastoma [33]; (2) Differentiation antigens including tyrosinase TRP-1 are expressed in differentiation stage-dependent and tissue-specific manners [34,35]; (3) oncofetal antigens including carcinoembryonic antigen (CEA) are found in embryonic and fetal tissues as well as certain cancers [36,37]; (4) overexpressed antigens such as mesothelin that are normal proteins whose expression is upregulated in cancer cells [9].

Recently, ZIKV has gained attention in the oncolytic virotherapy field as a potential oncolytic virus due to its neurotropism and its efficacy against glioblastoma multiforme and aggressive metastatic forms of human CNS tumors [38–40]. As aforementioned, the association of ZAMP to MPF was efficient for the triggering of apoptosis in different types of tumor cells. The ability of ZAMP to confer proapoptotic capability to TAA could open important perspectives for such a ZIKV M oligopeptide in cancer therapy strategies through tumor cell death and immune recognition of the TAA by antigen-presenting cells.

#### **4. Materials and Methods**

##### *4.1. Cell Lines and Antibodies*

Huh7 cells (a generous gift from Dr N. Jouvenet, Institut Pasteur, Paris, France), A549 cells (ATCC, CCL-185) and HEK-293T cells (ATCC, CRL-1573) were cultured in Minimum Essential Media (MEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and nonessential

amino acids. The mouse anti-DDDDK tag mAb (anti-FLAG<sub>tag</sub> antibody) and goat anti-mouse immunoglobulin-horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody were purchased from Abcam (Cambridge, UK).

#### 4.2. Vector Plasmids Expressing GFP and MPF Constructs

A synthetic gene coding for the reporter gene GFP preceded by the last C-terminal amino-acids of ZIKV C protein (Genbank reference number KU365778) which which compose the prM signal peptide and followed by a FLAG epitope was synthesized and then inserted into *Nhe* I and *Not* I restriction sites of vector plasmid pcDNA-3.1 by Genecust (Boynes, France). The GFP constructs ended by a Gly-Ser spacer followed by the residues M-31/41 of DENV-2 strain RUJUL (Genbank reference number MN272404), YF-17D vaccine strain (Genbank reference number X03700), or epidemic ZIKV strain BeH819015 (Genbank reference number KU365778) were synthesized and then inserted into *Nhe* I and *Not* I restriction sites of pcDNA-3.1 by Genecust (Boynes, France). A synthetic gene coding for the soluble MPF fragment (residues MSLN-37/250) from MSLN protein (Genbank reference number NM\_001177355.3) preceded by its signal peptide was synthesized and inserted into *Nhe* I and *Not* I restriction sites of pcDNA-3.1 by Genecust (Boynes, France). The MPF constructs ending in a FLAG epitope or the ZIKV residues M-31/41 were synthesized and inserted into *Nhe* I and *Not* I restriction sites of pcDNA-3.1 by Genecust (Boynes, France). The production of endotoxin-free plasmids, the quantification of plasmid DNA, and the sequencing of plasmids were performed by Genecust (Boynes, France). Cells were transfected with GFP or MPF constructs using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions.

#### 4.3. Flow Cytometry Analysis

Huh7 cells ( $1.5 \times 10^5$ ), HEK-293T cells ( $1 \times 10^5$ ) or A549 cells ( $1 \times 10^5$ ) were fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS) for 10 min and then observed for GFP expression. For the detection of FLAG epitope, cells were stained with anti-FLAG antibody (dilution 1:2000) for 1 h at room temperature. Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG antibody was used as a secondary antibody. For each assay,  $10^4$  cells were analyzed by flow cytometry (CytoFLEX, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) using CytExpert software (version 2.1.0.92, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

#### 4.4. Lactate Dehydrogenase Assay

Huh7 cells were seeded in a 12-well culture plate at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells per well. Cell damage was evaluated on supernatants of transfected-cells measuring lactate dehydrogenase (LDH) release using Cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay (Promega, Charbonnières-les-bains, France) according to manufacturer's instructions. Absorbance of converted dye was measured at 490 nm with a background subtraction at 690 nm using a microplate reader Tecan (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland).

#### 4.5. MTT Assay

Huh7 cells ( $2 \times 10^4$ ), A549 cells ( $2 \times 10^4$ ) or HEK-293T cells ( $2 \times 10^4$ ) were cultured in a 96-well culture plate. Cell monolayers were rinsed with PBS 1× and incubated with culture growth medium mixed with  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution for 1 h at 37 °C. MTT medium was removed and the formazan crystals were solubilized with dimethyl sulfoxide (DMSO). Absorbance was measured at 570 nm with a background subtraction at 690 nm.

#### 4.6. Caspase 3/7 Enzymatic Activity

Huh7 ( $2 \times 10^4$ ) or A549 ( $2 \times 10^4$ ) cells were seeded in a 96-well culture plate. Caspase 3/7 enzymatic activity in raw cell lysates was measured using a Caspase Glo 3/7 assay kit (Promega) according to the

manufacturer's protocol. Caspase activity was quantified by luminescence using a FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France).

#### 4.7. Early Apoptosis Analysis

A549 cells were seeded in a 12-well culture plate at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well. Cells were fixed with 3.7% PFA in PBS for 10 min and stained with the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphatidylserine-binding protein FITC-labelled Annexin V (BioLegend, San Diego, CA, USA). For each assay,  $10^4$  stained cells were analyzed by flow cytometry (CytotFLEX, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) using CytExpert software (version 2.1.0.92, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

#### 4.8. Statistical Analysis

Statistical analysis for comparison studies was performed using GraphPad Prism software (version 9, GraphPad software, San Diego, CA, USA). Values of independent experiments were analyzed by one-way ANOVA using Dunnett's multiple comparisons test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9578/s1>, Figure S1: Expression of sGFP constructs in transfected Huh7 cells. Figure S2: Expression of MPF-FLAG construct in A549 cells; Figure S3: Caspase-3/7 enzymatic activity in A549 cells expressing MPF-mutZAMP mutant.

**Author Contributions:** Conceptualization: B.V. and P.D.; methodology: B.V., J.G.H., G.G. and P.D.; formal investigation: B.V. and P.D.; investigation: B.V., J.G.H., R.A., J.D.; resources: P.D.; data curation: B.V., G.G., P.D.; writing—original draft preparation: B.V. and P.D. writing—review and editing: B.V., G.G., J.G.H. and P.D.; visualization: B.V. and P.D.; supervision: P.D.; project administration: P.D.; funding acquisition: P.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from POE FEDER 2014-20 of the Conseil Général de La Réunion (ZIKAlert program, N° SYNERGIE: RE00001902) and Research Federation BioST (ARBOPATHOZE program), University of La Reunion. B.V. and J.G.H. received funding from ZIKAlert program. J.D. received funding by the French Ministry MESRI.

**Acknowledgments:** J.D. has a PhD degree scholarship from La Reunion island University (Ecole Doctorale STS). R.A. is a graduate Master 2 student in Biology Health, La Reunion island University.

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

#### Abbreviations

ApoptoM	Dengue M apoptotic oligopeptide
C	Capsid protein
CNS	Central nervous system
DENV	Dengue virus
DENV-2	Dengue virus type 2
DMSO	Dimethyl sulfoxide
E	Envelope protein
ectoM	M ectodomain
ER	Endoplasmic reticulum
FBS	Fetal bovine serum
GFP	Green fluorescent protein
LDH	Lactate dehydrogenase
M	Membrane protein
MEM	Minimum Essential Media
MFI	Mean fluorescence intensity
MPF	Megakaryocyte-potentiating factor
MSLN	Mesothelin
NS	Nonstructural protein
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
prM	Intracellular precursor of membrane protein

PS	Phosphatidylserine
sGFP	Soluble green fluorescent protein
SP	Signal peptide
SPHK2	Sphingosine kinase 2
TAA	Tumor-associated antigen
WNV	West Nile virus
YFV	Yellow Fever virus
ZAMP	Zika Apoptosis M Peptide
ZIKV	Zika virus

## References

1. Solomon, I.H.; Milner, D.A.; Folkerth, R.D. Neuropathology of Zika Virus Infection. *J. Neuroinfect. Dis.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
2. Cao-Lormeau, V.M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastere, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [[CrossRef](#)]
3. Rubin, E.J.; Greene, M.F.; Baden, L.R. Zika Virus and Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 984–985. [[CrossRef](#)]
4. 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**, *6*, e1477. [[CrossRef](#)]
5. Pan, P.; Zhang, Q.; Liu, W.; Wang, W.; Lao, Z.; Zhang, W.; Shen, M.; Wan, P.; Xiao, F.; Liu, F.; et al. Dengue Virus M Protein Promotes NLRP3 Inflammasome Activation To Induce Vascular Leakage in Mice. *J. Virol.* **2019**, *93*. [[CrossRef](#)]
6. Catteau, A.; Kalinina, O.; Wagner, M.C.; Deubel, V.; Courageot, M.P.; Despres, P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84 Pt 10*, 2781–2793. [[CrossRef](#)]
7. Catteau, A.; Roue, G.; Yuste, V.J.; Susin, S.A.; Despres, P. Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation. *Biochimie* **2003**, *85*, 789–793. [[CrossRef](#)]
8. Chang, K.; Pastan, I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 136–140. [[CrossRef](#)]
9. Morello, A.; Sadelain, M.; Adusumilli, P.S. Mesothelin-Targeted CARs: Driving T Cells to Solid Tumors. *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 133–146. [[CrossRef](#)]
10. Ho, M.; Bera, T.K.; Willingham, M.C.; Onda, M.; Hassan, R.; FitzGerald, D.; Pastan, I. Mesothelin expression in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1571–1575. [[CrossRef](#)]
11. Chong, H.Y.; Leow, C.Y.; Abdul Majeed, A.B.; Leow, C.H. Flavivirus infection-A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus Res.* **2019**, *274*, 197770. [[CrossRef](#)]
12. Pryor, M.J.; Azzola, L.; Wright, P.J.; Davidson, A.D. Histidine 39 in the dengue virus type 2 M protein has an important role in virus assembly. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85 Pt 12*, 3627–3636. [[CrossRef](#)]
13. Yoshii, K.; Igarashi, M.; Ichii, O.; Yokozawa, K.; Ito, K.; Kariwa, H.; Takashima, I. A conserved region in the prM protein is a critical determinant in the assembly of flavivirus particles. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93 Pt 1*, 27–38. [[CrossRef](#)]
14. Hsieh, S.C.; Wu, Y.C.; Zou, G.; Nerurkar, V.R.; Shi, P.Y.; Wang, W.K. Highly conserved residues in the helical domain of dengue virus type 1 precursor membrane protein are involved in assembly, precursor membrane (prM) protein cleavage, and entry. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 33149–33160. [[CrossRef](#)]
15. Peng, J.G.; Wu, S.C. Glutamic acid at residue 125 of the prM helix domain interacts with positively charged amino acids in E protein domain II for Japanese encephalitis virus-like-particle production. *J. Virol.* **2014**, *88*, 8386–8396. [[CrossRef](#)]
16. Brown, E.; Brown, E.; Bentham, M.; Beaumont, H.; Bloy, A.; Thompson, R.; McKimmie, C.; Foster, R.; Ranson, N.; Macdonald, A.; et al. Flavivirus membrane (M) proteins as potential ion channel antiviral. *Microbiology* **2019**, *1*. [[CrossRef](#)]

17. Brabant, M.; Baux, L.; Casimir, R.; Briand, J.P.; Chaloin, O.; Porceddu, M.; Buron, N.; Chauvier, D.; Lassalle, M.; Lecoeur, H.; et al. A flavivirus protein M-derived peptide directly permeabilizes mitochondrial membranes, triggers cell death and reduces human tumor growth in nude mice. *Apoptosis* **2009**, *14*, 1190–1203. [[CrossRef](#)]
18. Souza, B.S.; Sampaio, G.L.; Pereira, C.S.; Campos, G.S.; Sardi, S.I.; Freitas, L.A.; Figueira, C.P.; Paredes, B.D.; Nonaka, C.K.; Azevedo, C.M.; et al. Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39775. [[CrossRef](#)]
19. 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*, 672. [[CrossRef](#)]
20. Li, G.; Poulsen, M.; Yashiroda, Y.; Fenyvuesvolgyi, C.; Yashiroda, Y.; Yoshida, M.; Simard, J.M.; Gallo, R.C.; Zhao, R.Y. Characterization of cytopathic factors through genome-wide analysis of the Zika viral proteins in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E376–E385. [[CrossRef](#)]
21. Rosa-Fernandes, L.; Cugola, F.R.; Russo, F.B.; Kawahara, R.; de Melo Freire, C.C.; Leite, P.E.C.; Bassi Stern, A.C.; Angeli, C.B.; de Oliveira, D.B.L.; Melo, S.R.; et al. Zika Virus Impairs Neurogenesis and Synaptogenesis Pathways in Human Neural Stem Cells and Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 64. [[CrossRef](#)]
22. 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](#)]
23. de Wispelaere, M.; Khou, C.; Frenkiel, M.P.; Despres, P.; Pardigon, N. A Single Amino Acid Substitution in the M Protein Attenuates Japanese Encephalitis Virus in Mammalian Hosts. *J. Virol.* **2015**, *90*, 2676–2689. [[CrossRef](#)]
24. Frumence, E.; Viranaicken, W.; Bos, S.; Alvarez-Martinez, M.T.; Roche, M.; Arnaud, J.D.; Gadea, G.; Despres, P. A Chimeric Zika Virus between Viral Strains MR766 and BeH819015 Highlights a Role for E-glycan Loop in Antibody-mediated Virus Neutralization. *Vaccines* **2019**, *7*, 55. [[CrossRef](#)]
25. Parquet, M.C.; Kumatori, A.; Hasebe, F.; Morita, K.; Igarashi, A. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Lett.* **2001**, *500*, 17–24. [[CrossRef](#)]
26. Parquet, M.C.; Kumatori, A.; Hasebe, F.; Mathenge, E.G.; Morita, K. St. Louis encephalitis virus induced pathology in cultured cells. *Arch. Virol.* **2002**, *147*, 1105–1119. [[CrossRef](#)]
27. 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**, *14*, e1007299. [[CrossRef](#)]
28. Morchang, A.; Lee, R.C.H.; Yenchitsomanus, P.T.; Sreekanth, G.P.; Noisakran, S.; Chu, J.J.H.; Limjindaporn, T. RNAi screen reveals a role of SPHK2 in dengue virus-mediated apoptosis in hepatic cell lines. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188121. [[CrossRef](#)]
29. Lane, D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **1992**, *358*, 15–16. [[CrossRef](#)]
30. Levine, A.J.; Oren, M. The first 30 years of p53: Growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 749–758. [[CrossRef](#)]
31. Lu, W.; Cheng, F.; Yan, W.; Li, X.; Yao, X.; Song, W.; Liu, M.; Shen, X.; Jiang, H.; Chen, J.; et al. Selective targeting p53(WT) lung cancer cells harboring homozygous p53 Arg72 by an inhibitor of CypA. *Oncogene* **2017**, *36*, 4719–4731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bressac, B.; Galvin, K.M.; Liang, T.J.; Isselbacher, K.J.; Wands, J.R.; Ozturk, M. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1973–1977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chen, Y.T.; Old, L.J. Cancer-testis antigens: Targets for cancer immunotherapy. *Cancer J. Sci. Am.* **1999**, *5*, 16–17. [[PubMed](#)]
34. Ribas, A.; Weber, J.S.; Chmielowski, B.; Comin-Anduix, B.; Lu, D.; Douek, M.; Ragavendra, N.; Raman, S.; Seja, E.; Rosario, D.; et al. Intra-lymph node prime-boost vaccination against Melan A and tyrosinase for the treatment of metastatic melanoma: Results of a phase 1 clinical trial. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2987–2996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. van Meerten, T.; Hagenbeek, A. CD20-targeted therapy: The next generation of antibodies. *Semin. Hematol.* **2010**, *47*, 199–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Dermime, S.; Gilham, D.E.; Shaw, D.M.; Davidson, E.J.; Meziane, E.-K.; Armstrong, A.; Hawkins, R.E.; Stern, P.L. Vaccine and antibody-directed T cell tumour immunotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1704*, 11–35. [[CrossRef](#)]

37. Elkord, E.; Burt, D.J.; Drijfhout, J.W.; Hawkins, R.E.; Stern, P.L. CD4+ T-cell recognition of human 5T4 oncofoetal antigen: Implications for initial depletion of CD25+ T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *57*, 833–847. [[CrossRef](#)]
38. Zhu, Z.; Gorman, M.J.; McKenzie, L.D.; Chai, J.N.; Hubert, C.G.; Prager, B.C.; Fernandez, E.; Richner, J.M.; Zhang, R.; Shan, C.; et al. Correction: Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 3145. [[CrossRef](#)]
39. Kaid, C.; Goulart, E.; Caires-Junior, L.C.; Araujo, B.H.S.; Soares-Schanoski, A.; Bueno, H.M.S.; Telles-Silva, K.A.; Astray, R.M.; Assoni, A.F.; Junior, A.F.R.; et al. Zika Virus Selectively Kills Aggressive Human Embryonal CNS Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 3363–3374. [[CrossRef](#)]
40. Chen, Q.; Wu, J.; Ye, Q.; Ma, F.; Zhu, Q.; Wu, Y.; Shan, C.; Xie, X.; Li, D.; Zhan, X.; et al. Erratum for Chen et al., "Treatment of Human Glioblastoma with a Live Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate". *mBio* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]

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



© 2020 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/>).

#### II.4. Discussion de l'article 2

Chez les flavivirus, l'apoptose joue un rôle majeur dans la pathogenèse de l'infection virale (Okamoto et al. 2017, Pan et al. 2021). ZIKV est capable de déclencher la mort cellulaire apoptotique *in vitro* et *in vivo*, en utilisant diverses stratégies pour activer, ralentir ou inhiber l'apoptose cellulaire (Li et al. 2016, Souza et al. 2016). Lors de ces processus, les protéines structurales prM et E ont été associées à l'apoptose médiée par ZIKV (Liu et al. 2018, Pan et al. 2021). Dans cette étude, nous cherchons à savoir si les résidus M-31/41 de la souche épidémique de ZIKV BeH819015 seraient capables de déclencher l'apoptose dans les cellules humaines comme cela avait été précédemment observé par Catteau et ses collègues pour les flavivirus DENV-2 et YFV (Catteau, Kalinina, et al. 2003).

Nous avons démontré que les résidus M-31/41 de la souche asiatique BeH819015 de ZIKV ont la capacité d'induire l'apoptose dans les cellules d'hépatome et d'adénocarcinome pulmonaire humain par activation des caspases 3 et 7. Afin d'évaluer la contribution des différents résidus d'acides aminés constituant l'oligopeptide ZAMP dans cette activité pro-apoptotique, nous avons effectué une analyse de séquence des oligopeptides M-31/41 appartenant aux trois flavivirus ZIKV, DENV-2 et YFV. Nous avons observé que la séquence de ZAMP partage au moins 60 % de son identité avec son homologue de DENV-2 mais moins de 30 % avec l'oligopeptide M-31/41 de YFV. Malgré ces différences de séquence nucléotidique, l'activité pro-apoptotique des oligopeptides M-31/41 des trois flavivirus semble conservée. Cette observation suggère un rôle clé pour les résidus d'acides aminés que ZIKV, DENV-2 et YFV pourraient avoir en commun dans l'activité pro-apoptotique de l'oligopeptide M-31/41. Les résidus M-33/35/38 sont hautement conservés chez les flavivirus et semblent être identiques au sein des protéines M de ZIKV, DENV-2 et YFV (Hsieh et al. 2011). En particulier, le résidu tryptophane en position M-35 est strictement conservé dans les séquences M des flavivirus, suggérant un rôle important pour cet acide aminé dans l'apoptose médiée par l'ectodomaine M (Hsieh et al. 2011). Nous avons identifié les résidus M-33/35/38 comme jouant un rôle clé dans l'activité pro-apoptotique de l'oligopeptide ZAMP. L'introduction de résidus Ala aux trois positions M-33/35/38 a considérablement réduit la capacité de ZAMP à déclencher l'apoptose, mettant en évidence un rôle important de ces résidus dans l'activité pro-apoptotique associée aux acides aminés C-terminaux de l'ectodomaine M de ZIKV.

Nos résultats révèlent que l'apoptose médiée par ZAMP semble nécessiter la translocation de l'oligopeptide M-31/41 dans le réticulum endoplasmique (RE) et son transport dans les voies de sécrétion cellulaire. Les flavivirus utilisent diverses stratégies pour activer ou inhiber l'apoptose en modifiant l'équilibre existant entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques dans divers compartiments cellulaires. À titre d'exemple, l'infection par les flavivirus peut induire l'apoptose par une augmentation de la transcription du facteur pro-apoptotique Bax (del Carmen Parquet et al. 2001) et/ou une dérégulation des facteurs anti-apoptotiques BCL-2, BCL-XL et MCL-1, entraînant l'activation des caspases effectrices de l'apoptose (Suzuki et al. 2018). Au sein du RE, les flavivirus interagissent également avec diverses protéines de l'hôte et exploitent leurs fonctions pour contrôler la progression du cycle viral. Il a été démontré que dans le RE, l'interaction entre la sphingosine kinase 2 (SPHK2) et DENV peut entraîner l'apoptose dans les cellules d'hépatome humain (Morchang et al. 2017). SPHK2 catalyse la phosphorylation de la sphingosine en sphingosine 1-phosphate, ce qui entraîne la production de céramides pro-apoptotiques. Il serait intéressant d'explorer, dans de futures études, la relation qui pourrait exister entre les propriétés pro-apoptotique de SPHK2 et l'apoptose induite par l'oligopeptide ZAMP.

Récemment, ZIKV a suscité une attention particulière dans le domaine de la virothérapie oncolytique. En raison de son neurotropisme et de son efficacité contre le glioblastome multiforme et les formes métastatiques agressives de tumeurs humaines du système nerveux central (Zhu et al. 2017, Kaid et al. 2018, Chen et al. 2019), ZIKV est considéré comme un virus oncolytique potentiel, pour la thérapie du cancer du cerveau (Su & Balasubramaniam 2019). Nous nous sommes alors demandé si l'association de l'oligopeptide ZAMP à un antigène associé aux tumeurs humaines pourrait déclencher une apoptose dans différents types de cellules tumorales. L'oligopeptide ZAMP a par conséquent été couplé à l'extrémité C-terminale d'un antigène associé aux tumeurs, le facteur de potentialisation des mégacaryocytes (MPF). Le MPF est un produit de clivage de la mésothéline (MSLN) (Morello et al. 2016), un antigène associé aux tumeurs qui est surexprimé à la surface de nombreuses cellules tumorales humaines (Chang & Pastan 1996). Le clivage de cette protéine précurseur va engendrer la production du MPF, qui sous sa forme soluble est libéré dans la circulation et sert de biomarqueur pour le pronostic du cancer.

Nous avons démontré que l'association de ZAMP au MPF peut déclencher l'apoptose dans les cellules d'hépatome et d'adénocarcinome pulmonaire. Dans les cellules A549 et Huh7, l'expression de ZAMP couplé au MPF est associée à un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à une activation de l'apoptose médiée par les caspases 3 et 7. Il est intéressant de noter que l'oligopeptide ZAMP associé au MPF est capable d'induire l'apoptose d'une part dans les cellules A549 qui possède une protéine p53 fonctionnelle (Lu et al. 2017) et d'autre part dans les cellules Huh7 qui sont déficientes en p53 (Bressac et al. 1990). La protéine P53 est un facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans les voies de signalisation de l'apoptose (Levine & Oren 2009). Il semblerait donc que les voies de signalisation dépendantes de la protéine p53 ne jouent pas un rôle majeur dans l'apoptose médiée par l'oligopeptide ZAMP.

Les cellules HEK-293T semblent quant à elles résistantes aux effets apoptotiques médiés par ZAMP couplé au MPF. En accord avec cette observation, Catteau et ses collègues, avaient historiquement démontré une absence d'apoptose suite à l'expression de l'ectodomaine de la protéine M de DENV-2 dans ce même modèle cellulaire (Catteau, Kalinina, et al. 2003). En effet les cellules HEK-293T sont des cellules de rein embryonnaire humain immortalisées par l'expression des gènes E1A et E1B de l'Adénovirus 5. L'oncogène viral E1B code pour deux protéines, E1B-55K et E1B-19K un homologue fonctionnel du facteur anti-apoptotique Bcl-2 qui inhibe l'apoptose (Louis et al. 1997, White 2001). Il serait alors intéressant par la suite d'étudier l'impact que pourrait avoir l'expression de Bcl-2 sur l'apoptose induite par l'oligopeptide ZAMP.

Pour conclure, la faculté de l'oligopeptide ZAMP à conférer une capacité pro-apoptotique au MPF, un antigène associé aux tumeurs humaines, pourrait ouvrir de nombreuses perspectives pour un tel oligopeptide en tant qu'agent anticancéreux innovant. L'oligopeptide ZAMP pourrait alors faire l'objet d'une stratégie de thérapie du cancer par la mort des cellules tumorales et la reconnaissance immunitaire de l'antigène associé aux tumeurs par les cellules présentatrices d'antigènes.

### **III. Impact de la mutation M-I36V sur le comportement biologique des protéines prM/M et E de DENV-2 Cosmopolitan**

#### **III.1. Contexte de l'étude**

Chez les flavivirus, la protéine prM/M a été décrite comme jouant un rôle majeur dans de multiple processus lors de l'infection (Konishi & Mason 1993). Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas tous bien caractérisés, on sait que la protéine prM/M par son interaction avec la protéine E, assure l'assemblage et la maturation des particules virales. L'assemblage des flavivirus débutant notamment par l'association hétérodimérique des protéines prM et E (Konishi & Mason 1993, Lorenz et al. 2002).

Dans la topologie de l'hétérodimère prME de DENV, l'ectodomaine de la protéine M apparaît comme étant adjacent au domaine EDII de la protéine E et semble jouer un rôle majeur dans l'interaction des protéines M et E (Peng & Wu 2014). L'ectodomaine de la protéine M semble également être le support de déterminants viraux associés à la pathogénicité de DENV. En effet, l'ectodomaine M contient une séquence pro-apoptotique, composée des résidus M-31/41, qui a été identifiée chez plusieurs flavivirus d'intérêt en santé publique dont DENV (Catteau, Kalinina, et al. 2003). Au sein de cet oligopeptide l'acide aminé en position M-36 a été identifié comme jouant un rôle important dans plusieurs aspects du cycle de réplication virale. La mutation du résidu M-36 affectant l'assemblage et/ou la libération des particules virales tout en modulant la pathogénicité des flavivirus (Hsieh et al. 2011, de Wispelaere et al. 2015, Basset et al. 2020).

Dans la région du sud-ouest de l'océan Indien (SOOI), la dengue est récemment devenue un problème majeur de santé publique avec l'émergence de souches du sérotype DENV-2 appartenant au génotype Cosmopolitan, ayant causé des épidémies à Dar-es-Salaam en 2014 (DES-14) et à La Réunion en 2018 (RUN-18). L'analyse moléculaire des souches épidémiques, DES-14 et RUN-18, a curieusement mis en évidence une potentielle substitution Val en Ile à la position M-36 de la protéine M. Parmi les souches de DENV-2 connues, le résidu Ile est le plus fréquemment observé en position M-36 tandis que le résidu Val est retrouvé dans moins d'un quart des souches virales séquencées. Cette constatation nous a incité à évaluer l'impact d'une substitution d'un acide aminé Ile en Val à la position M-36 sur le comportement biologique des protéines prM/M et E de DENV-2 (Annexe 1 et Annexe 2).

### III.2. Résumé de l'étude

Dans la présente étude, nous avons évalué l'impact de la substitution de l'acide aminé Ile en Val à la position M-36 sur les interactions hétérodimériques entre les glycoprotéines RUN-18 prM/M et E et l'apoptose médiée par le peptide D<sub>2</sub>AMP (M-31/41 de DENV-2) de RUN-18 dans les cellules épithéliales humaines A549. En utilisant les protéines recombinantes prM/M et E de la souche DENV-2 RUN-18, nous avons démontré que la substitution Ile en Val affecte l'expression et la cytotoxicité de la glycoprotéine E exprimée comme un complexe prME et la capacité de l'oligopeptide D<sub>2</sub>AMP à activer la voie apoptotique. Nos données ont mis en évidence un rôle important de la nature du résidu M-36 sur le comportement biologique des protéines prM/M et E de DENV-2 du génotype Cosmopolitan retrouvées dans la région SOOI.

*> Les résultats de cette étude seront présentés et discutés plus en détail dans la section « III.4. Discussion de l'article 3 », page 176.*

### III.3. Article 3: Dengue virus M and E proteins belonging to genotype II (Cosmopolitan) of serotype 2 are influenced by the nature of M residue 36

JOURNAL OF  
GENERAL VIROLOGY

RESEARCH ARTICLE

Decotter et al., *Journal of General Virology* 2023;104:001872  
DOI 10.1099/jgv.0.001872



OPEN  
ACCESS

## Dengue virus M and E proteins belonging to genotype II (Cosmopolitan) of serotype 2 are influenced by the nature of M residue 36

Jason Decotter, Philippe Desprès\* and Gilles Gadea†

### Abstract

Mosquito-borne dengue disease is caused by the dengue virus serotype-1 to serotype-4. The contemporary dengue outbreaks in the southwestern Indian ocean coincided with the widespread of dengue virus serotype 2 genotype II (Cosmopolitan), including epidemic viral strains DES-14 and RUN-18 isolated in Dar es Salaam (Tanzania) in 2014 and La Reunion Island (France) in 2018, respectively. Heterodimeric interaction between prM (intracellular precursor of surface structural M protein) and envelope E proteins is required during the initial stage of dengue virus assembly. Amino acid 127 of DES-14 prM protein (equivalent to M36) has been identified as an infrequent valine whereas RUN-18 has a common isoleucine. In the present study, we examined the effect of M-I36V mutation on the expression of a recombinant RUN-18 E protein co-expressed with prM in human epithelial A549 cells. The M ectodomain of dengue virus serotype 2 embeds a pro-apoptotic peptide referred as D<sub>2</sub>AMP. The impact of M-I36V mutation on the death-promoting capability of D<sub>2</sub>AMP was assessed in A549 cells. We showed that valine at position M36 affects expression of recombinant RUN-18 E protein and potentiates apoptosis-inducing activity of D<sub>2</sub>AMP. We propose that the nature of M residue 36 influences the virological characteristics of dengue 2 M and E proteins belonging to genotype II that contributes to global dengue burden.

### INTRODUCTION

Dengue is a mosquito-borne viral disease of major public health problem worldwide, primarily in tropical and subtropical regions [1, 2]. Dengue disease is caused by dengue virus (DENV), a mosquito-borne RNA virus belonging to the *Flavivirus* genus (*Flaviviridae* family) which includes other medically-important arthropod-borne viruses such as Japanese encephalitis virus (JEV), tick-borne encephalitis virus (TBEV), West Nile virus (WNV), yellow fever virus (YFV), and Zika virus (ZIKV). DENV is categorized into four serotypes DENV-1 to DENV-4. Infection can occur with one or more of the four serotypes. Infection with one serotype provides lifelong homotypic immunity to that particular serotype but does not confer long-term protection against infection by other serotypes. DENV infection can result in a wide range of clinical manifestations, from flu-like disease (dengue fever) to severe illness (severe dengue), a potentially lethal disease [3, 4].

DENV contains a positive-sense single-stranded RNA encoding a single large polyprotein precursor that is co- and post-translationally processed by host and viral protease into three structural proteins which are the capsid protein (C), the precursor membrane protein (prM) and the envelope protein (E), followed by seven nonstructural proteins [5]. DENV E glycoprotein (495 amino-acid residues) is involved in virus attachment to host-cell, in internalization of virus particles, and then in the fusion between viral and cellular membranes releasing genomic RNA into the cytosol. The ectodomain of DENV E protein is organized into three structurally envelope domains EDI, EDII, and EDIII [6]. The EDII contains the viral fusion peptide (residues E98-112)

Received 11 March 2023; Accepted 24 June 2023; Published 12 July 2023

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de La Réunion, INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme Technologique CYROI, 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

\***Correspondence:** Philippe Desprès, philippe.despres@univ-reunion.fr

**Keywords:** arbovirus; flavivirus; dengue 2 virus; genotype II; M protein; E protein; apoptotic viral peptide.

**Abbreviations:** ApoptoM, dengue M apoptotic oligopeptide; CLS, crown-like structure; CNX, calnexin protein; ER, endoplasmic reticulum; FACS, fluorescence-activated cell sorting; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescent protein; IF, immunofluorescence; LDH, lactate dehydrogenase; mAb, monoclonal antibody; MFI, mean fluorescence intensity; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; SP, signal peptide; SWIO, South West Indian Ocean; TMD, transmembrane domain.

†**Present address:** MetaSarc team Inserm U1194, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), F-34298 Montpellier, France.

Three supplementary figures and two supplementary tables are available with the online version of this article.

001872 © 2023 The Authors



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

whereas EDIII may play a key role in virus binding to the host-cell receptor [7, 8]. DENV prM glycoprotein (166 amino-acid residues) consists of 'pr' peptide (residues prM1-91) followed by the surface structural M protein (residues prM92-166) [9]. The initial step of virus assembly involves heterodimeric interactions between prM and E proteins, prM playing the role of chaperone for E to prevent a premature fusion of immature virus particles during their transport through the secretory pathway [10, 11]. The heterodimeric interactions between prM and E proteins are important for the proper folding of E [12, 13]. The processing of prM occurs in the trans-Golgi apparatus by cellular furin/furin-like protease family that cleaves the 'pr' peptide from the surface membrane M protein [14]. In the topology of prM-E heterodimer, the M protein appears to be adjacent to EDII [11, 15]. The M protein consists of an N-terminal ectodomain (referred hereafter as ectoM) which is formed of a flexible hydrophobic loop followed by an amphipathic peri-membrane  $\alpha$ -helix and ended by a C-terminal transmembrane region [11]. It has been reported that DENV-2 ectoM conjugated to a reporter protein such as GFP can trigger apoptosis [16]. The apoptosis-inducing activity of ectoM requires caspase-3 activation and its transport in the secretory pathway is a pre-requisite for initiation of apoptosis [16, 17]. The death-promoting capability of DENV-2 M protein has been restricted to an oligopeptide representing the C-terminal amino-acids of M ectodomain [16]. Amino acid 36 of the M protein (equivalent to prM127) has been identified as playing an important role in several aspects of virus replication cycle [18–20]. Indeed, M36 mutations may have an effect on virus assembly and/or egress and thus, modulate the pathogenicity of flaviviruses [18, 19].

Dengue outbreaks in the tropics are mostly associated with DENV-2 and increasing geographic distribution of genotype II (or Cosmopolitan genotype) contributes to the global dengue burden [21]. Genotype II of DENV-2 is circulating in Africa, Asia, the Middle East, the Pacific Islands and now South America [22]. Over the last decade, southwestern Indian ocean countries have been facing to the emergence of DENV-2 genotype II [23–25]. In 2018–19, Reunion Island experienced a dengue epidemic with nearly 25000 cases reported out of a population of 875000 inhabitants [26–28]. DENV-2 strains isolated from dengue patients in 2018 were sequenced and phylogenetic analysis reported that all DENV-2 clinical isolates belong to the genotype II, Cosmopolitan 1 (C1-B) lineage, including the prototypical RUJUL strain (RUN-18, Genbank accession number MN272404.1) [23, 24]. In the southwestern Indian ocean region, other epidemic DENV-2 strains of Cosmopolitan lineage were also sequenced. The dengue outbreak that occurred in Dar es Salaam (Tanzania) in 2014 was associated with DENV-2 genotype II, Cosmopolitan 2 lineage. During the epidemic, the DENV-2 strain D2\_K2\_RJ\_059/Dar es Salaam 2014 (DES-14, GenBank accession number MG189962.1) was isolated from a patient with dengue fever [25]. Comparative sequence analysis between the M proteins of DENV-2 strains RUN-18 and DES-14 identified an infrequent valine at residue 36 of DES-14 whereas RUN-18 has a common isoleucine. It is suspected that M residue 36 might have an impact on the biological properties of DENV-2 envelope proteins. In the present study, the effects of Ile-to-Val mutation at position M36 on the expression of the E protein and death-promoting capability of M peptide were assessed on recombinant viral proteins derived from DENV-2 strain RUN-18.

## METHODS

### Cell culture, antibodies and reagents

For cell culture, human lung carcinoma epithelial A549 cells (ATCC, CCL-185) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Dutscher, Brumath, France), 2 mmol. L<sup>-1</sup> of L-Glutamine, 1 mmol.L<sup>-1</sup> of sodium pyruvate, 100 U.mL<sup>-1</sup> of penicillin, 0.1 mg.mL<sup>-1</sup> of streptomycin and 0.5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> of fungizone (Amphotericin B) (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The mouse anti-pan flavivirus envelope E glycoprotein domain II (EDII) monoclonal antibody (mAb) 4G2, purchased from RD Biotech (Besançon, France), and the mouse anti-DENV envelope E glycoprotein domain III (EDIII) mAb 4E11, a kind gift of Pasteur Institute (Paris, France), were used for immunodetection of the viral envelope E protein. Mouse anti-6x(His) mAb was purchased from Abcam (Cambridge, UK), to detect NS1 protein expression. Rabbit anti-calnexin antibody was purchased from Santa-Cruz Biotechnology (Clinisciences, Nanterre, France) and rabbit anti- $\beta$  actin antibody from ABclonal (Massachusetts, USA), to detect the ubiquitously and constitutively expressed Calnexin and  $\beta$  actin proteins respectively. Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 and donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 secondary antibodies were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Goat anti-mouse and goat anti-rabbit immunoglobulin-horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibodies were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Blue-fluorescent DNA stain 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) was used for transfection, according to the manufacturer's instructions.

### Vector plasmids expressing recombinant dengue proteins

A mammalian codon-optimized synthetic gene coding for the RUN-18 prM protein followed by the E protein (Genbank accession number MN272404.1) and preceded by the RUN-18 prM signal peptide was chemically synthesized and then inserted into *Nhe* I and *Not* I restriction sites of vector plasmid pcDNA-3.1 by Genecust (Boynes, France). Site-directed mutagenesis was performed on resulting plasmid pcDNA3/RUN-18 prME to generate mutants bearing M-(E33A, W35A, R38A), M-(I36A) or M-(I36V) mutation by Genecust (Boynes, France). A mammalian codon-optimized synthetic gene coding for the reporter gene GFP followed by the RUN-18 ectoM (ectoM<sup>RUN-18</sup>, RUN-18 residues M1/41) or D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> sequence (RUN-18 M31/41 residues)

(Genbank accession number MN272404.1) and preceded by the RUN-18 prM signal peptide was inserted into *Nhe* I and *Not* I restriction sites of vector plasmid pcDNA-3.1 by Genecust (Boynes, France). A short Gly-Ser spacer was inserted between sGFP and RUN-18 M sequences. Site-directed mutagenesis was performed on resulting plasmids pcDNA3/sGFP-ectoM<sup>RUN-18</sup> and pcDNA3/sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> to generate mutants bearing M-(E33A, W35A, R38A), M-(I36A) or M-(I36V) mutation by Genecust (Boynes, France). The production of endotoxin-free plasmids, their quantification, and the sequencing were performed by Genecust (Boynes, France). A549 cells were transiently transfected with plasmids using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions.

#### Western blot assay

Cells were seeded in 24-well plates at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells per well, then transfected with vector plasmid constructs. After 18 h of transfection, cell lysates were performed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (Sigma-Aldrich Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France) at 4 °C for 10 min. Lysates were centrifuged at 12000 g for 20 min, at 4 °C. Proteins from total cell extracts were quantified using bicinchoninic acid (BCA) reagent according to manufactured instructions (Sigma-Aldrich Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France). Protein extracts were treated with Laemmli sample buffer, either under reducing (heated at 95 °C for 5 min, in presence of dithiothreitol [DTT]) or nonreducing conditions (no heat, no DTT). Proteins were separated by in-house 12% SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose NC Protan membrane with 0.45 μm pores (Amersham, GE, Buc, France). The membranes were blocked for 20 min with 5% non-fat dry milk in PBS-Tween and incubated with anti-4G2, anti-6x(His) or anti-β actin antibodies (dilution 1:2000) for 1 h at room temperature. Anti-mouse or anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibodies were used at 1:10 000 dilution. Membranes were incubated with enhanced chemiluminescence (ECL) prime detection reagents (GE, Buc, France) and exposed using Amersham imager 680 (GE, Buc, Healthcare).

#### Flow cytometry analysis

Cells were seeded in 24-well plates at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells per well, then transfected with vector plasmid constructs. For detection of GFP expression, cells were gently harvested by trypsinization, fixed with 3.7% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min and then observed for the green fluorescent protein. For detection of the E protein, cells were permeabilized with 0.15% Triton X-100 in PBS for 5 min, then blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS, and labelled with anti-4G2 or anti-4E11 antibodies (dilution 1:2000) for 1 h at room temperature. For the detection of NS1 protein, permeabilized cells were labelled with anti-6x(His) antibody (dilution 1:2000). Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG antibody was used as a secondary antibody (1:2000) for 30 min. For each assay,  $10^4$  cells were analysed by flow cytometry using a CytoFLEX flow cytometer (Beckman, Coulter, Brea, CA, USA) using CytExpert software (version 2.1.0.92, Beckman Coulter, Villepinte, France).

#### RT-qPCR assays

Cells were seeded in 24-well plates at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells per well, then transfected with vector plasmid constructs. Quantification of prM and E RNA was performed by RT-qPCR. After 18 h of transfection, total cellular RNA was extracted from cells with RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Total cDNA was obtained by reverse transcription using random hexamers pd(N)6 and M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 42 °C for 50 min. cDNA were amplified using 0.2 μM of each primer (prM: forward primer 5'-CAACAGYGATGGCGTTC-3', reverse primer 5'-TCCARTCCCATTCAC-3'; E: forward primer 5'-GTTACACCCCACTCTGGC-3', reverse primer 5'-GAAGTCCAGGCCAGTCCG-3'), 2X Absolute Blue qPCR SYBR Green Low ROX Master Mix (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) on a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Life Science, Hercules, CA, USA). The CFX96 software (Bio-Rad) was used to evaluate the threshold cycle (Ct) for each well in the exponential phase of amplification. Results were normalized to the housekeeping gene GAPDH in each condition.

#### Immunofluorescence confocal assay

Cells were seeded in 24-well plates at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells per well, grown as a monolayer on a glass coverslip and were then transfected with vector plasmid constructs. After 18 h of transfection, cells were fixed on coverslip with 3.7% PFA in PBS for 15 min. Cells were permeabilized with 0.15% Triton X-100 in PBS for 15 min, blocked with 2% BSA in PBS, and then labelled with anti-4G2 and anti-calnexin antibodies (dilution 1:1000) for 1 h at room temperature. Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 and donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 were used as secondary antibodies (1:2000) for 30 min, and the nuclei were stained with DAPI. Then 50% glycerol in PBS was used as mounting media. Capture of the fluorescent signal was allowed with a Nikon Eclipse TI2-S-HU (confocal microscopy) coupled to the imaging software NIS-Element AR (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Line scan profiles were produced using ImageJ software.

#### LDH assay

Cells were seeded in a 96-well culture plate at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells per well. Cytotoxicity was evaluated by quantification of lactate dehydrogenase (LDH) release in culture supernatant of transfected cells using CytoTox96 nonradioactive cytotoxicity assay

(Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's instructions. The absorbance of converted dye was measured at 490 nm with background subtraction at 690 nm using a microplate reader Tecan (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland).

#### **MTT assay**

Cells were seeded in a 96-well culture plate at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells per well. Cell monolayers were rinsed with PBS and incubated with supplemented DMEM culture growth medium mixed with  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution for 1 h at 37 °C. MTT medium was removed, and the formazan crystals were solubilized with dimethyl sulfoxide (DMSO). Absorbance was measured at 570 nm with background subtraction at 690 nm, using a microplate reader Tecan (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland).

#### **Caspase 3/7 enzymatic activity**

Cells were seeded in a 96-well culture plate at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells per well. Caspase 3/7 enzymatic activity in raw cell lysates was measured using a Caspase Glo 3/7 assay kit (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Caspase activity was quantified by luminescence using a FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France).

#### **Statistical analysis**

Our results were statistically analysed using the GraphPad Prism software (version 9, GraphPad software, San Diego, CA, USA). One-way ANOVA tests were performed to compare quantitative data between the different experimental conditions, with Dunnett or Tukey correction for multiple comparisons. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant for ANOVA test. The degrees of significance are indicated in the figure, \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  or *n.s.*: not significant. All values were expressed as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments.

## **RESULTS**

### **Characterization of recombinant RUN-18 E protein co-expressed with prM**

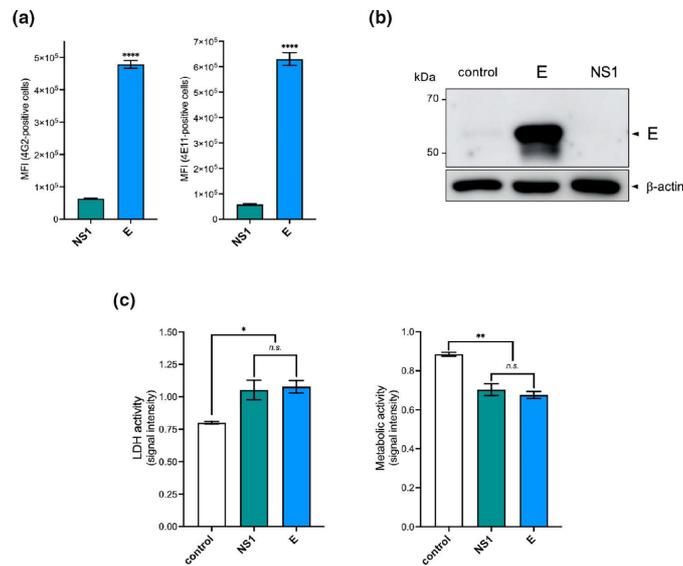
As proper folding of DENV-2 E protein involves the chaperone activity of prM [10, 11], recombinant RUN-18 E protein was co-expressed with prM as a polyprotein precursor which is then processed by cellular signal peptidase [14]. A synthetic gene encoding RUN-18 prM and E proteins with optimized codons for expression in human cells was inserted into the vector plasmid pcDNA3. In the resulting plasmid pcDNA3/RUN-18 prME, the sequence coding for prM followed by E was preceded by the authentic RUN-18 prM signal sequence. In our experiments, human epithelial A549 cell line was chosen for its high permissiveness to DENV replication, making it a suitable model for analysing the expression of recombinant prM and E proteins in human cells.

Expression of recombinant RUN-18 E protein was assessed in A549 cells transfected with pcDNA3/RUN-18 prME for 18 h. A plasmid pcDNA3/RUN-18 NS1 encoding recombinant soluble NS1 protein from RUN-18 was used as a plasmid control since protein expression results in a weak effect on cell viability [29]. Expression of recombinant RUN-18 NS1 in A549 cells transfected with pcDNA3/RUN-18 NS1 was verified by FACS analysis and immunoblot assay (Fig.S1, available in the online version of this article). The antigenic reactivity of recombinant E protein was assessed by FACS analysis using anti-DENV E monoclonal antibodies (mAbs) 4G2 and 4E11 that bind to epitopes into DENV-2 EDII and EDIII, respectively (Fig. 1a). Immunoblot assay using mAb 4G2 allowed the detection of recombinant E protein expressed in A549 cells (Fig. 1b). The cytotoxicity of recombinant RUN-18 prM-E heterodimer was evaluated by quantifying lactate dehydrogenase (LDH) or MTT activity in A549 cells transfected with pcDNA3/RUN-18 prME for 18 h (Fig. 1c). Plasmid pcDNA3/RUN-18 NS1 was used as a control. Comparable levels of LDH or MTT activity were found in A549 cells expressing recombinant RUN-18 prM and E proteins or RUN-18 NS1 protein. Thus, pcDNA3/RUN-18 prME plasmid is suitable for the production of a recombinant DENV-2 E protein belonging to southwestern Indian ocean genotype II.

### **Effect of M-I36V mutations on RUN-18 E protein co-expressed with prM**

To assess the effect of M-I36V mutation (equivalent to prM-I127V mutation), site-directed mutagenesis was performed on plasmid pcDNA3/RUN-18 prME to generate a mutant plasmid bearing a valine at position M36. A plasmid mutant with an alanine at position M36 was used as control. Amino acids 33, 35, and 38 of M protein are highly conserved among flaviviruses, with tryptophan at position M35 being invariable [20]. It has been reported that glutamic acid at position M33 is involved in prM interaction with EDII in the prME heterodimer [30]. Consequently, we generated a pcDNA3/RUN-18 prME mutant bearing the three mutations E33A, W35A, and R38A as a control.

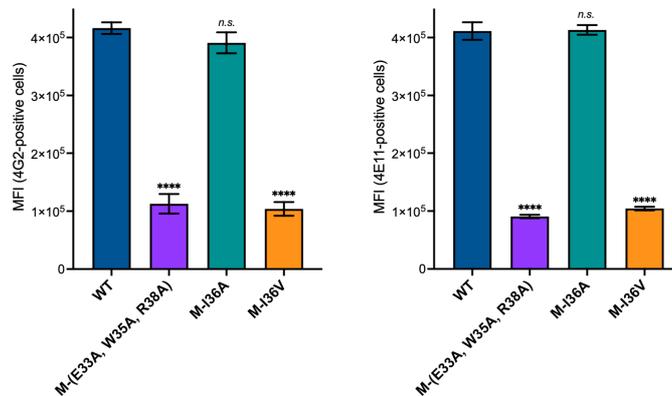
A549 cells were transfected for 18 h with pcDNA3/RUN-18 prM-E or each of the three plasmid mutants. RT-qPCR analysis on total RNA extracted from transfected cells verified that the different plasmids produced similar amounts of mRNA transcripts coding for



**Fig. 1.** Expression of recombinant RUN-18 E protein. A549 cells were transfected for 18 h with plasmid pcDNA3/RUN-18 prME expressing recombinant RUN-18 prM and E proteins or mock-transfected (control). A plasmid expressing recombinant DENV-2 RUN-18 NS1 protein served as a control. In (a), intracellular DENV-2 E protein was labelled using anti-E mAbs 4G2 and 4E11. The mean fluorescence intensity (MFI) of FITC signal in cells was examined by FACS analysis. The results are the mean ( $\pm$  SEM) of three independent assays in duplicate. Statistical analysis for E was performed and noted (\*\*\*\* $P$ <0.0001). In (b), immunoblot assays on RIPA cell lysates were performed for the detection of the E protein using anti-E mAb 4G2. Data are representative of three independent experiments.  $\beta$ -Actin served as a housekeeping protein. In (c), LDH activity (left) and MTT (right) activity were measured and O.D. values were expressed as signal intensity. The results are the mean ( $\pm$  SEM) of three independent assays with replicates. Statistical analysis for comparing control, E and NS1 was performed and noted (\*\* $P$ <0.01; \* $P$ <0.05; *n.s.*: not significant).

prM and E proteins (Fig.S2). FACS analysis was first performed on recombinant RUN-18 E protein co-expressed with prM in A549 cells using anti-E mAbs 4G2 and 4E11 (Fig. 2). There was a weak recognition of RUN-18 E protein co-expressed with prM bearing the M-(E33A, W35A, R38A) mutations compared with wild-type RUN-18 prM and E proteins. This suggests a role for M protein in the expression of RUN-18 E protein co-expressed with prM in A549 cells. As it has been observed with the M-(E33A, W35A, R38A) mutant, M-I36V mutation greatly affected the antigenic reactivity of E protein (Fig. 2). In contrast, the mutation M-I36A has no effect on the recognition of recombinant RUN-18 E protein by mAbs 4G2 and 4E11 (Fig. 2). Thus, the nature of amino acid 36 of M protein (equivalent to prM127 residue) influences the expression of RUN-18 E protein.

We next examined the impact of M residue 36 on the subcellular distribution of RUN-18 E protein. Consequently, confocal immunofluorescence (IF) microscopy using anti-E mAb 4G2 was assessed on A549 cells producing recombinant RUN-18 E protein co-expressed with prM (Fig. 3). As one major function of the endoplasmic reticulum (ER) is to serve as a site for synthesis of secreted and membrane proteins, transit of the E protein through the ER compartment was checked using ER-resident calnexin (CNX) antibody. Analysis of the ER also helps to determine proteins that successfully go through the secretory pathway. Dotted E protein-related foci which do not co-localize in the cytoplasm with CNX were detected in A549 cells suggesting a trafficking of RUN-18 E protein through the secretory pathway, with no accumulation in the ER (Fig. 3). The co-expression of E with prM mutant bearing the Ala mutations at positions M33/35/38 resulted in accumulation of E protein in the ER compartment as visualized by colocalization with CNX (Fig. 3). This accumulation is correlated with a strong decrease in dotted E protein-related foci suggesting a retention of the E protein. This ER retention seems to be associated with changes in the ER morphology, highlighted by bigger tubular and sheet-like cisternae structures. Whereas the mutation M-I36A has no obvious effect on the subcellular localization of E protein as compared with WT, the mutation M-I36V was associated with phenotypes similar to those observed with Ala mutations at positions M33/35/38 (Fig. 3). Thus, substitution of M-36I residue by a valine but not alanine may drive important changes in the processing of RUN-18 E protein co-expressed with prM in A549 cells as suggested by changes in the subcellular localization and progression through the secretory pathway.



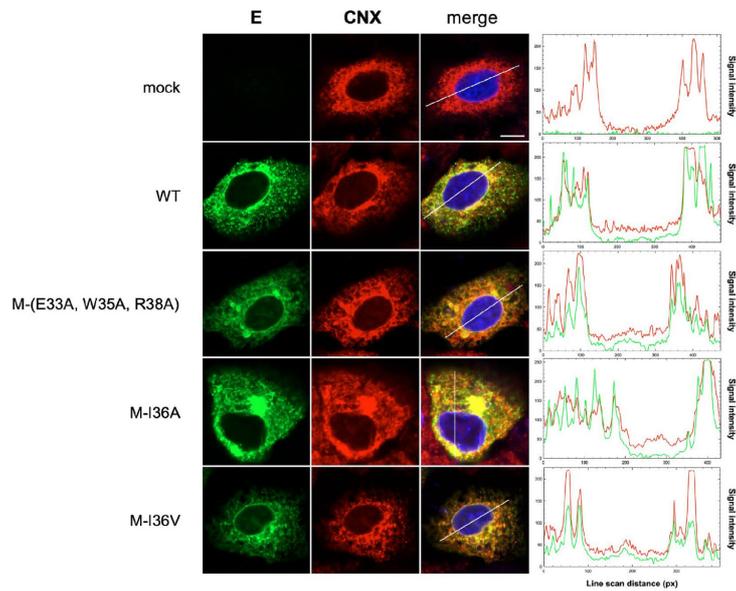
**Fig. 2.** Effects of ectoM mutations on the expression of recombinant RUN-18 E protein. A549 cells were transfected for 18 h with plasmid pcDNA3/RUN-18 prME expressing recombinant DENV-2 RUN-18 prM and E proteins (WT), plasmid pcDNA3/RUN-18 prME mutants bearing M-I36A, M-I36V, and M-(E33A, W35A, R38A) mutations. FACS analysis was performed on RUN-18 E protein using anti-DENV E mAb 4G2 (left) and 4E11 (right). MFI of intracellular E protein was determined by FACS analysis and the results are the mean ( $\pm$  SEM) of three independent assays in duplicate. Statistical analysis for comparing WT and the mutants was performed and noted (\*\*\*\* $P$ <0.0001; n.s.: not significant).

Expression of recombinant RUN-18 prM and E proteins was associated with a significant loss of cell viability at 30 h post-transfection (Fig. 4). Measuring LDH and MTT activity, we observed that M-I36V mutation and a lesser extent the M-(E33A, W35A, R38A) mutations but not M-I36A mutation prevented cytotoxic effects induced by prM and E proteins (Fig. 4a). Through the analysis of enzymatic activity of caspases-3/7, we showed that expression of recombinant RUN-18 prM and E proteins can trigger apoptosis in A549 cells at 30 h post-transfection (Fig. 4b). Consistent with the above results, the M-I36V mutation but not M-I36A mutation prevented apoptosis induced by prM and E proteins. Altogether, these results showed that M-I36V mutation alters expression of RUN-18 E protein co-expressed with prM leading to a change in protein subcellular localization associated with an absence of cytopathic effects in A549 cells. The lack of effect of the M-I36A mutation highlights that the nature of amino acid 36 of M protein might have a major impact on the expression and changes in the subcellular distribution of the E protein.

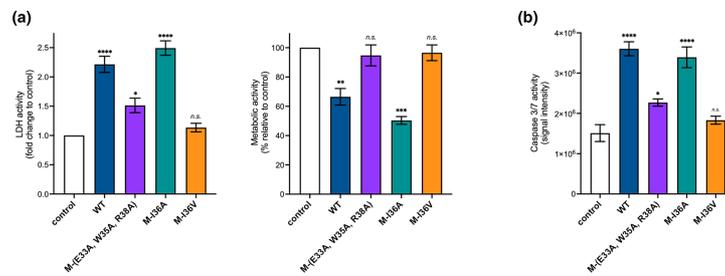
#### The M residue 36 influences the death-promoting capability of D<sub>2</sub>AMP peptide

RUN-18 and DES-14 ectoM sequences differ by a single amino-acid change at position M36 (Fig. 5a). The cluster of amino acids 31 to 41 of RUN-18 M protein (referred hereafter as D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> for Dengue 2 Apoptotic M Peptide of RUN-18) has been identified as a pro-apoptotic peptide (Fig. 5a) [31]. The distribution of D<sub>2</sub>AMP in the secretory pathway was a prerequisite for apoptosis induction [16]. To evaluate the impact of valine at position M36 on the death-promoting capability of D<sub>2</sub>AMP (Fig. 5a), we dispose of plasmid pcDNA3/sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> expressing D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> peptide positioned to the C-terminus of soluble GFP (sGFP) which is preceded by the RUN-18 prM signal peptide [31]. By directed mutagenesis, the M-I36V mutation was introduced into pcDNA3/sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> to generate pcDNA3/sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup>. As controls, alanine was introduced at positions M33, M35, and M38, or M36 of D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> (Fig. 5a). To estimate the impact of mutations on RUN-18 ectoM conformation, a three-dimensional structure of RUN-18 ectoM was performed by modelling on AlphaFold2 (Fig. 5b) and PDB (Fig. S3) prediction servers. The protein structure predictions suggest that ectoM was unchanged between RUN-18 and DES-14. Also, Ala mutations on positions M33, M35, M36, and M38 would have no effects on amphipathic peri-membrane  $\alpha$ -helix of DENV-2 ectoM.

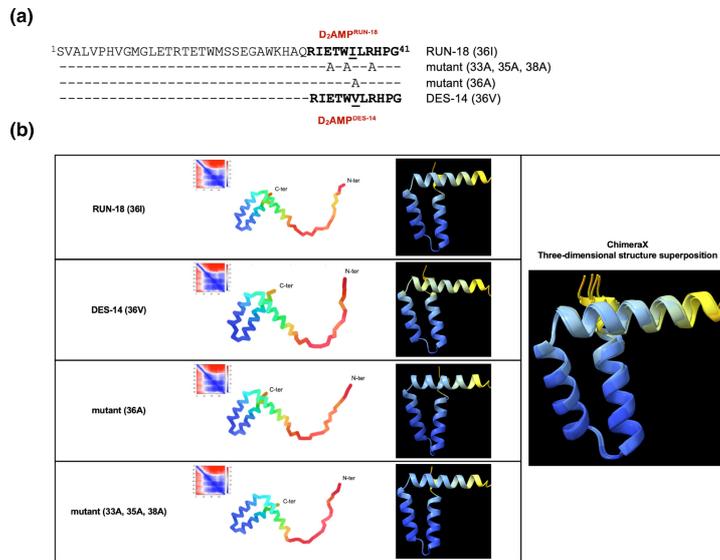
As for the prM-E complexes, sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> and sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> were expressed in A549 cells and then examined for their transit through the ER compartment. The 41 amino acid residues of ectoM fused to the C-terminus of sGFP leading to sGFP-ectoM<sup>RUN-18</sup> and sGFP-ectoM<sup>DES-14</sup> fusion proteins were used as controls, as well as sGFP lacking D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup>. Confocal IF microscopy was performed on A549 cells at 18 h post-transfection (Fig. 6). A partial co-localization of sGFP with CNX was observed confirming that soluble reporter protein was correctly processed through the ER compartment. In A549 cells transfected with plasmid expressing sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup>, large dots of GFP-containing structures co-localize with CNX and the ER displays a coarse reticular network at the cell periphery such as crown-like structures (CLS) (Fig. 6). The formation of these CLS might be due to D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup>-induced aggregations into the ER compartment leading to morphology changes. Expression of ectoM<sup>RUN-18</sup> resulted in similar CLS but localization seems a bit different with much less colocalization areas. Only D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> altered the ER organization, with accumulation of a dense structure at the cell periphery (Fig. 6). The substitution of Ala at position M36 of sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> resulted in a formation of a



**Fig. 3.** Effects of ectoM mutations on the subcellular distribution of recombinant RUN-18 E protein. A549 cells were transfected for 18 h with plasmid pcDNA3/RUN-18 prME expressing recombinant DENV-2 RUN-18 prM and E proteins (WT), plasmid pcDNA3/RUN-18 prME mutants bearing M-I36A, M-I36V, and M-(E33A, W35A, R38A) mutations or mock-transfected (mock). For confocal microscopy analysis, cells were fixed, permeabilized and then immunolabelled using anti-E mAb 4G2 and anti-calnexin (CNX) antibody. Cells were visualized for E (green) and CNX (red), and analysed for line-scan profiles of fluorescence intensity. Merged pictures are shown in the right panels with a white line illustrating the location of the line-scan profiles. Scale bar, 5 μm. Data are representative of three independent experiments.



**Fig. 4.** Effects of ectoM mutations on cytotoxicity of recombinant RUN-18 E protein. A549 cells were transfected for 30 h with plasmid pcDNA3/RUN-18 prME expressing recombinant DENV-2 RUN-18 prM and E proteins (WT), plasmid pcDNA3/RUN-18 prME mutants bearing M-I36A, M-I36V, and M-(E33A, W35A, R38A) mutations or mock-transfected (control). In (a), LDH activity was measured and cell membrane permeability was expressed as a fold change relative to control. The level of cell metabolic activity was measured using MTT assay and expressed as a percentage relative to control. The results are the mean (± SEM) of three independent assays in four replicates. Statistical analysis for comparing control with WT and the three M mutants was performed and noted (\*\*\*\*P<0.0001, \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05; n.s.: not significant). In (b), caspase-3/7 enzymatic activity was measured and O.D. values were expressed as signal intensity. The results are the mean (± SEM) of three independent assays in four replicates. Statistical analysis for comparing control with WT and the three M mutants was performed and noted (\*\*\*\*P<0.0001; \*P<0.05; n.s.: not significant).



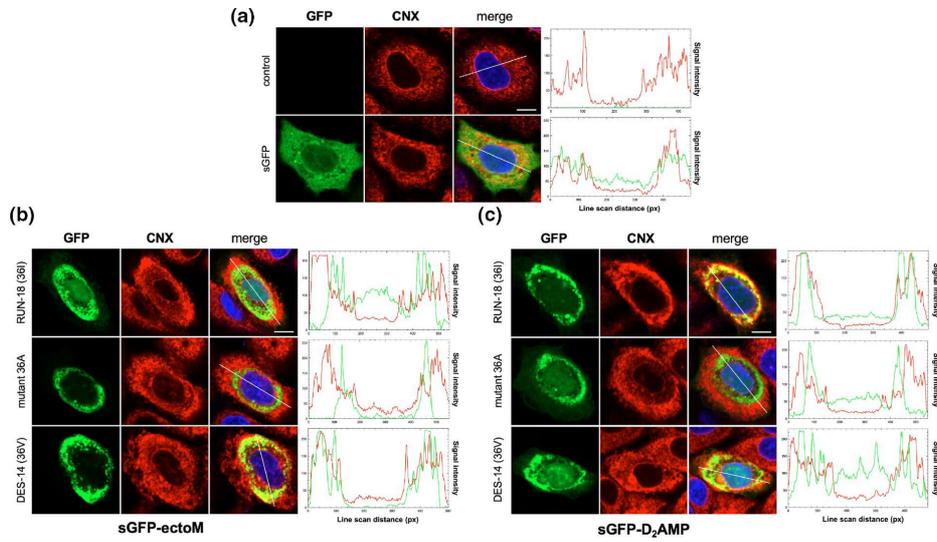
**Fig. 5.** Impact of ectoM mutations on DENV-2 M structure. In (a), the alignment of ectoM<sup>RUN-18</sup> and ectoM<sup>DES-14</sup> sequences and ectoM mutants bearing the mutations at positions M-33, M-35, M-36 and M-38. The D<sub>2</sub>AMP peptide sequences are indicated in bold. In (b), 3D structures prediction of RUN-18 M protein, DES-14 M protein, and mutants were obtained from protein database bank (GenBank reference number MN272404.1) and rendered using AlphaFold2 protein prediction server (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). In left, the M proteins are depicted as follows: the N-terminal region is red, the  $\alpha$ -helix is green and the two TMDs are blue. Predicted aligned error are indicated. In right, protein structures of the four ectoM constructs were aligned and overlapped using ChimeraX software. All pictures were drawn using ChimeraX software.

thinner structure around the nucleus without marked alterations of ER morphology (Fig. 6). These phenotypes were also observed with sGFP-ectoM<sup>RUN-18</sup> mutant bearing an alanine at position M36 (Fig. 6). Finally, expression of sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> and sGFP-ectoM<sup>DES-14</sup> gave similar results as those observed with mutant Ala at position M36, sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> giving leading to a more pronounced transit through the secretory pathway as visualized with the high number of green dots (Fig. 6). Thus, D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> would have a greater propensity to migrate through the secretory pathway as compared with D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup>.

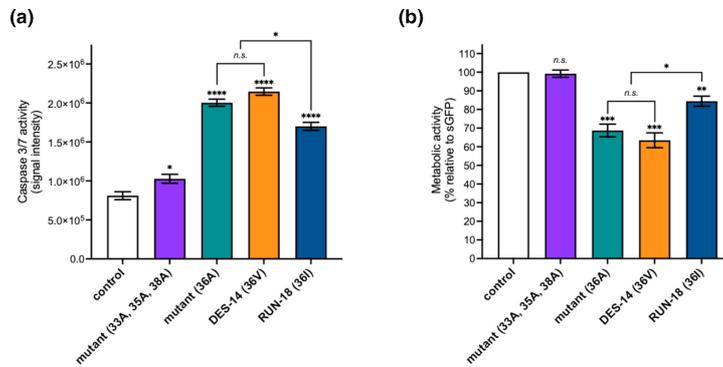
We assessed whether D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> and D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> can differ by their capacity to trigger apoptosis. Consequently, A549 cells were transfected with plasmids expressing sGFP conjugated with D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> and D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> (Fig. 7). D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> mutants bearing alanine on positions M36 and M33/35/38 served as controls (Fig. 5a). Caspase-3/7 activity was detected in A549 cells expressing sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> (Fig. 7a), associated with a moderate loss of cell viability (Fig. 7b). The presence of alanine at positions M33/35/38 greatly affected the death-promoting capability of D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> (Fig. 7). This is consistent with the role of M33/35/38 residues on apoptosis-inducing activity of ZAMP, the ZIKV peptide counterpart of D<sub>2</sub>AMP [31]. We observed that sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> exhibited a greater propensity to trigger apoptosis in A549 cells compared with D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> (Fig. 7a). Expression of sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> resulted in a decrease in cell metabolic activity reaching up to 40% at 30 h post-transfection (Fig. 7b). The results highlight the influence of M residue 36 on the death-promoting capability of D<sub>2</sub>AMP. Apoptosis-inducing activity of D<sub>2</sub>AMP may depend on the nature of amino acid 36 of the M protein which seems to be important for the transit of the protein through the secretory pathway.

## CONCLUSION

The amino acid 36 of M protein has been proposed to play a major role in the flavivirus replication cycle in mammalian cells [18, 19, 32]. The M residue 36 was essentially identified as an uncharged amino acid with isoleucine (DENV-2, DENV-4, JEV, and WNV), alanine (DENV-1 and DENV-3), leucine (YFV) or valine (TBEV) [20], emphasizing that aliphatic hydrophobic properties of amino-acid residue in position 36 were essential for flavivirus M protein. Comparative analysis of DENV-2 M ectoM sequences highlights that position M36 was much less conserved than other ones (Table S1). With an observed amino acid frequency close to 77%, Ile is the



**Fig. 6.** Subcellular distribution of sGFP-D<sub>2</sub>AMP and sGFP-ectoM. A549 cells were transfected for 18 h with plasmids expressing sGFP, sGFP-D<sub>2</sub>AMP, or sGFP-ectoM or mock-transfected (mock). The sGFP-D<sub>2</sub>AMP and sGFP-ectoM constructs include Ile, Ala, or Val at position M36. For confocal microscopy analysis, cells were fixed, permeabilized and then immunolabeled using anti-CN<sub>X</sub> antibody. Cells were visualized for E (green) and CN<sub>X</sub> (red), and analysed for line-scan profiles of fluorescence intensity. Merged pictures are shown in the right panels with a white line illustrating the location of the line-scan profiles. Scale bar, 5 μm. Data are representative of three independent experiments.



**Fig. 7.** Impact of M mutations on the cytotoxicity of D<sub>2</sub>AMP. A549 cells were transfected for 30 h with plasmids expressing sGFP (control) or sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> (RUN-18 (36I)), sGFP-D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> (DES-14 (36V)) or sGFP-D<sub>2</sub>AMP bearing Ala at positions M33/35/38 (mutant (33A, 35A, 38A)) or M36 (mutant (36A)). In (a), caspase-3/7 enzymatic activity was measured and O.D. values were expressed as signal intensity. The results are the mean (± SEM) of three independent assays in four replicates. Statistical analysis for comparing control with sGFP-D<sub>2</sub>AMP was performed and noted (\*\*\*\**P*<0.0001; \**P*<0.05; *n.s.*: not significant). In (b), MTT assay was measured and expressed as a percentage relative to control. The results are the mean (± SEM) of three independent assays in four replicates. Statistical analysis for comparing control with-sGFP-D<sub>2</sub>AMP was performed and noted (\*\*\*\**P*<0.001; \*\**P*<0.01, \**P*<0.05; *n.s.*: not significant).

most frequent residue identified at position M36 whereas Val accounted only for 22%. In view of RUN-18 ectoM having Ile at position M36, we wondered whether amino-change Ile-to-Val might have an effect on the biological properties of E co-expressed with prM and the death-promoting capability of D<sub>2</sub>AMP.

Analysis of recombinant RUN-18 E protein co-expressed with prM in A549 cells revealed that Ile-to-Val mutation but not Ile-to-Ala mutation at position M36 affected expression and subcellular distribution of E protein suggesting a possible defect in heterodimeric interactions between prM and E proteins. The E proteins of DENV-2 strains RUN-18 and DES-14 differ by four amino-acid substitutions with a particular emphasis towards Gln-to-His change at position E52 in the EDI/EDII interface and Ala-to-Thr change at position E262 in EDII domain which faces the M ectodomain in the prM/E heterodimer (Table S2). It has been proposed that the pr peptide from prM covers the EDII fusion loop preventing E fusion with host cell membranes during the transport of prME heterodimers in the secretory pathway [10]. This suggests a potential role for DES-14 EDII residues E-52H and E-262T as compensatory amino acids to the presence of valine at position M36 in the prME heterodimer of DES-14. Another important finding of the study was the loss of cytotoxicity observed for RUN-18 prM and E proteins with M protein bearing valine at position M36. Such a result was unexpected knowing that a severe defect in flavivirus envelope protein expression usually gives rise to ER stress-induced cellular dysfunction resulting in cell death [33–35]. An explanation is that M-I36V mutation prevents heterodimeric interactions between RUN-18 prM and E proteins leading to rapid protein degradation without prolonged severe ER stress.

D<sub>2</sub>AMP is a pro-apoptotic M peptide composed of amino acid residues 31–41 of DENV-2 M ectodomain [16, 17]. Both D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> and D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> which only differ by the hydrophobic nature of M residue 36 can trigger apoptosis in A549 cells. However, the presence of valine at position M36 potentiates the apoptosis-inducing activity of D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> compared with D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup>. Using GFP as a reporter protein, different patterns of subcellular distribution of sGFP-D<sub>2</sub>AMP have been observed in A549 cells according to the nature of M residue 36. Expression of D<sub>2</sub>AMP<sup>RUN-18</sup> resulted in large dots that colocalize with ER, highlighting the ER retention. These structures could be a consequence of D<sub>2</sub>AMP interactions with cytoskeletal motor protein dynein, which has been described as playing a role in the trafficking of immature viral particles through its interaction with DENV-2 M protein [36–38]. Expression of D<sub>2</sub>AMP<sup>DES-14</sup> seems to be associated with a better trafficking through the secretory pathway. Our data highlight an important role for M residue 36 in the death-promoting capability of D<sub>2</sub>AMP presumably due to protein-protein interactions capable of activating the mitochondrial apoptosis pathway, although exact mechanisms remain to be elucidated [33, 35]. Furthermore, our data do not suggest that D<sub>2</sub>AMP-induced apoptosis is related to ER retention but rather that a positive correlation exists between D<sub>2</sub>AMP trafficking through the secretory pathway and apoptosis induction. This would be consistent with the notion that distribution of D<sub>2</sub>AMP in a post-Golgi compartment is a pre-requisite for inducing apoptosis pathway presumably through interactions with pro-apoptotic factors that are not yet identified [16, 17].

It is now well established that surface structural M protein can contribute to several aspects of the flavivirus replication cycle [18, 19, 39–41]. Our study raises the notion that the hydrophobic nature of M residue 36 may drive expression of DENV-2 E protein and pro-apoptotic activity of D<sub>2</sub>AMP. The flavivirus reverse technologies based on ISA method will be useful to generate infectious DENV-2 molecular clones derived from viral strains RUN-18 and DES-14 [42]. Such molecular clones would be reliable tools for further investigation of viral determinants that contribute to the pathogenicity of DENV-2 strains belonging to genotype II (Cosmopolitan) that presently contribute to the global dengue burden. We believe that infectious clones derived from RUN-18 and DES-14 strains will provide important information on the impact of amino acid 36 on the biological properties of DENV-2.

#### Funding information

This work was supported by the European Regional Development Fund (ERDF) through the RUNDENG project (no. 20202640–0022937) and the POE FEDER 2014–20 of the Conseil Régional de La Réunion (PHYTODENGUE programme, N° SYNERGIE: RE0028005). J.D. was supported by a PhD degree scholarship from La Réunion University (Ecole doctorale STS), funded by the French Ministry MESRI.

#### Acknowledgements

We thank P. Mavingui and C. El-Kalamouni for their interest in the study. We thank the members of MOCA team for helpful discussions.

#### Author contributions

J.D., G.G. and P.D. conceived and designed the experiments; J.D. performed the experiments; J.D., G.G. and P.D. analysed the data; P.D. contributed to reagents/materials/analysis tools; J.D., G.G. and P.D. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

#### References

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496:504–507.
2. Messina JP, Brady OJ, Golding N, Kraemer MUG, Wint GRW, *et al.* The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol* 2019;4:1508–1515.
3. WHO. Dengue and Severe Dengue; 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
4. Chawla P, Yadav A, Chawla V. Clinical implications and treatment of dengue. *Asian Pac J Trop Med* 2014;7:169–178.
5. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:2773–2786.

6. Pierson TC, Kielian M. Flaviviruses: braking the entering. *Curr Opin Virol* 2013;3:3–12.
7. Allison SL, Schlich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J Virol* 2001;75:4268–4275.
8. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:13–22.
9. Murray JM, Aaskov JG, Wright PJ. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J Gen Virol* 1993;74 (Pt 2):175–182.
10. Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, *et al.* The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science* 2008;319:1830–1834.
11. Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Mol Biol* 2003;10:907–912.
12. Konishi E, Mason PW. Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* 1993;67:1672–1675.
13. Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 2002;76:5480–5491.
14. Stadler K, Allison SL, Schlich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 1997;71:8475–8481.
15. Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, *et al.* Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20:105–110.
16. Catteau A, Kalinina O, Wagner M-C, Deubel V, Courageot M-P, *et al.* Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol* 2003;84:2781–2793.
17. Catteau A, Roué G, Yuste VJ, Susin SA, Desprès P. Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation. *Biochimie* 2003;85:789–793.
18. de Wispelaere M, Khou C, Frenkiel M-P, Desprès P, Pardigon N, *et al.* A single amino acid substitution in the M protein attenuates Japanese encephalitis virus in mammalian hosts. *J Virol* 2016;90:2676–2689.
19. Basset J, Burlaud-Gaillard J, Feher M, Roingard P, Rey FA, *et al.* A molecular determinant of West Nile virus secretion and morphology as a target for viral attenuation. *J Virol* 2020;94:e00086–20.
20. Hsieh S-C, Zou G, Tsai W-Y, Qing M, Chang G-J, *et al.* The C-terminal helical domain of dengue virus precursor membrane protein is involved in virus assembly and entry. *Virology* 2011;410:170–180.
21. Yenamandra SP, Koo C, Chiang S, Lim HSJ, Yeo ZY, *et al.* Evolution, heterogeneity and global dispersal of cosmopolitan genotype of Dengue virus type 2. *Sci Rep* 2021;11:13496.
22. Giovanetti M, Pereira LA, Santiago GA, Fonseca V, Mendoza MPG, *et al.* Emergence of dengue virus serotype 2 cosmopolitan genotype, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2022;28:1725–1727.
23. Pascalis H, Turpin J, Roche M, Krejbich P, Gadea G, *et al.* 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:e01455.
24. Pascalis H, Biscornet L, Toty C, Hafsia S, Roche M, *et al.* Complete genome sequences of Dengue virus type 2 epidemic strains from Reunion Island and the seychelles. *Microbiol Resour Announc* 2020;9:e01443–19.
25. Vairo F, Mboera LEG, De Nardo P, Oriyo NM, Meschi S, *et al.* Clinical, virologic, and epidemiologic characteristics of Dengue outbreak, Dar es Salaam, Tanzania, 2014. *Emerg Infect Dis* 2016;22:895–899.
26. Santé Publique France. Surveillance de la dengue à La Réunion; 2023. <https://www.santepubliquefrance.fr/recherche/#search=Dengue%20C3%A0%20La%20R%C3%A9union&themes=dengue%20ions=Oc%C3%A9an%20Indien>
27. Hafsia S, Haramboure M, Wilkinson DA, Baldet T, Yemadje-Menudier L, *et al.* Overview of dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2022;16:e0010547.
28. ARS. Situation de La Dengue à La Réunion; 2019. <https://www.lareunion.ars.sante.fr/point-sur-la-dengue-la-reunion-1>
29. Ogire E, Diaz O, Vidalain P-O, Lotteau V, Desprès P, *et al.* Instability of the NS1 glycoprotein from La Reunion 2018 Dengue 2 virus (Cosmopolitan-1 Genotype) in huh7 cells is due to lysine residues on positions 272 and 324. *Int J Mol Sci* 2021;22:1951.
30. Peng J-G, Wu S-C. Glutamic acid at residue 125 of the prM helix domain interacts with positively charged amino acids in E protein domain II for Japanese encephalitis virus-like-particle production. *J Virol* 2014;88:8386–8396.
31. Vanwalscappel B, Haddad JG, Almokdad R, Decotter J, Gadea G, *et al.* Zika M oligopeptide ZAMP confers cell death-promoting capability to a soluble tumor-associated antigen through caspase-3/7 activation. *Int J Mol Sci* 2020;21:9578.
32. Hsieh S-C, Wu Y-C, Zou G, Nerurkar VR, Shi P-Y, *et al.* Highly conserved residues in the helical domain of dengue virus type 1 precursor membrane protein are involved in assembly, precursor membrane (prM) protein cleavage, and entry. *J Biol Chem* 2014;289:33149–33160.
33. Okamoto T, Suzuki T, Kusakabe S, Tokunaga M, Hirano J, *et al.* Regulation of apoptosis during flavivirus infection. *Viruses* 2017;9:243.
34. Turpin J, El Safadi D, Lebeau G, Krejbich M, Chatelain C, *et al.* Apoptosis during ZIKA virus infection: too soon or too late? *Int J Mol Sci* 2022;23:1287.
35. Pan Y, Cheng A, Wang M, Yin Z, Jia R. The dual regulation of apoptosis by flavivirus. *Front Microbiol* 2021;12:654494.
36. Johnston JA, Illing ME, Kopito RR. Cytoplasmic dynein/dynactin mediates the assembly of aggresomes. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002;53:26–38.
37. Egan MJ, McClintock MA, Hollyer IHL, Elliott HL, Reck-Peterson SL. Cytoplasmic dynein is required for the spatial organization of protein aggregates in filamentous fungi. *Cell Rep* 2015;11:201–209.
38. Ripon MKH, Lee H, Dash R, Choi HJ, Oktaviani DF, *et al.* N-acetyl-D-glucosamine kinase binds dynein light chain roadblock 1 and promotes protein aggregate clearance. *Cell Death Dis* 2020;11:619.
39. Pan P, Zhang Q, Liu W, Wang W, Lao Z, *et al.* Dengue virus M protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce vascular leakage in mice. *J Virol* 2019;93:e00996–19.
40. Brown E, Beaumont H, Lefteri D, Bentham M, Foster R, *et al.* Flavivirus membrane (M) proteins as potential ion channel antiviral targets. *Access Microbiol* 2019;1.
41. Zheng A, Yuan F, Kleinfelder LM, Kielian M. A toggle switch controls the low pH-triggered rearrangement and maturation of the dengue virus envelope proteins. *Nat Commun* 2014;5:3877.
42. Aubry F, Nougairède A, de Fabritus L, Querat G, Gould EA, *et al.* Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. *J Gen Virol* 2014;95:2462–2467.

### III.4. Discussion de l'article 3

L'acide aminé en position M-36 de la protéine M semble jouer un rôle majeur dans le cycle de réplication des flavivirus dans les cellules de mammifères (de Wispelaere et al. 2015, Basset et al. 2020). Chez les flavivirus, le résidu M-36 a été principalement caractérisé comme étant un acide aminé non chargé et non polaire : isoleucine (DENV-2, DENV-4, JEV et WNV), alanine (DENV-1 et DENV-3), leucine (YFV) ou valine (TBEV). Cette spécificité suggère que les propriétés hydrophobes et aliphatiques du résidu en position M-36 seraient essentielles pour la protéine M des flavivirus (Hsieh et al. 2011).

L'analyse comparative des séquences M-31/41 de la protéine M, provenant de plus de 3500 souches de DENV-2 obtenues à partir de Genbank, montre que la position M-36 est la moins conservée dans la région C-terminale de l'ectodomaine M. L'isoleucine étant le résidu le plus fréquemment identifié en position M-36 avec une fréquence d'apparition proche de 77%, alors que la valine n'est présente que dans 22% des souches de DENV-2 analysées. L'ectodomaine M de la souche DENV-2 Réunion 2018 (RUN-18) possède une Ile en position M-36, contrairement à la souche DENV-2 Dar Es Salaam 2014 (DES-14) qui possède une Val à la même position. Nous nous sommes alors demandé si le changement d'acide aminé Ile en Val pouvait avoir un effet sur les propriétés biologiques de la protéine E co-exprimée avec la protéine prM et avoir un impact sur la capacité pro-apoptotique de l'oligopeptide D<sub>2</sub>AMP (M-31/41 de DENV-2).

Le repliement correct de la protéine E des flavivirus implique l'activité chaperonne de la protéine prM (Zhang et al. 2003, Li et al. 2008). Par conséquent, la protéine E recombinante de DENV-2 RUN-18 a été co-exprimée avec la protéine prM de cette même souche en tant que précurseur polyprotéique qui sera traité par la signal peptidase cellulaire (Stadler et al. 1997). Pour ce faire, un gène synthétique codant pour les protéines prM et E avec des codons optimisés pour l'expression en cellules humaines a été inséré dans un plasmide vecteur pcDNA3. L'expression, l'antigénicité et la cytotoxicité de la protéine recombinante RUN-18 E ont été évaluées dans la lignée cellulaire A549 qui a été choisie pour sa grande permissivité à la réplication de DENV.

La caractérisation de la protéine E co-exprimée avec la protéine prM, révèle que la mutation M-I36V affecte l'expression et la distribution intracellulaire de la protéine E, contrairement à la mutation M-I36A qui semble n'avoir aucun effet visible. Ces résultats suggèrent un défaut possible dans les interactions hétérodimériques entre les protéines prM et E, suite à l'introduction d'un résidu valine en position M-36 dans DENV-2 RUN-18. L'introduction de la mutation M-I36V dans DENV-2 RUN-18, a également engendré une perte de cytotoxicité induite par les protéines prM et E. Un tel résultat était inattendu, sachant qu'un défaut grave dans l'expression de la protéine d'enveloppe des flavivirus entraîne généralement une accumulation de cette protéine et un dysfonctionnement cellulaire induit par le stress du RE, aboutissant à la mort de la cellule par apoptose (Okamoto et al. 2017, Turpin et al. 2022). Une explication possible serait que la mutation M-I36V perturberait les interactions hétérodimériques entre les protéines prM et E de la souche DENV-2 RUN-18, qui conduirait à une dégradation rapide de la protéine E, évitant un stress prolongé. Ainsi, la substitution du résidu M-36I par une valine peut entraîner d'importants changements dans le comportement biologique de la protéine E de DENV-2 RUN-18 co-exprimée avec la protéine prM dans les cellules A549, comme le suggèrent les changements observés dans l'expression, l'antigénicité, la distribution intracellulaire et la cytotoxicité de ces protéines.

Au sein de la protéine prM, l'ectodomaine de la protéine M contient un peptide pro-apoptotique composé des résidus d'acide aminé M-31/41 (Catteau, Kalinina, et al. 2003), que nous avons nommé D<sub>2</sub>AMP chez DENV-2. Les oligopeptides D<sub>2</sub>AMP RUN-18 et D<sub>2</sub>AMP DES-14, qui ne diffèrent que par la nature hydrophobe du résidu M-36, peuvent tous deux déclencher l'apoptose dans les cellules A549. Cependant, la présence d'une valine en position M-36 de D<sub>2</sub>AMP DES-14 semble potentialiser la capacité de cet oligopeptide à induire l'apoptose par rapport à D<sub>2</sub>AMP RUN-18. En utilisant la GFP comme protéine rapportrice, différents modèles de distribution intracellulaire des constructions sGFP-D<sub>2</sub>AMP ont été observés dans les cellules A549 en fonction de la nature du résidu M-36. L'expression de D<sub>2</sub>AMP RUN-18 possédant une Ile en position M-36 se visualisait par la présence de large accumulation de fluorescence se co-localisant avec le RE, et mettant en évidence une rétention de l'oligopeptide D<sub>2</sub>AMP RUN-18 dans le RE. Une hypothèse serait que cette distribution intracellulaire pourrait être la conséquence des interactions de l'oligopeptide D<sub>2</sub>AMP

avec des protéines du cytosquelette comme la dynéine, qui a été décrite comme jouant un rôle dans le transport des particules virales immatures par son interaction avec la protéine M de DENV-2 (Johnston et al. 2002, Egan et al. 2015, Ripon et al. 2020).

L'expression de D<sub>2</sub>AMP de la souche DENV-2 DES-14 semble être associée à un meilleur transport de l'oligopeptide par la voie de sécrétion cellulaire. Nos données mettent en évidence un rôle important du résidu M-36 dans la capacité de D<sub>2</sub>AMP à promouvoir la mort par apoptose. Nos travaux ne suggèrent pas que l'apoptose induite par D<sub>2</sub>AMP serait liée à une rétention de l'oligopeptide dans le RE, mais plutôt qu'il existerait une corrélation positive entre le transport de D<sub>2</sub>AMP par la voie de sécrétion cellulaire et l'induction de l'apoptose. Cela serait cohérent avec l'idée que la distribution de D<sub>2</sub>AMP dans un compartiment post-golgien est une condition préalable à l'induction de l'apoptose, probablement par le biais d'interactions avec des facteurs pro-apoptotiques qui n'ont pas encore été identifiés (Catteau, Roué, et al. 2003, Okamoto et al. 2017, Pan et al. 2021).

Il est aujourd'hui bien établi que la protéine structurale M des flavivirus contribue à plusieurs aspects du cycle de réplication viral (Zheng et al. 2014, Brown et al. 2019, Pan et al. 2019). Notre étude soulève l'idée que la nature hydrophobe du résidu M-36 semble conditionner l'expression de la protéine E de DENV-2 et l'activité pro-apoptotique de l'oligopeptide D<sub>2</sub>AMP. Nos résultats démontrent que la substitution M-I36V perturbe l'expression de la protéine E de DENV-2 RUN-18 co-exprimée avec la protéine prM, en entraînant une modification de la localisation intracellulaire de la protéine E associée à une absence d'effets cytopathiques dans les cellules A549. Dans de futures expérimentations, l'utilisation des techniques de génétique inverse basées sur la méthode ISA serait particulièrement intéressant pour générer des clones viraux infectieux de DENV-2 dérivés des souches virales RUN-18 et DES-14 (Aubry et al. 2014). Ces clones viraux seraient des outils efficaces pour une étude complémentaire permettant de caractériser les déterminants viraux qui contribueraient à la pathogénicité des souches DENV-2 du génotype Cosmopolitan.

# **Partie IV : Discussion générale**

## - DISCUSSION GÉNÉRALE -

Au cours des 30 dernières années, l'émergence des flavivirus n'a fait que croître avec une augmentation de leur répartition géographique dans les régions tropicales, subtropicales, et à présent tempérées de la planète. En atteste la diffusion rapide d'*Ae. albopictus* en Europe (ECDC. & EFSA. 2023), et plus particulièrement en France où des cas autochtones de dengue sont de plus en plus documentés (Cochet et al. 2022). Les territoires du sud-ouest de l'océan Indien (SOOI) ne sont pas épargnés par ce phénomène, en ayant récemment été le théâtre de multiples épidémies de dengue, cumulant plusieurs dizaines de milliers de cas d'infection signalés à l'île de La Réunion depuis 2018. Cette tendance alarmante souligne les défis croissants liés aux émergences virales et l'urgence de mettre en place des stratégies de surveillance et de contrôles efficaces à l'échelle mondiale.

Approfondir nos connaissances sur les propriétés biologiques des flavivirus est aujourd'hui plus que jamais une priorité afin de mettre en place des stratégies de lutte adaptées, efficaces et innovantes. Dans le cadre de mon projet de thèse, mes travaux se sont focalisés sur l'étude des protéines structurales de membrane (prM/M) et d'enveloppe (E) des flavivirus ZIKV et DENV, qui sont des pathogènes prioritaires en termes de santé publique. Les protéines prM/M et E sont connues pour être essentielles d'une part dans la structuration de la particule virale et son infectiosité, et d'autre part dans les interactions hôte-pathogène, y compris dans l'activation de la réponse immunitaire. Par conséquent, les travaux réalisés durant ma thèse se sont organisés autour de trois grands sujets d'étude :

Mon premier sujet d'étude a été de caractériser les propriétés antigéniques de la glycoprotéine E d'une souche épidémique contemporaine de ZIKV. Au cours de mes travaux, la réactivité antigénique de la boucle de glycosylation (GL) de ZIKV exprimée sous la forme d'un peptide synthétique et/ou au sein de la protéine recombinante EDI a été évaluée par exposition aux sérums de souris infectées et par immunisation de souris BALB/c. Nous avons démontré le rôle important de la GL et des résidus E-152, E-156 et E-158 dans l'antigénicité de la protéine E de ZIKV. Une substitution de ces résidus entraînant des changements conformationnels de la GL, une perte du motif de glycosylation (N-x-T/S) et une perturbation de la reconnaissance de la protéine E par des anticorps neutralisants (Article 1).

## - DISCUSSION GÉNÉRALE -

La protéine prM/M sert de chaperon à la protéine E en permettant son bon repliement au cours du cycle viral. Cette protéine est clivée par des furines/subtilisines cellulaire en un fragment « pr » et une petite protéine M mature. Outre son rôle de chaperon, la protéine M contient une séquence pro-apoptotique qui avait été identifiée chez plusieurs flavivirus (DENV, JEV, WNV et YFV) (Catteau, Kalinina, et al. 2003), mais pas ZIKV. Sachant que l'induction de la mort cellulaire par apoptose est un effet cytopathique important dans l'infection par ZIKV (Souza et al. 2016, Turpin et al. 2022), mon second sujet d'étude a été d'évaluer la capacité de l'ectodomaine M de ZIKV à induire l'apoptose. Nous avons démontré pour la première fois à notre connaissance, qu'une activité pro-apoptotique était associée à l'oligopeptide M-31/41 de ZIKV, tout en démontrant le rôle important des résidus M-33, M-35 et M-38 dans cette activité pro-apoptotique. Par ailleurs nous avons démontré que l'association de l'oligopeptide M-31/41 à un antigène associé aux tumeurs, le MPF un produit de clivage de la Mésothéline, pouvait entraîner la mort par apoptose des cellules tumorales. Ce constat ouvre des nombreuses perspectives pour l'utilisation de l'oligopeptide M-31/41 de ZIKV en tant qu'agent anticancéreux innovant (Article 2).

Fruit de mon expérience acquises sur la manipulation des glycoprotéine prM/M et E de ZIKV, je me suis attelé à caractériser les glycoprotéines structurales des souches virales DENV-2 du génotype Cosmopolitan issus de la région SOOI, dont les propriétés biologiques n'étaient pas encore connues avant le début de notre étude. L'analyse moléculaire des souches contemporaines de DENV-2 du génotype Cosmopolitan, DES-14 et RUN-18, responsables d'épidémies respectivement en Tanzanie en 2014 et à La Réunion en 2018, a mis en évidence une potentielle substitution V36I dans la protéine M. Le résidu Ile est le plus fréquemment observé en position M-36 de DENV-2 tandis que le résidu Val est retrouvé dans moins d'un quart des souches virales séquencées. Mon troisième sujet d'étude a donc été d'évaluer l'effet d'une substitution M-I36V d'une part sur la formation de l'hétérodimère prME de DENV-2 RUN-18 et d'autre part sur l'activité pro-apoptotique de l'oligopeptide D<sub>2</sub>AMP. Mes travaux de thèse ont démontré que le changement du résidu Ile en Val à la position M-36 dans la protéine M affecte l'expression et la cytotoxicité de la glycoprotéine E exprimée comme un complexe prME et la capacité de l'oligopeptide D<sub>2</sub>AMP à activer la voie apoptotique (Article 3).

#### IV.1. Les résidus M-31/41 des flavivirus et leur capacité pro-apoptotique

L'induction de l'apoptose par l'oligopeptide M-31/41 de DENV et ZIKV nécessite la translocation et le transport de cet oligopeptide vers la voie de sécrétion cellulaire ainsi que les compartiments post-golgiens. Cette localisation intracellulaire conduit à un dysfonctionnement mitochondrial et une activation de la caspase 3 effectrice de l'apoptose (Catteau, Roué, et al. 2003, Vanwalscappel et al. 2020). On pourrait avancer l'hypothèse que cette induction d'apoptose résulte d'une interaction directe ou indirecte entre les résidus M-31/41 de la protéine M et des molécules de signalisations spécifiques de l'apoptose. Une telle interaction pourrait se produire au cours de la maturation de la protéine prM en protéine M mature dans les compartiments post-golgiens.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'utilisation de techniques d'immunoprécipitation et/ou de pull-down d'affinité suivi d'une identification moléculaire par spectrométrie de masse permettrait d'étudier les interactions protéine-protéine impliquant la protéine M et ses résidus M-31/41. D'autre part, une étude de la génomique et de la protéomique intracellulaire avant et après exposition des cellules à l'oligopeptide M-31/41 permettrait d'identifier les agents moléculaires et les voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'apoptose par cet oligopeptide. Il serait alors primordial de cibler les protéines impliquées dans les voies intrinsèque et/ou extrinsèque de l'apoptose tels que : les récepteurs de mort (TNFR, Fas, TRAILR ou DR), les protéines du complexe DISC (FADD, cFLIP, Pro-Caspase 8/10), les protéines de la famille BCL-2 (Bcl-2, Bax, Bak) dont les protéines dites « à domaine BH3 » (Bid, Noxa, Puma, Bim), le facteur de transcription P53, la Pro-Caspase-9 et Apaf-1 qui forme l'apoptosome, ou encore les caspases -9, -7 et -3 et la polymérase PARP.

Au sein de l'oligopeptide M-31/41 de ZIKV, nommé ZAMP, les résidus M-33/35/38 ont révélé leur importance dans la capacité de cet oligopeptide à induire une réponse apoptotique. Il serait intéressant d'évaluer la contribution des résidus M-33, M-35 et M-38 de manière indépendante en lien avec l'activité pro-apoptotique de ZIKV. Le tryptophane en position M-35 étant invariable au sein des flavivirus, celui-ci alors serait une cible prioritaire. L'importance des autres résidus constituant l'oligopeptide M-31/41 reste cependant à être déterminée (**Tableau 2**). En effet bien que la variation de ces résidus entre les différentes souches virales de ZIKV, DENV et YFV ne semble pas

considérablement réduire l'activité pro-apoptotique des oligopeptides M-31/41 (Vanwalscappel et al. 2020), ces modifications d'acides aminés pourraient être impliquées dans une modulation plus précise et sensible de l'induction de l'apoptose par ces virus. Comme nous l'avons observé dans notre étude, les substitutions M-I36V et M-I36A introduites dans l'oligopeptide D<sub>2</sub>AMP sont suffisantes pour moduler positivement la réponse pro-apoptotique induite par cet oligopeptide (Article 3).

**Tableau 2 : Alignement des résidus M-31/41 des flavivirus d'intérêt médical**

Flavivirus	
ZIKV	<sup>31</sup> RVENWIFRNPG <sup>41</sup>
DENV-1	<sup>31</sup> KVETWALRH <sup>41</sup> PG
DENV-2	<sup>31</sup> RIETWILRH <sup>41</sup> PG
DENV-3	<sup>31</sup> KVETWALRH <sup>41</sup> PG
DENV-4	<sup>31</sup> RVESWILRN <sup>41</sup> PG
YFV	<sup>31</sup> KIERWLVRN <sup>41</sup> PF
WNV	<sup>31</sup> KTESWILRN <sup>41</sup> PG
JEV	<sup>31</sup> KTENWILRN <sup>41</sup> PG

#### IV.2. Le résidu M-36 et son impact sur la biologie des protéines prM/M et E

De manière intéressante, Catteau et ses collègues ont mis en évidence un rôle important du résidu M-36 dans la modulation de l'activité pro-apoptotique de l'ectodomaine M de DENV et YFV. Ils ont notamment démontré que la substitution M-I36F dans la protéine M de la souche vaccinale YF-17D abolissait la capacité de l'ectodomaine M de YFV à déclencher l'apoptose (Catteau, Kalinina, et al. 2003). Parmi les 32 différences d'acides aminés identifiées entre YF-17D et la souche sauvage YFV dont il est issu (Hahn et al. 1987, Wang et al. 1995), seule une mutation est présente dans la protéine M à la position 36 suggérant un rôle crucial du résidu M-36 dans la pathogénicité de ce virus (Monath 2005). Il a été notamment démontré que la mutation M-L36F de YFV est partiellement responsable de l'incapacité de la souche vaccinale YF-17D à infecter et à se disséminer chez les moustiques (McElroy et al. 2006). D'autre part, la mutation M-L36F a également été associée à l'atténuation et la perte de neurovirulence des flavivirus JEV et WNV, en affectant grandement l'assemblage et la sécrétion des particules virales (de Wispelaere et al. 2015, Basset et al. 2020).

## - DISCUSSION GÉNÉRALE -

Dans la topologie de l'hétérodimère prME, l'ectodomaine M et par extension le résidu M-36 apparaît comme étant à l'interface entre la membrane lipidique et le domaine EDII de la protéine E. Il est alors possible que la potentielle substitution d'un résidu Val en Ile à la position M-36, observé entre les souches DENV-2 du génotype Cosmopolitan DES-14 et RUN-18, puisse perturber les interactions hétérodimériques entre les protéines prM/M et E. La substitution d'une Ile par une Val ne modifie pas la nature de l'acide aminé mais implique un changement de chaîne latérale avec la perte d'un groupement méthyl. Cela pourrait entraîner un encombrement stérique ou encore une perturbation de liaisons hydrogènes au sein de l'hétérodimère prME. Ces perturbations pourraient entraîner un mauvais repliement, une rétention dans le réticulum endoplasmique et/ou une rapide dégradation protéolytique des protéines prM/M et E, réduisant par conséquent leur cytotoxicité cellulaire.

Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier plus en détail l'impact de la mutation M-I36V sur l'interaction hétérodimérique des protéines prM/M et E. Il serait alors nécessaire de vérifier et comparer l'expression de la protéine E en corrélation à l'expression de la protéine prM/M, par l'utilisation d'anticorps spécifique anti-prM et anti-E, ou par l'ajout d'une étiquette tag aux protéines recombinantes. L'utilisation de sérum de patient infecté nous permettrait d'étudier l'impact de la mutation M-I36V sur l'antigénicité des protéines prM/M et E chez l'homme. Par la suite, des tests de co-immunoprécipitation, de GST pull down, ou des nouvelles méthodes tel que le BiFC (de l'anglais, bimolecular fluorescence complementation) pourraient mettre en évidence une diminution ou une augmentation dans l'interaction hétérodimérique des protéines prM/M et E.

D'autre part, la mutation M-I36V semble provoquer une rétention de la protéine d'enveloppe (E) dans le réticulum endoplasmique, tout en entraînant des perturbations dans l'organisation structurale de ce dernier. Cette rétention en lien avec une moindre propension de la protéine E à migrer dans les voies de sécrétion semble être associée à une diminution de la cytotoxicité cellulaire induit par les hétérodimères prME. Il existe alors deux grandes hypothèses : 1) soit la rétention de la protéine E mal repliée est associée à sa rapide dégradation par la voie ubiquitine-protéasome (UbPr) suite à l'accumulation et l'agrégation de cette protéine, 2) soit la rétention de la protéine E dans le RE est associée à une rétention équivalente de la protéine prM/M, empêchant l'activité pro-apoptotique induite par les résidus M-31/41 qui a normalement lieu dans

## - DISCUSSION GÉNÉRALE -

la voie de sécrétion cellulaire. Afin de vérifier ses hypothèses, il serait alors nécessaire d'étudier la proportion intracellulaire de protéine E ubiquitylée, l'expression et l'activité des ubiquitine-ligases (ISG15, TRIMs, ...) et des déubiquitinases (USP8), ainsi que l'implication du protéasome par l'utilisation d'inhibiteurs tels que le MG132.

Chez DENV, la formation de vésicules intracellulaires issues de déformations complexes des membranes du RE permet au virus de se dissimuler face au système immunitaire innée durant le processus de réplication (Fernandez-Garcia et al. 2009). Par conséquent, des perturbations dans la structure du RE induite par prM et E suite à l'apparition de la mutation M-I36V pourraient altérer ce processus d'évasion virale. La mise en place de clones viraux pourrait permettre d'étudier ce phénomène plus en détail, dans un contexte infection avec un cycle viral complet.

Outre la mutation en position M-36 des souches DENV-2 RUN-18 et DES-14, la protéine E de ces souches virales se distingue par la présence de quatre substitutions en acides aminés aux positions : E-Q52H, E-V141I, E-A262T et E-V322I. Parmi celles-ci la substitution E-Q52H se trouvant à l'interface des domaines EDI/EDII et la substitution E-A262T se trouvant à l'interface du domaine EDII et de l'ectodomaine M, pourraient jouer un rôle dans les interactions hétérodimériques prME. La position de ces acides aminés au sein de l'hétérodimère, suggère que ceux-ci pourraient potentiellement être associé ou compenser la substitution M-I36V dans la souche DENV-2 DES-14. Chez les flavivirus, les mutations apparaissent le plus souvent sous forme de cluster (ensemble de mutation) pouvant assurer une stabilité globale de la protéine au niveau structurel et fonctionnel. Il serait alors intéressant d'explorer le rôle de ces substitutions présentes dans la protéine E de DENV-2 DES-14 sur la biologie de cette protéine et son interaction au sein de l'hétérodimère prME.

L'apparition de substitutions nucléotidiques au sein des protéines virales peut influencer sur la capacité de réplication et/ou de transmission du virus chez l'insecte vecteur (Schuffenecker et al. 2006, Tsetsarkin et al. 2007). De manière intéressante, l'utilisation de clones viraux pourrait nous permettre d'étudier l'impact des substitutions observées entre les protéines prM et E de DENV-2 RUN-18 et DES-14, sur la transmission du virus par son vecteur moustique du genre *Aedes*. Il serait alors essentiel de caractériser les protéines prM/M et E chez le vecteur moustique et l'impact de la mutation M-I36V sur sa capacité vectorielle.



# **Partie V : Perspectives**

### **V.1. Utilisation du peptide pro-apoptotique M-31/41 de ZIKV dans l'élaboration de nouvelles stratégies anti-cancéreuses**

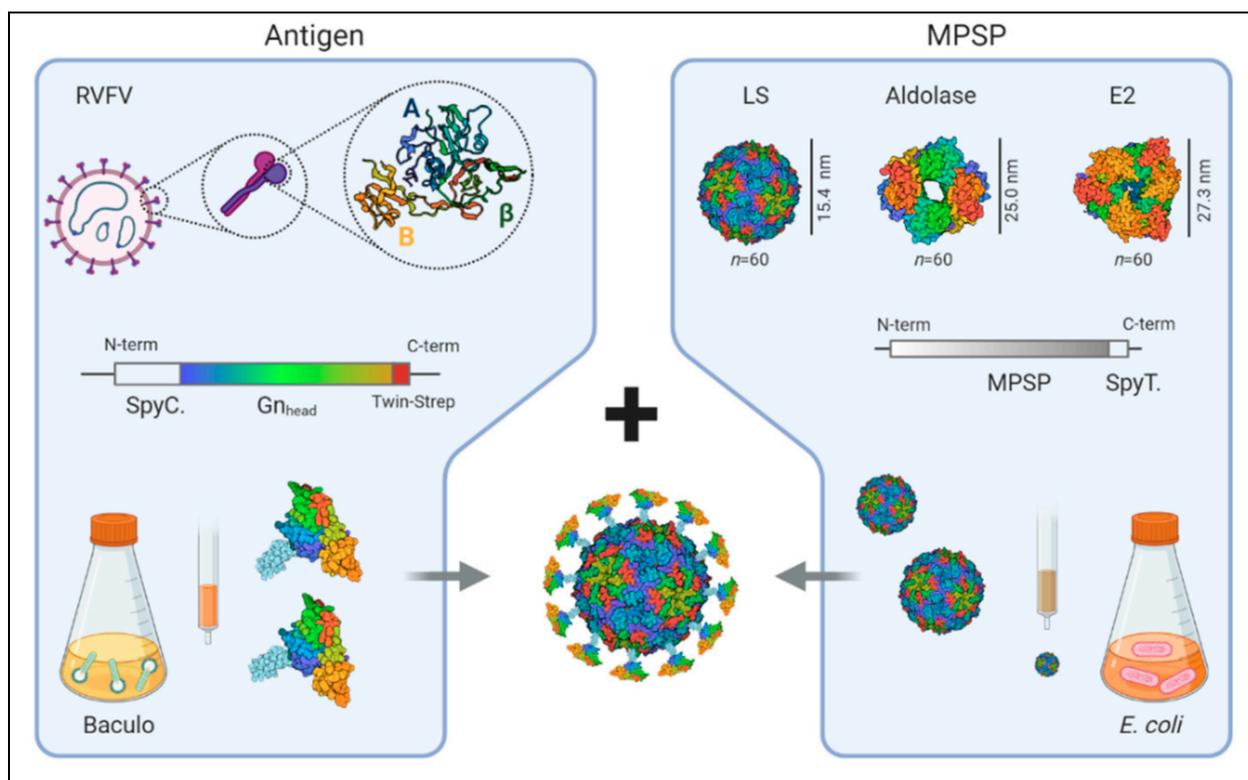
Au cours de mes travaux nous avons démontré que l'association de l'oligopeptide ZAMP (M-31/41 de ZIKV) au MPF (Megakaryocyte potentiating factor), un produit de clivage de la mésothéline, était efficace pour le déclenchement de l'apoptose dans différents types de cellules tumorales (Article 2). La capacité de ZAMP à conférer des propriétés pro-apoptotiques à un antigène associé aux tumeurs (TAA, de l'anglais Tumor-associated antigen), pourrait ouvrir des perspectives importantes pour l'utilisation d'un tel oligopeptide dans des stratégies de thérapie du cancer. Cette construction peptidique pourrait être efficace en induisant la mort des cellules tumorales tout en permettant la reconnaissance immunitaire des TAAs par les cellules présentatrices d'antigènes.

Le principal objectif d'un traitement anti-tumoral est l'éradication totale des cellules cancéreuses, qui sont dans leur grande majorité défectueuses dans leur processus apoptotique. Par conséquent, depuis plusieurs années une grande attention a été accordée aux peptides pro-apoptotiques (Min et al. 2018). Ces peptides possèdent des propriétés intéressantes, comme une bonne solubilité aqueuse, une faible immunogénicité et une synthèse chimique peu coûteuse. Cependant, malgré leur grande utilité, une fois administrés dans la circulation systémique, les peptides pro-apoptotiques sont rapidement éliminés par les reins ou le foie. Dans la circulation systémique ces peptides sont également soumis à une dégradation continue par des enzymes endogènes, une reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte et une inefficacité dans l'internalisation cellulaire, qui entraîne une neutralisation des effets thérapeutiques attendus (Wu et al. 2014).

Pour surmonter ces obstacles et dans l'objectif d'utiliser l'oligopeptide ZAMP pour le développement d'une stratégie anti-tumorale innovante, un système d'administration idéal devrait avoir : une bonne stabilité dans la circulation sanguine, un ciblage spécifique des cellules cancéreuses, une pénétration de la membrane cellulaire et un échappement endosomal efficace pour accéder à la machinerie cellulaire impliquée dans les processus apoptotiques.

À cet effet, l'utilisation de nanoparticules est l'une des tendances récentes dans le développement de nouveaux systèmes d'administration de médicaments en thérapie anti-cancéreuse (Steichen et al. 2013). Les nanoparticules sont définies comme des particules possédant une dimension inférieure à 100 nm, qui peuvent prendre diverses formes, tailles et structures. Ces nanoparticules peuvent servir de véhicules pour l'administration de peptides pro-apoptotiques en possédant : une stabilité plasmatique améliorée, une potentialisation de l'efficacité thérapeutique des peptides par présentation multivalente, et une pénétration tissulaire profonde (Yao et al. 2020). En outre, la présentation de plusieurs copies d'un même peptide pro-apoptotique sur la surface d'une seule nanoparticule pourrait non seulement renforcer leur activité cytotoxique, mais aussi faciliter leur entrée dans les cellules cibles (Gavas et al. 2021).

De nos jours, il existe de nombreux types de nanoparticules : en polymère, en or, en silice mésoporeuse, magnétique ou encore se formant par auto-assemblage (Cheng et al. 2021). Ces constructions possèdent toutes leurs avantages et leurs inconvénients. En particulier, pour transporter les peptides pro-apoptotiques ZAMP, les nanoparticules d'échafaudage protéique multimérique (MPSP, de l'anglais Multimeric protein scaffold particles ) qui sont utilisées en stratégie vaccinale depuis quelques années, ont attiré mon attention (**Figure 36**) (Wichgers Schreur et al. 2021). Cette méthode permet un couplage très efficace des antigènes aux nanoparticules, en maintenant leur conformation native grâce à une technologie particulièrement prometteuse appelée « SpyTag-SpyCatcher ». Les MPSPs nécessitent peu de modifications post-traductionnelles et peuvent être produites efficacement dans *E. coli* ou dans d'autres systèmes d'expression (Okba et al. 2020). Les MPSPs pourraient alors être utilisées pour délivrer le peptide pro-apoptotique ZAMP, potentiellement associé aux TAAs, à la zone cible de l'organisme. L'utilisation de la construction mutZAMP un analogue non-apoptotique de ZAMP, dans lequel les résidus M-E33/W35/R38 ont été remplacés par des résidus Alanine, pourrait alors servir de contrôle dans l'établissement d'un tel projet.



**Figure 36 : Méthode de production des nanoparticules MPSPs**

Figure illustrant la méthode de production de nanoparticules MPSPs, avec l'exemple d'un candidat vaccin RVFV (Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift). Brièvement l'antigène cible (ici Gnhead) est lié dans sa région N-terminale à un domaine SpyCatcher et à un Twin-Strep-tag dans sa région C-terminale. Après expression à l'aide du système d'expression baculovirus, les sous-domaines sont purifiés par chromatographie sur colonne Strep-Tactin. D'un autre côté, les nanoparticules MPSPs à base de lumazine synthase (LS), d'aldolase ou d'E2 lié à un domaine SpyTags en C-terminale ont été exprimées à l'aide du système d'expression *E. coli*. Lors du mélange, le SpyCatcher fusionné à l'extrémité N-terminale de l'antigène forme une liaison isopeptidique spontanée avec le SpyTag présent sur les particules MPSPs. Cela produit alors des nanoparticules arborant l'antigène d'intérêt pour immunisation.

## V.2. Atténuation de DENV pour l'élaboration de souches vaccinales vivantes

Nos travaux ont démontré que le résidu en position M-36 pourrait avoir un impact critique sur les propriétés biologiques des protéines prM et E de DENV-2, en altérant l'expression et l'antigénicité de la protéine E mais également la cytotoxicité induite par les hétérodimères prME (Article 3). Il serait alors intéressant d'observer l'impact d'une introduction de résidu Val, Ala ou encore Phe en position M-36 sur le comportement biologique des souches vaccinales de DENV. La mutation du résidu M-36, mis en avant au cours de ma thèse, pourrait alors faire partie intégrante d'une optimisation de vaccins vivants atténués préexistants ou en cours de développement.

## - PERSPECTIVES -

Les vaccins vivants atténués offrent actuellement la protection la plus efficace contre les maladies infectieuses. Ces vaccins sont créés en réduisant la virulence d'un agent pathogène, tout en préservant sa viabilité. Chez les flavivirus l'atténuation peut se faire par passages successifs ou par génétique inverse. Par rapport aux vaccins inactivés, les vaccins atténués produisent une réponse immunitaire plus forte et durable, avec un déclenchement rapide de l'immunité. Le plus souvent, une seule administration du vaccin suffit à induire une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire chez le patient. De plus, ces vaccins ne nécessitent généralement pas d'adjuvant et présentent par conséquent un réel avantage économique (Minor 2015).

Le premier vaccin vivant atténué produit contre un flavivirus est la souche vaccinale YF-17D (Monath 2005). Cette souche vaccinale a été obtenue dans les années trente de manière empirique par passages successifs de la souche sauvage YFV Asibi sur tissus animaux et cultures cellulaires. Ces passages successifs sur embryons de souris et de poulet, ont permis une sélection progressive de variants ayant des propriétés biologiques altérées et ne présentant aucune neuroadaptation, neurovirulence ou viscérotropisme par rapport à la souche originelle. L'apparition de 32 mutations au sein de la souche vaccinale YF-17D (Hahn et al. 1987), dont la mutation M-I36F étant la seule présente au sein de la protéine M, suggéra un rôle crucial pour ce résidu dans la pathogénicité virale de YFV (Monath 2005). Cependant, aujourd'hui une approche empirique par passages successifs n'est plus applicable et le développement de nouvelles générations de vaccins obtenus par des méthodes plus sûres et contrôlées devient nécessaire.

Les flavivirus partagent une même organisation génomique et des caractéristiques de réplication similaires. Cette particularité rend possible l'utilisation du génome d'un flavivirus déjà atténués comme vecteur vaccinal tout en permettant l'expression des gènes structuraux provenant d'autres flavivirus (Zhao et al. 2021). L'utilisation des protéines virales hautement immunogènes prM et E est intéressante pour le développement de virus chimériques du fait de leur capacité à induire une forte réponse immunitaire. Cette méthode a notamment permis le développement des vaccins contre la dengue actuellement mis sur le marché et commercialisés, que sont Dengvaxia et Qdenga (Thomas & Yoon 2019, Rivera et al. 2022).

- PERSPECTIVES -

Dengvaxia et Qdenga sont deux vaccins vivants atténués, chimériques et tétravalents, dirigés contre les quatre sérotypes de la dengue (DENV-1 à DENV-4). Actuellement ces deux vaccins sont les seuls disponibles sur le marché et autorisés à la vente sous certaines restrictions. Dengvaxia est basé sur le squelette du vaccin YF-17D dans lequel les protéines structurales prM et E ont été substituées par les protéines des quatre sérotypes de DENV (Huang et al. 2023). Alors que, Qdenga repose sur le génome viral de la souche DENV-2 PDK-53 servant de squelette au sein duquel les protéines structurales prM et E ont été substituées par les protéines des autres sérotypes DENV-1, DENV-3 et DENV-4 (Huang et al. 2023). L'analyse comparative des séquences de ces souches vaccinales révèle la présence d'un résidu Ala ou Ile en position M-36 (**Tableau 3**). Le résidu Ala correspondant au sérotype DENV-1 et DENV-3, et le résidu Ile correspondant au sérotype DENV-2 et DENV-4.

L'utilisation d'une protéine prM/M possédant une mutation ponctuelle à la position M-36, qui réduirait la cytotoxicité induite par les hétérodimères prME et altérerait l'antigénicité de la protéine E (Article 3), ainsi que le cluster de mutation M-E33A/W35A/R38A qui réduirait l'induction d'apoptose par la protéine M (Article 3) pourrait représenter une piste d'atténuation intéressante chez les souches virales de DENV et participer à la mise en place ou à l'optimisation de souches vaccinales adaptées, efficaces et innovantes face à l'expansion récente et fulgurante de DENV.

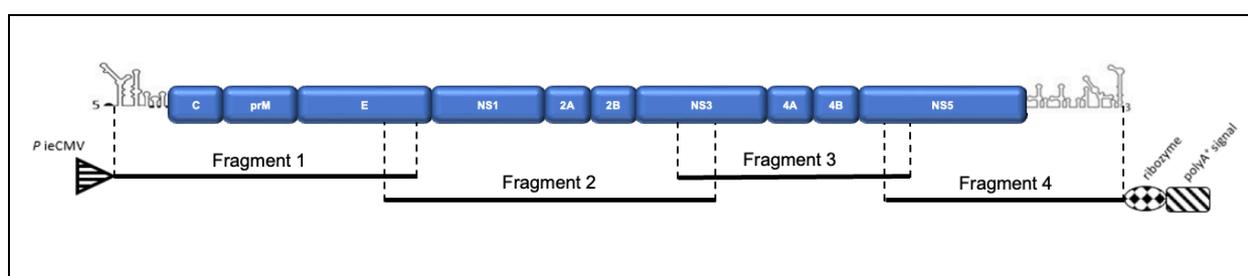
**Tableau 3 : Séquences M-31/41 des souches vaccinales Dengvaxia et Qdenga**

<b>DENV-2 SOOI</b>		
<i>RUN-18</i>	<sup>31</sup> RIETW <b>I</b> LRHPG <sup>41</sup>	
<i>DES-14</i>	<sup>31</sup> RIETW <b>V</b> LRHPG <sup>41</sup>	
<b>Dengvaxia</b>		
<i>CYD-1</i>	<sup>31</sup> RVETW <b>A</b> LRHPG <sup>41</sup>	
<i>CYD-2</i>	<sup>31</sup> RIE <b>I</b> WILRHPG <sup>41</sup>	
<i>CYD-3</i>	<sup>31</sup> KVETW <b>A</b> LRHPG <sup>41</sup>	
<i>CYD-4</i>	<sup>31</sup> RVESW <b>I</b> LRNPG <sup>41</sup>	
<b>Qdenga</b>		
<i>TDV-1</i>	<sup>31</sup> KVETW <b>A</b> LRHPG <sup>41</sup>	
<i>TDV-2</i>	<sup>31</sup> RIETW <b>I</b> LRHPG <sup>41</sup>	
<i>TDV-3</i>	<sup>31</sup> KVETW <b>A</b> LRHPG <sup>41</sup>	
<i>TDV-4</i>	<sup>31</sup> RVESW <b>I</b> LRNPG <sup>41</sup>	
		<b>Sérotypes de DENV</b>
		<i>DENV-1</i>
		<sup>31</sup> KVETW <b>A</b> LRHPG <sup>41</sup>
		<i>DENV-2</i>
		<sup>31</sup> RIETW <b>I</b> LRHPG <sup>41</sup>
		<i>DENV-3</i>
		<sup>31</sup> KVETW <b>A</b> LRHPG <sup>41</sup>
		<i>DENV-4</i>
		<sup>31</sup> RVESW <b>I</b> LRNPG <sup>41</sup>

### V.3. Design, production et caractérisation de clones viraux RUN-18 et DES-14 obtenus par génétique inverse

La production d'un clone viral par génétique inverse permet d'étudier un virus en se basant sur la séquence nucléotidique originale de celui-ci, et limite par conséquent les biais potentiels dus à la dérive génétique observée lors de passages successifs du virus en culture cellulaire (Bloom et al. 2007). Bien que l'utilisation d'une population à faible diversité génétique présente des limites importantes pour l'étude de la virulence des virus, celle-ci offre la possibilité de considérer le phénotype spécifique d'une séquence consensus et permet d'étudier l'impact de mutations ciblées sur les propriétés biologiques de ces virus (Domingo & Perales 2019).

À titre d'exemple, la méthode de génétique inverse appelée ISA (de l'anglais Infectious subgenomic amplicons) a l'avantage d'être simple, polyvalente et rapide. Cette méthode permet la production de virus à ARN infectieux sans nécessiter d'étape de transcription d'ARN in vitro, de clonage ou de propagation d'ADNc dans des bactéries (Aubry et al. 2014, Atieh et al. 2016, Touret et al. 2019). La méthode ISA est basée sur la transfection de fragments d'ADN subgénomique chevauchant dans des cellules permissives. Ces fragments sont amplifiés par PCR et englobent le génome entier du virus (**Figure 37**). La recombinaison des fragments d'ADN et la production de l'ARN génomique viral sont alors réalisées par la machinerie cellulaire sous l'effet de signaux de transcription. L'utilisation de polymérases de haute-fidélité réduit la variabilité génétique des populations virales produites et permet ainsi la production de stocks viraux possédant un nombre réduit de quasi-espèces (Driouich et al. 2019).



**Figure 37 : La méthode ISA (Infectious subgenomic amplicons)**

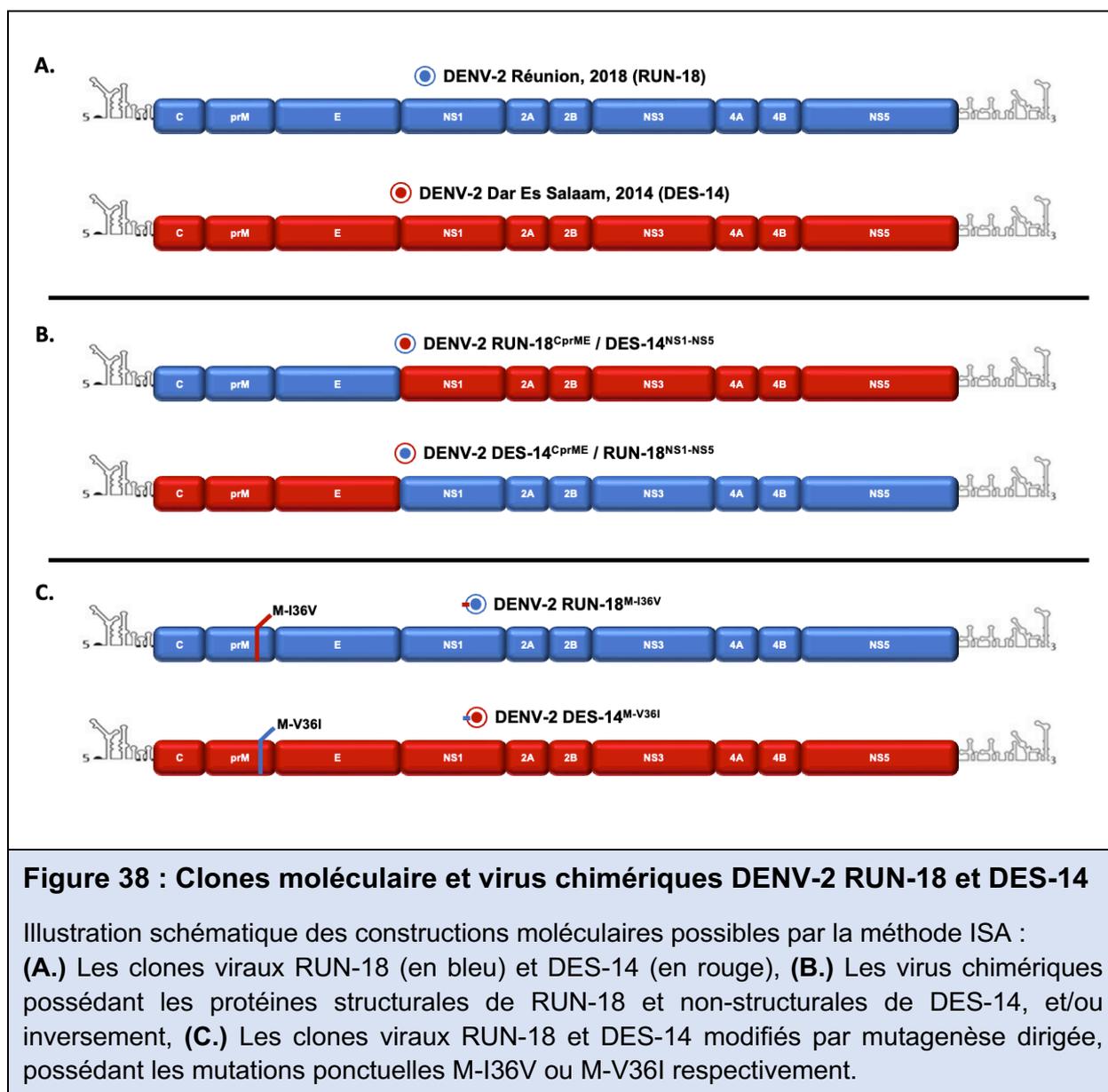
L'ensemble du génome viral est amplifié par RT-PCR, sous la forme de fragments d'ADNc chevauchant. Le promoteur du cytomégalo virus humain ( $P_{icCMV}$ ) et le ribozyme de l'hépatite delta suivi du signal de polyadénylation du virus simien 40 (SV40) sont ajoutés respectivement aux extrémités 5' et 3' du premier et du dernier fragment.

## - PERSPECTIVES -

Au sein de notre laboratoire la production de clones viraux et de virus chimères de ZIKV par la méthode ISA, nous a permis d'identifier des mécanismes moléculaires et cellulaires qui participent à l'efficacité de l'infection virale (Bos et al. 2018), et nous a également permis de mieux comprendre les stratégies utilisées par ZIKV pour manipuler les réponses de l'hôte infecté à son avantage (Turpin et al. 2022). Ces études nous ont conduit à développer des outils moléculaires innovants pour la détection du ZIKV (Gadea et al. 2016), et à proposer un virus vivant atténué comme candidat vaccin dans le cadre de la lutte contre le virus Zika (Frumence et al. 2019).

La mise en place de clones viraux basés sur les séquences nucléotidiques originales des souches DENV-2 RUN-18 et DENV-2 DES-14 permettrait de caractériser les propriétés pathogéniques de ces souches de DENV-2 épidémiques circulant dans la zone SOOI par l'établissement d'études comparatives (Annexe 3). Les propriétés des clones viraux seraient étudiées à l'aide des modèles cellulaires développés au sein de notre laboratoire, en particulier les cellules A549 et Huh7 qui sont permissives et couramment utilisées pour l'étude de l'infection par DENV. Une attention particulière serait alors portée sur la capacité d'infection et de réplication de DENV-2 dans ces modèles cellulaires, ainsi que sur les interactions hôtes pathogènes et la mort apoptotique induite par ces clones viraux (**Figure 38**).

L'établissement de virus chimères possédant les protéines structurales de DENV-2 de la souche RUN-18 et les protéines non-structurales de la souche DES-14, et/ou inversement, permettrait de mieux comprendre les caractéristiques biologiques de ces protéines virales et leur implication au cours de l'infection. Par la suite, une analyse affinée pourrait être menée par mutagenèse dirigée afin d'identifier de potentiels déterminants viraux associés aux protéines structurales. Une attention particulière serait alors mise sur l'implication du résidu en position M-36 dans la pathogénicité de DENV-2 RUN-18. L'utilisation des clones viraux infectieux, RUN-18 et DES-14, nous permettrait d'évaluer l'impact de l'introduction d'un résidu isoleucine, alanine ou valine en position M-36 sur le comportement biologique des deux clones viraux, leur cycle de réplication, et leur pathogénicité. L'antigénicité de ses clones viraux pourrait également être étudié par l'utilisation de tests de séroneutralisation à partir de sérums de patient infecté par DENV-2 RUN-18 ou DENV-2 DES-14.



**Figure 38 : Clones moléculaire et virus chimériques DENV-2 RUN-18 et DES-14**

Illustration schématique des constructions moléculaires possibles par la méthode ISA : **(A.)** Les clones viraux RUN-18 (en bleu) et DES-14 (en rouge), **(B.)** Les virus chimériques possédant les protéines structurales de RUN-18 et non-structurales de DES-14, et/ou inversement, **(C.)** Les clones viraux RUN-18 et DES-14 modifiés par mutagenèse dirigée, possédant les mutations ponctuelles M-I36V ou M-V36I respectivement.

Ces études menées à l'aide de clones viraux et/ou de virus chimères auront pour objectif de renforcer nos connaissances sur les propriétés biologiques de DENV, et plus particulièrement des souches de DENV-2 du génotype Cosmopolitan qui circulent activement au sein de la région SOOI. Ces travaux complémentaires, en conditions infectieuses, apporteront des éléments de biologie fondamentale liés au virus et à son pouvoir pathogène et permettront d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourront faire l'objet de stratégies de lutte prophylactique, thérapeutique et vaccinale anti-DENV innovantes et efficaces.

# Partie VI : Références

- Aagaard K. M., Lahon A., Suter M. A., Arya R. P., Seferovic M. D., Vogt M. B., Hu M., Stossi F., Mancini M. A., Harris R. A., Kahr M., Eppes C., Rac M., Belfort M. A., Park C. S., Lacorazza D. & Rico-Hesse R. (2017)** Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. *Scientific Reports* 7(1): 41389.
- Acosta E. G., Castilla V. & Damonte E. B. (2009)** Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cellular Microbiology* 11(10): 1533–1549.
- Aebi M. (2013)** N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833(11): 2430–2437.
- Aguirre S., Maestre A. M., Pagni S., Patel J. R., Savage T., Gutman D., Maringer K., Bernal-Rubio D., Shabman R. S., Simon V., Rodriguez-Madoz J. R., Mulder L. C. F., Barber G. N. & Fernandez-Sesma A. (2012)** DENV Inhibits Type I IFN Production in Infected Cells by Cleaving Human STING. *PLoS Pathogens* 8(10): e1002934.
- Ajlan B. A., Alafif M. M., Alawi M. M., Akbar N. A., Aldigs E. K. & Madani T. A. (2019)** Assessment of the new World Health Organization's dengue classification for predicting severity of illness and level of healthcare required. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13(8): e0007144.
- Akira S., Uematsu S. & Takeuchi O. (2006)** Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124(4): 783–801.
- Alcon S., Talarmin A., Debruyne M., Falconar A., Deubel V. & Flamand M. (2002)** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 40(2): 376–381.
- Allison S. L., Schalich J., Stiasny K., Mandl C. W. & Heinz F. X. (2001)** Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. *Journal of Virology* 75(9): 4268–4275.
- Alvarez D. E., De Lella Ezcurra A. L., Fucito S. & Gamarnik A. V. (2005)** Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 339(2): 200–212.
- Alvarez D. E., Lodeiro M. F., Ludueña S. J., Pietrasanta L. I. & Gamarnik A. V. (2005)** Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *Journal of Virology* 79(11): 6631–6643.
- Amaral M. P., Apostolico J. D. 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* 38(20): 3653–3664.
- Ambrose R. L. & Mackenzie J. M. (2011)** West Nile Virus Differentially Modulates the Unfolded Protein Response To Facilitate Replication and Immune Evasion. *Journal of Virology* 85(6): 2723–2732.
- Annamalai A. S., Pattnaik A., Sahoo B. R., Muthukrishnan E., Natarajan S. K., Steffen D., Vu H. L. X., Delhon G., Osorio F. A., Petro T. M., Xiang S.-H. & Pattnaik A. K. (2017)** Zika Virus Encoding Nonglycosylated Envelope Protein Is Attenuated and Defective in Neuroinvasion. *Journal of Virology* 91(23): e01348-17.
- Apte-Sengupta S., Sirohi D. & Kuhn R. J. (2014)** Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Current Opinion in Virology* 9: 134–142.
- Arias C. F., Preugschat F. & Strauss J. H. (1993)** Dengue 2 Virus NS2B and NS3 Form a Stable Complex That Can Cleave NS3 within the Helicase Domain. *Virology* 193(2): 888–899.

- Armstrong P. M. & Rico-Hesse R. (2001)** Differential Susceptibility of *Aedes aegypti* to Infection by the American and Southeast Asian Genotypes of Dengue Type 2 Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 1(2): 159–168.
- Ashour J., Laurent-Rolle M., Shi P.-Y. & García-Sastre A. (2009)** NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *Journal of Virology* 83(11): 5408–5418.
- Atieh T., Baronti C., Lamballerie X. de & Nougairède A. (2016)** Simple reverse genetics systems for Asian and African Zika viruses. *Scientific Reports* 6(1): 39384.
- 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(1): 104–113.
- 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(1): 916.
- Aubry F., Nougairède A., Fabritus L. de, Querat G., Gould E. A. & Lamballerie X. de (2014)** Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. *Journal of General Virology* 95(11): 2462–2467.
- Avelino-Silva V. I., Alvarenga C., Abreu C., Tozetto-Mendoza T. R., Canto C. L. M. D., Manuli E. R., Mendes-Correa M. C., Sabino E. C., Figueiredo W. M., Segurado A. C. & Mayaud P. (2018)** Potential effect of Zika virus infection on human male fertility? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 60(0).  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652018005000507&lng=en&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652018005000507&lng=en&tIng=en)
- Azar S. R. & Weaver S. C. (2019)** Vector Competence: What Has Zika Virus Taught Us? *Viruses* 11(9): 867.
- Bailey C. C., Zhong G., Huang I.-C. & Farzan M. (2014)** IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. *Annual Review of Virology* 1(1): 261–283.
- 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(2): e02861-18.
- Bardina S. V., Bunduc P., Tripathi S., Duehr J., Frere J. J., Brown J. A., Nachbagauer R., Foster G. A., Krysztof D., Tortorella D., Stramer S. L., García-Sastre A., Krammer F. & Lim J. K. (2017)** Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. *Science* 356(6334): 175–180.
- Barnard T. R., Abram Q. H., Lin Q. F., Wang A. B. & Sagan S. M. (2021)** Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly. *Trends in Biochemical Sciences* 46(5): 378–390.
- Barrett A. D. T. & Higgs S. (2007)** Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *Annual Review of Entomology* 52(1): 209–229.
- Barrows N. J., Campos R. K., Powell S. T., Prasanth K. R., Schott-Lerner G., Soto-Acosta R., Galarza-Muñoz G., McGrath E. L., Urrabaz-Garza R., Gao J., Wu P., Menon R., Saade G., Fernandez-Salas I., Rossi S. L., Vasilakis N., Routh A., Bradrick S. S. & Garcia-Blanco M. A. (2016)** A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host & Microbe* 20(2): 259–270.

- Basset J., Burlaud-Gaillard J., Feher M., Roingeard P., Rey F. A. & Pardigon N. (2020)** A Molecular Determinant of West Nile Virus Secretion and Morphology as a Target for Viral Attenuation. *Journal of Virology* 94(12): e00086-20.
- Baz & Boivin (2019)** Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections. *Pharmaceuticals* 12(3): 101.
- Beasley D. W. C., Whiteman M. C., Zhang S., Huang C. Y.-H., Schneider B. S., Smith D. R., Gromowski G. D., Higgs S., Kinney R. M. & Barrett A. D. T. (2005)** Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. *Journal of Virology* 79(13): 8339–8347.
- Berger A. (2000)** Science commentary: Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 321(7258): 424–424.
- Besnard M., Eyrolle-Guignot D., Guillemette-Artur P., Lastère S., Bost-Bezeaud F., Marcelis L., Abadie V., Garel C., Moutard M.-L., Jouannic J.-M., Rozenberg F., Leparc-Goffart I. & Mallet H.-P. (2016)** Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. *Eurosurveillance* 21(13). <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.13.30181>
- Besnard M., Lastere S., Teissier A., Cao-Lormeau V. & Musso D. (2014)** Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 19(13): 20751.
- Bhatt S., Gething P. W., Brady O. J., Messina J. P., Farlow A. W., Moyes C. L., Drake J. M., Brownstein J. S., Hoen A. G., Sankoh O., Myers M. F., George D. B., Jaenisch T., Wint G. R. W., Simmons C. P., Scott T. W., Farrar J. J. & Hay S. I. (2013)** The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446): 504–507.
- BioRender (2019)** Interferon Pathway. <https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5df2a193dbd96b0080ce673c-interferon-pathway>
- Black W. C., Bennett K. E., Gorrochótegui-Escalante N., Barillas-Mury C. V., Fernández-Salas I., De Lourdes Muñoz M., Farfán-Alé J. A., Olson K. E. & Beaty B. J. (2002)** Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research* 33(4): 379–388.
- Bloom J. D., Romero P. A., Lu Z. & Arnold F. H. (2007)** Neutral genetic drift can alter promiscuous protein functions, potentially aiding functional evolution. *Biology Direct* 2(1): 17.
- Bonizzoni M., Gasperi G., Chen X. & James A. A. (2013)** The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology* 29(9): 460–468.
- Bos S., Viranaicken W., Frumence E., Li G., Desprès P., Zhao R. Y. & Gadea G. (2019)** The Envelope Residues E152/156/158 of Zika Virus Influence the Early Stages of Virus Infection in Human Cells. *Cells* 8(11): 1444.
- 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.
- Boulant S., Stanifer M. & Lozach P.-Y. (2015)** Dynamics of virus-receptor interactions in virus binding, signaling, and endocytosis. *Viruses* 7(6): 2794–2815.
- Bourtzis K., Dobson S. L., Xi Z., Rasgon J. L., Calvitti M., Moreira L. A., Bossin H. C., Moretti R., Baton L. A., Hughes G. L., Mavingui P. & Gilles J. R. L. (2014)** Harnessing mosquito–*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica* 132: S150–S163.

- Brady O. J., Gething P. W., Bhatt S., Messina J. P., Brownstein J. S., Hoen A. G., Moyes C. L., Farlow A. W., Scott T. W. & Hay S. I. (2012)** Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(8): e1760.
- Brandt W. E., Kliks S. C., Wahl L., Nisalak A. & Burke D. S. (1989)** Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Growth in Human Monocytes as a Risk Factor for Dengue Hemorrhagic Fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40(4): 444–451.
- 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(24): 2321–2334.
- Brault J.-B., Kudelko M., Vidalain P.-O., Tangy F., Desprès P. & Pardigon N. (2011)** The interaction of flavivirus M protein with light chain Tctex-1 of human dynein plays a role in late stages of virus replication. *Virology* 417(2): 369–378.
- Bressac B., Galvin K. M., Liang T. J., Isselbacher K. J., Wands J. R. & Ozturk M. (1990)** Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(5): 1973–1977.
- Briant L., Desprès P., Choumet V. & Missé D. (2014)** Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology* 464–465: 26–32.
- Brown E., Beaumont H., Lefteri D., Bentham M., Foster R., McKimmie C., Kalli A. & Griffin S. (2019)** Flavivirus membrane (M) proteins as potential ion channel antiviral targets. *Access Microbiology* 1(1A).  
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/acmi/10.1099/acmi.ac2019.po0333>
- Brown E., Lefteri D., Singh R., Thompson R., Maskell D., Beaumont H., Bentham M., Swinscoe G., Merits A., Donald C., Kohl A., Macdonald A., Ranson N., Foster R., McKimmie C. S., Kalli A. C. & Griffin S. (2021)** Inhibitors of the Small Membrane (M) Protein Viroporin Prevent Zika Virus Infection. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.03.11.435022>
- Bullard-Feibelman K. M., Govero J., Zhu Z., Salazar V., Veselinovic M., Diamond M. S. & Geiss B. J. (2017)** The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral Research* 137: 134–140.
- Calisher C. H., Karabatsos N., Dalrymple J. M., Shope R. E., Porterfield J. S., Westaway E. G. & Brandt W. E. (1989)** Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. *Journal of General Virology* 70(1): 37–43.
- Calvet G., Aguiar R. S., Melo A. S. O., Sampaio S. A., Filippis I. de, Fabri A., Araujo E. S. M., Sequeira P. C. de, Mendonça M. C. L. de, Oliveira L. de, Tschoeke D. A., Schrago C. G., Thompson F. L., Brasil P., Dos Santos F. B., Nogueira R. M. R., Tanuri A. & Filippis A. M. B. de (2016)** Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet. Infectious Diseases* 16(6): 653–660.
- 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. *Lancet (London, England)* 387(10027): 1531–1539.

## - RÉFÉRENCES -

- 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. *Emerging Infectious Diseases* 20(6): 1084–1086.
- Capeding M. R., Tran N. H., Hadinegoro S. R. S., Ismail H. I. H. M., Chotpitayasunondh T., Chua M. N., Luong C. Q., Rusmil K., Wirawan D. N., Nallusamy R., Pitisuttithum P., Thisyakorn U., Yoon I.-K., Van Der Vliet D., Langevin E., Laot T., Hutagalung Y., Frago C., Boaz M., Wartel T. A., Tornieporth N. G., Saville M. & Bouckennooghe A. (2014)** Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *The Lancet* 384(9951): 1358–1365.
- Carbaugh D. L., Baric R. S. & Lazear H. M. (2019)** Envelope Protein Glycosylation Mediates Zika Virus Pathogenesis. *Journal of Virology* 93(12): e00113-19.
- Carbaugh D. L. & Lazear H. M. (2020)** Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. *Journal of Virology* 94(11): e00104-20.
- Carmen Parquet M. del, Kumatori A., Hasebe F., Morita K. & Igarashi A. (2001)** West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. *FEBS Letters* 500(1–2): 17–24.
- Catteau A., Kalinina O., Wagner M.-C., Deubel V., Courageot M.-P. & Desprès P. (2003)** Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *Journal of General Virology* 84(10): 2781–2793.
- Catteau A., Roué G., Yuste V. J., Susin S. A. & Desprès P. (2003)** Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation. *Biochimie* 85(8): 789–793.
- Cattoretti G., Schiro R., Orazi A., Soligo D. & Colombo M. (1993)** Bone marrow stroma in humans: anti-nerve growth factor receptor antibodies selectively stain reticular cells in vivo and in vitro. *Blood* 81(7): 1726–1738.
- CDC (2019)** Zika virus - Symptoms. <https://www.cdc.gov/zika/symptoms/symptoms.html>
- CDC & PLOS (2016)** Council on foreign relations - The Zika virus. <https://www.cfr.org/background/zika-virus#:~:text=How%20is%20it%20transmitted%3F,limited%20to%20Florida%20and%20Hawaii.>
- Chambers T. J., Hahn C. S., Galler R. & Rice C. M. (1990)** FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. *Annual Review of Microbiology* 44(1): 649–688.
- Chambers T. J., Nestorowicz A., Amberg S. M. & Rice C. M. (1993)** Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *Journal of Virology* 67(11): 6797–6807.
- Chang D. C., Hoang L. T., Mohamed Naim A. N., Dong H., Schreiber M. J., Hibberd M. L., Tan M. J. A. & Shi P.-Y. (2016)** Evasion of early innate immune response by 2'- O -methylation of dengue genomic RNA. *Virology* 499: 259–266.
- Chang G.-J. J., Hunt A. R., Holmes D. A., Springfield T., Chiueh T.-S., Roehrig J. T. & Gubler D. J. (2003)** Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and japanese encephalitis virus. *Virology* 306(1): 170–180.
- Chang K. & Pastan I. (1996)** Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(1): 136–140.

- Chao L. H., Klein D. E., Schmidt A. G., Peña J. M. & Harrison S. C. (2014)** Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion. *eLife* 3: e04389.
- Chatel-Chaix L. & Bartenschlager R. (2014)** Dengue Virus- and Hepatitis C Virus-Induced Replication and Assembly Compartments: the Enemy Inside—Caught in the Web. *Journal of Virology* 88(11): 5907–5911.
- Chávez J. H., Silva J. R., Amarilla A. A. & Moraes Figueiredo L. T. (2010)** Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals* 38(6): 613–618.
- Che P., Tang H. & Li Q. (2013)** The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology* 446(1–2): 303–313.
- Chen L. H. & Wilson M. E. (2016)** Update on non-vector transmission of dengue: relevant studies with Zika and other flaviviruses. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines* 2(1): 15.
- Chen Q., Wu J., Ye Q., Ma F., Zhu Q., Wu Y., Shan C., Xie X., Li D., Zhan X., Li C., Li X.-F., Qin X., Zhao T., Wu H., Shi P.-Y., Man J. & Qin C.-F. (2019)** Erratum for Chen et al., “Treatment of Human Glioblastoma with a Live Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate.” *mBio* 10(2): e00433-19.
- Chen Y., Maguire T., Hileman R. E., Fromm J. R., Esko J. D., Linhardt R. J. & Marks R. M. (1997)** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine* 3(8): 866–871.
- Cheng Z., Li M., Dey R. & Chen Y. (2021)** Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives. *Journal of Hematology & Oncology* 14(1): 85.
- Cherrier M. V., Kaufmann B., Nybakken G. E., Lok S.-M., Warren J. T., Chen B. R., Nelson C. A., Kostyuchenko V. A., Holdaway H. A., Chipman P. R., Kuhn R. J., Diamond M. S., Rossmann M. G. & Fremont D. H. (2009)** Structural basis for the preferential recognition of immature flaviviruses by a fusion-loop antibody. *The EMBO Journal* 28(20): 3269–3276.
- Chiou S.-S., Fan Y.-C., Crill W. D., Chang R.-Y. & Chang G.-J. J. (2012)** Mutation analysis of the cross-reactive epitopes of Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein. *Journal of General Virology* 93(6): 1185–1192.
- Chong H. Y., Leow C. Y., Abdul Majeed A. B. & Leow C. H. (2019)** Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus Research* 274: 197770.
- Chouin-Carneiro T., Vega-Rua A., Vazeille M., Yebakima A., Girod R., Goindin D., Dupont-Rouzeyrol M., Lourenço-de-Oliveira R. & Failloux A.-B. (2016)** Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(3): e0004543.
- Ciota A. T., Bialosuknia S. M., Zink S. D., Brecher M., Ehrbar D. J., Morrisette M. N. & Kramer L. D. (2017)** Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. *Emerging Infectious Diseases* 23(7): 1110–1117.
- Clain, Haddad, Koishi, Sinigaglia, Rachidi, Desprès, Duarte Dos Santos, Guiraud, Jouvenet, & El Kalamouni (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. *International Journal of Molecular Sciences* 20(8): 1860.
- Clé M. (2020)** Étude du neurotropisme de deux arbovirus émergents : les virus Zika et Usutu.

**Clyde K., Kyle J. L. & Harris E. (2006)** Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology* 80(23): 11418–11431.

**Cochet A., Calba C., Jourdain F., Grard G., Durand G. A., Guinard A., Investigation team, Noël H., Paty M.-C. & Franke F. (2022)** Autochthonous dengue in mainland France, 2022: geographical extension and incidence increase. *Eurosurveillance* 27(44). <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.44.2200818>

**Conway M. J., Colpitts T. M. & Fikrig E. (2014)** Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annual Review of Virology* 1(1): 71–88.

**Cox B. D., Stanton R. A. & Schinazi R. F. (2015)** Predicting Zika virus structural biology: Challenges and opportunities for intervention. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 24(3–4): 118–126.

**Crabtree M. B., Kinney R. M. & Miller B. R. (2005)** Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: Construction and characterization of mutant viruses. *Archives of Virology* 150(4): 771–786.

**Cruz-Oliveira C., Freire J. M., Conceição T. M., Higa L. M., Castanho M. A. R. B. & Da Poian A. T. (2015)** Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews* 39(2): 155–170.

**Dai L., Song J., Lu X., Deng Y.-Q., Musyoki A. M., Cheng H., Zhang Y., Yuan Y., Song H., Haywood J., Xiao H., Yan J., Shi Y., Qin C.-F., Qi J. & Gao G. F. (2016)** Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host & Microbe* 19(5): 696–704.

**Dai L., Wang Q., Song H. & Gao G. F. (2018)** Zika Virus Envelope Protein and Antibody Complexes. In: Harris J. R. & Bhella D. (eds.) *Virus Protein and Nucleoprotein Complexes. Subcellular Biochemistry.* Springer Singapore, Singapore: 147–168. [http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8456-0\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8456-0_7)

**Dalrymple N. A., Cimica V. & Mackow E. R. (2015)** Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *mBio* 6(3): e00553-15.

**Davidson A., Slavinski S., Komoto K., Rakeman J. & Weiss D. (2016)** Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 65(28): 716–717.

**De Araújo J. M. G., Schatzmayr H. G., De Filippis A. M. B., Dos Santos F. B., Cardoso M. A., Britto C., Coelho J. M. C. O. & Nogueira R. M. R. (2009)** A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *Journal of Virological Methods* 155(1): 34–38.

**De Matos S. M. S., Hennigen A. F., Wachholz G. E., Rengel B. D., Schuler-Faccini L., Roehe P. M., Varela A. P. M. & Fraga L. R. (2021)** Possible Emergence of Zika Virus of African Lineage in Brazil and the Risk for New Outbreaks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11: 680025.

**Demaurex N. (2002)** pH Homeostasis of Cellular Organelles. *Physiology* 17(1): 1–5.

**Depraetere V. (2000)** “Eat me” signals of apoptotic bodies. *Nature Cell Biology* 2(6): E104–E104.

**Dey D., Poudyal S., Rehman A. & Hasan S. S. (2021)** Structural and biochemical insights into flavivirus proteins. *Virus Research* 296: 198343.

## - RÉFÉRENCES -

- Dias C. N. & Moraes D. F. C. (2014)** Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitology Research* 113(2): 565–592.
- Dick G. W. A., Kitchen S. F. & Haddow A. J. (1952)** Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 46(5): 509–520.
- Domingo E., García-Crespo C., Lobo-Vega R. & Perales C. (2021)** Mutation Rates, Mutation Frequencies, and Proofreading-Repair Activities in RNA Virus Genetics. *Viruses* 13(9): 1882.
- Domingo E. & Holland J. J. (1997)** RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL. *Annual Review of Microbiology* 51(1): 151–178.
- Domingo E. & Perales C. (2019)** Viral quasispecies. *PLOS Genetics* 15(10): e1008271.
- Dörner T. & Radbruch A. (2007)** Antibodies and B Cell Memory in Viral Immunity. *Immunity* 27(3): 384–392.
- Driouich J.-S., Moureau G., Lamballerie X. de & Nougairède A. (2019)** Reverse Genetics of RNA Viruses: ISA-Based Approach to Control Viral Population Diversity without Modifying Virus Phenotype. *Viruses* 11(7): 666.
- 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. *The New England Journal of Medicine* 360(24): 2536–2543.
- Duong V., Ong S., Leang R., Huy R., Ly S., Mounier U., Ou T., In S., Peng B., Ken S., Buchy P., Tarantola A., Horwood P. F. & Dussart P. (2017)** Low Circulation of Zika Virus, Cambodia, 2007–2016. *Emerging Infectious Diseases* 23(2): 296–299.
- Dupont-Rouzeyrol M., Biron A., O'Connor O., Huguon E. & Descloux E. (2016)** Infectious Zika viral particles in breastmilk. *The Lancet* 387(10023): 1051.
- Durham N. D., Agrawal A., Waltari E., Croote D., Zanini F., Fouch M., Davidson E., Smith O., Carabajal E., Pak J. E., Doranz B. J., Robinson M., Sanz A. M., Albornoz L. L., Rosso F., Einav S., Quake S. R., McCutcheon K. M. & Goo L. (2019)** Broadly neutralizing human antibodies against dengue virus identified by single B cell transcriptomics. *eLife* 8: e52384.
- ECDC (2023)** Dengue worldwide overview. <https://www.ecdc.europa.eu/en/dengue-monthly>
- ECDC. & EFSA. (2023)** Mosquito maps [internet]. <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>
- Edgil D., Polacek C. & Harris E. (2006)** Dengue Virus Utilizes a Novel Strategy for Translation Initiation When Cap-Dependent Translation Is Inhibited. *Journal of Virology* 80(6): 2976–2986.
- Egan M. J., McClintock M. A., Hollyer I. H. L., Elliott H. L. & Reck-Peterson S. L. (2015)** Cytoplasmic Dynein Is Required for the Spatial Organization of Protein Aggregates in Filamentous Fungi. *Cell Reports* 11(2): 201–209.
- Elmore S. (2007)** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495–516.
- Elong Ngono A. & Shresta S. (2018)** Immune Response to Dengue and Zika. *Annual Review of Immunology* 36(1): 279–308.
- Eurofins Biomnis (2016)** Dengue, Chikungunya et Zika.

## - RÉFÉRENCES -

- Farfan-Ale J. A., Bennett K. E., Fernandez-Salas I., Black W. C., Higgs S., Beaty B. J., Muñoz M. D. L. & Olson K. E. (2002)** Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67(1): 85–92.
- Faye Oumar, Freire C. C. M., Iamarino A., Faye Ousmane, De Oliveira J. V. C., Diallo M., Zanotto P. M. A. & Sall A. A. (2014)** Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(1): e2636.
- Fenner J. E., Starr R., Cornish A. L., Zhang J.-G., Metcalf D., Schreiber R. D., Sheehan K., Hilton D. J., Alexander W. S. & Hertzog P. J. (2006)** Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. *Nature Immunology* 7(1): 33–39.
- Ferlenghi I., Clarke M., Ruttan T., Allison S. L., Schalich J., Heinz F. X., Harrison S. C., Rey F. A. & Fuller S. D. (2001)** Molecular Organization of a Recombinant Subviral Particle from Tick-Borne Encephalitis Virus. *Molecular Cell* 7(3): 593–602.
- Fernandez E. & Diamond M. S. (2017)** Vaccination strategies against Zika virus. *Current Opinion in Virology* 23: 59–67.
- Fernandez-Garcia M.-D., Mazzon M., Jacobs M. & Amara A. (2009)** Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe* 5(4): 318–328.
- Fiacre L., Pagès N., Albina E., Richardson J., Lecollinet S. & Gonzalez G. (2020)** Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts. *International Journal of Molecular Sciences* 21(23): 9117.
- 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. *Journal of Virology* 87(13): 7585–7592.
- Filomatori C. V., Lodeiro M. F., Alvarez D. E., Samsa M. M., Pietrasanta L. & Gamarnik A. V. (2006)** A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes & Development* 20(16): 2238–2249.
- Fink S. L. & Cookson B. T. (2005)** Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* 73(4): 1907–1916.
- Fishburn A. T., Pham O. H., Kenaston M. W., Beesabathuni N. S. & Shah P. S. (2022)** Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein-Protein Interactions in Replication and Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology* 13: 847588.
- Flamand M., Megret F., Mathieu M., Lepault J., Rey F. A. & Deubel V. (1999)** Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion. *Journal of Virology* 73(7): 6104–6110.
- 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 Reports* 21(5): 1180–1190.
- Foy B. D., Kobylinski K. C., Chilson Foy J. L., Blitvich B. J., Travassos da Rosa A., Haddow A. D., Lanciotti R. S. & Tesh R. B. (2011)** Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases* 17(5): 880–882.
- Franz A., Kantor A., Passarelli A. & Clem R. (2015)** Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 7(7): 3741–3767.

## - RÉFÉRENCES -

- Freitas D. A., Souza-Santos R., Carvalho L. M. A., Barros W. B., Neves L. M., Brasil P. & Wakimoto M. D. (2020)** Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PLOS ONE* 15(12): e0242367.
- Fritz R., Stiasny K. & Heinz F. X. (2008)** Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion. *Journal of Cell Biology* 183(2): 353–361.
- 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- $\beta$  production and apoptosis induction. *Virology* 493: 217–226.
- Frumence E., Viranaicken W., Bos S., Alvarez-Martinez M.-T., Roche M., Arnaud D. J., Gadea G. & Desprès P. (2019)** A Chimeric Zika Virus between Viral Strains MR766 and BeH819015 Highlights a Role for E-glycan Loop in Antibody-mediated Virus Neutralization. *Vaccines* 7(2): 55.
- Furtado J. M., Espósito D. L., Klein T. M., Teixeira-Pinto T. & Da Fonseca B. A. (2016)** Uveitis Associated with Zika Virus Infection. *New England Journal of Medicine* 375(4): 394–396.
- 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.
- Garcez P. P., Loiola E. C., Madeiro Da Costa R., Higa L. M., Trindade P., Delvecchio R., Nascimento J. M., Brindeiro R., Tanuri A. & Rehen S. K. (2016)** Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* 352(6287): 816–818.
- García L. L., Padilla L. & Castaño J. C. (2017)** Inhibitors compounds of the flavivirus replication process. *Virology Journal* 14(1): 95.
- Gaunt M. W., Sall A. A., Lamballerie X. D., Falconar A. K. I., Dzhibanian T. I. & Gould E. A. (2001)** Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology* 82(8): 1867–1876.
- Gavas S., Quazi S. & Karpiński T. M. (2021)** Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale Research Letters* 16(1): 173.
- Gillespie L. K., Hoenen A., Morgan G. & Mackenzie J. M. (2010)** The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. *Journal of Virology* 84(20): 10438–10447.
- Giovanetti M., Pereira L. A., Santiago G. A., Fonseca V., Mendoza M. P. G., Oliveira C. de, Moraes L. de, Xavier J., Tosta S., Fristch H., Castro Barbosa E. de, Rodrigues E. S., Figueroa-Romero D., Padilla-Rojas C., Cáceres-Rey O., Mendonça A. F., Bruycker Nogueira F. de, Venancio da Cunha R., Filippis A. M. B. de, Freitas C., Peterka C. R. L., Albuquerque C. F. C. de, Franco L., Méndez Rico J. A., Muñoz-Jordán J. L., Lemes da Silva V. & Alcantara L. C. J. (2022)** Emergence of Dengue Virus Serotype 2 Cosmopolitan Genotype, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 28(8): 1725–1727.
- Giraldo M. I., Xia H., Aguilera-Aguirre L., Hage A., Van Tol S., Shan C., Xie X., Sturdevant G. L., Robertson S. J., McNally K. L., Meade-White K., Azar S. R., Rossi S. L., Maury W., Woodson M., Ramage H., Johnson J. R., Krogan N. J., Morais M. C., Best S. M., Shi P.-Y. & Rajsbaum R. (2020)** Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. *Nature* 585(7825): 414–419.
- Girard M., Nelson C. B., Picot V. & Gubler D. J. (2020)** Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine* 38(24): 3989–3994.

## - RÉFÉRENCES -

- Goncalvez A. P., Escalante A. A., Pujol F. H., Ludert J. E., Tovar D., Salas R. A. & Liprandi F. (2002)** Diversity and Evolution of the Envelope Gene of Dengue Virus Type 1. *Virology* 303(1): 110–119.
- Goo L., DeMaso C. R., Pelc R. S., Ledgerwood J. E., Graham B. S., Kuhn R. J. & Pierson T. C. (2018)** The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. *Virology* 515: 191–202.
- Goo L., Dowd K. A., Smith A. R. Y., Pelc R. S., DeMaso C. R. & Pierson T. C. (2016)** Zika Virus Is Not Uniquely Stable at Physiological Temperatures Compared to Other Flaviviruses. *mBio* 7(5): e01396-16.
- Goo L., VanBlargan L. A., Dowd K. A., Diamond M. S. & Pierson T. C. (2017)** A single mutation in the envelope protein modulates flavivirus antigenicity, stability, and pathogenesis. *PLOS Pathogens* 13(2): e1006178.
- Goto A., Yoshii K., Obara M., Ueki T., Mizutani T., Kariwa H. & Takashima I. (2005)** Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. *Vaccine* 23(23): 3043–3052.
- Gould E. A., De Lamballerie X., Zanotto P. M. de A. & Holmes E. C. (2003)** Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the Genus Flavivirus. *Advances in Virus Research*. Elsevier: 277–314. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006535270359008X>
- Gould E., Pettersson J., Higgs S., Charrel R. & Lamballerie X. de (2017)** Emerging arboviruses: Why today? *One Health* 4: 1–13.
- Gould E. & Solomon T. (2008)** Pathogenic flaviviruses. *The Lancet* 371(9611): 500–509.
- Graham H. (1902)** DENGUE: A STUDY OF ITS MODE OF PROPAGATION AND PATHOLOGY.
- Gregory C. J., Oduyebo T., Brault A. C., Brooks J. T., Chung K.-W., Hills S., Kuehnert M. J., Mead P., Meaney-Delman D., Rabe I., Staples E. & Petersen L. R. (2017)** Modes of Transmission of Zika Virus. *The Journal of Infectious Diseases* 216(suppl\_10): S875–S883.
- Grove J. & Marsh M. (2011)** The cell biology of receptor-mediated virus entry. *Journal of Cell Biology* 195(7): 1071–1082.
- Gubler D. J. (1998)** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11(3): 480–496.
- Gubler D. J. (2011)** Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Tropical Medicine and Health* 39(4SUPPLEMENT): S3–S11.
- Gubler D. J. (2002)** The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Archives of Medical Research* 33(4): 330–342.
- Gubler D. J. & Clark G. G. (1995)** Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases* 1(2): 55–57.
- Guirakhoo F., Heinz F. X., Mandl C. W., Holzmann H. & Kunz C. (1991)** Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *Journal of General Virology* 72(6): 1323–1329.
- Gulland A. (2016)** Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ* i657.
- Guo C., Zhou Z., Wen Z., Liu Y., Zeng C., Xiao D., Ou M., Han Y., Huang S., Liu D., Ye X., Zou X., Wu J., Wang H., Zeng E. Y., Jing C. & Yang G. (2017)** Global Epidemiology of Dengue

## - RÉFÉRENCES -

Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 317.

**Guzman A. & Istúriz R. E. (2010)** Update on the global spread of dengue. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36: S40–S42.

**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. *Archives of Virology* 158(7): 1445–1459.

**Guzman M. G. & Harris E. (2015)** Dengue. *The Lancet* 385(9966): 453–465.

**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(9): 925.

**Hacker K., White L. & Silva A. M. de (2009)** N-Linked glycans on dengue viruses grown in mammalian and insect cells. *Journal of General Virology* 90(9): 2097–2106.

**Hackett B. A. & Cherry S. (2018)** Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(16): 4246–4251.

**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(10): 2316.

**Haddow A. D., Schuh A. J., Yasuda C. Y., Kasper M. R., Heang V., Huy R., Guzman H., Tesh R. B. & Weaver S. C. (2012)** Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(2): e1477.

**Hafsia S., Haramboure M., Wilkinson D. A., Baldet T., Yemadje-Menudier L., Vincent M., Tran A., Atyame C. & Mavingui P. (2022)** Overview of dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16(7): e0010547.

**Hahn C. S., Dalrymple J. M., Strauss J. H. & Rice C. M. (1987)** Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(7): 2019–2023.

**Halstead S. B. (1988)** Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science* 239(4839): 476–481.

**Halstead S. B. (1992)** The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *World Health Statistics Quarterly. Rapport Trimestriel De Statistiques Sanitaires Mondiales* 45(2–3): 292–298.

**Halstead S. B. & Thomas S. J. (2010)** Japanese Encephalitis: New Options for Active Immunization. *Clinical Infectious Diseases* 50(8): 1155–1164.

**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(17): 8880–8896.

**Hammon W. McD., Rundnick A. & Sather G. E. (1960)** Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand. *Science* 131(3407): 1102–1103.

**Hanna S. L., Pierson T. C., Sanchez M. D., Ahmed A. A., Murtadha M. M. & Doms R. W. (2005)**

## - RÉFÉRENCES -

N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity. *Journal of Virology* 79(21): 13262–13274.

**Hardy J. L., Houk E. J., Kramer L. D. & Reeves W. C. (1983)** Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. *Annual Review of Entomology* 28(1): 229–262.

**Hasan S. S., Miller A., Sapparapu G., Fernandez E., Klose T., Long F., Fokine A., Porta J. C., Jiang W., Diamond M. S., Crowe J. E., Kuhn R. J. & Rossmann M. G. (2017)** A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. *Nature Communications* 8(1): 14722.

**Hebert D. N., Foellmer B. & Helenius A. (1995)** Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* 81(3): 425–433.

**Heinz F. X. & Allison S. L. (2000)** Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Advances in Virus Research*. Elsevier: 231–269.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352700550052>

**Heinz F. X. & Stiasny K. (2012)** Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30(29): 4301–4306.

**Henderson E. A., Tam C. C., Cheng L. W., Ngono A. E., Nguyen A.-V., Shresta S., McGee M., Padgett H., Grill L. K. & Martchenko Shilman M. (2020)** Investigation of the immunogenicity of Zika glycan loop. *Virology Journal* 17(1): 43.

**Hidari K. I. P. J. & Suzuki T. (2011)** Dengue virus receptor. *Tropical Medicine and Health* 39(4SUPPLEMENT): S37–S43.

**Hoën B., Schaub B., Funk A. L., Ardillon V., Boullard M., Cabié A., Callier C., Carles G., Cassadou S., Césaire R., Douine M., Herrmann-Storck C., Kadhel P., Laouénan C., Madec Y., Monthieux A., Nacher M., Najioullah F., Rousset D., Ryan C., Schepers K., Stegmann-Planchard S., Tressières B., Voluménie J.-L., Yassinguez S., Janky E. & Fontanet A. (2018)** Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. *The New England Journal of Medicine* 378(11): 985–994.

**Holmes E. & Twiddy S. (2003)** The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution* 3(1): 19–28.

**Hotta S. (1952)** Experimental Studies on Dengue: I. Isolation, Identification and Modification of the Virus. *Journal of Infectious Diseases* 90(1): 1–9.

**Hsieh S.-C., Wu Y.-C., Zou G., Nerurkar V. R., Shi P.-Y. & Wang W.-K. (2014)** Highly Conserved Residues in the Helical Domain of Dengue Virus Type 1 Precursor Membrane Protein Are Involved in Assembly, Precursor Membrane (prM) Protein Cleavage, and Entry. *Journal of Biological Chemistry* 289(48): 33149–33160.

**Hsieh S.-C., Zou G., Tsai W.-Y., Qing M., Chang G.-J., Shi P.-Y. & Wang W.-K. (2011)** The C-terminal helical domain of dengue virus precursor membrane protein is involved in virus assembly and entry. *Virology* 410(1): 170–180.

**Huang Z., Zhang Yuxuan, Li H., Zhu J., Song W., Chen K., Zhang Yanjun & Lou Y. (2023)** Vaccine development for mosquito-borne viral diseases. *Frontiers in Immunology* 14: 1161149.

**Hubálek Z., Rudolf I. & Nowotny N. (2014)** Arboviruses Pathogenic for Domestic and Wild Animals. *Advances in Virus Research*. Elsevier: 201–275.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128001721000057>

**Inagaki T., Taniguchi S., Kawai Y., Maeki T., Nakayama E., Tajima S., Takeyama H., Lim C. K. & Saijo M. (2021)** Leu-to-Phe substitution at prM146 decreases the growth ability of Zika virus and partially reduces its pathogenicity in mice. *Scientific Reports* 11(1): 19635.

- Ishak H., Takegami T., Kamimura K. & Funada H. (2001)** Comparative Sequences of Two Type 1 Dengue Virus Strains Possessing Different Growth Characteristics *In Vitro*. *Microbiology and Immunology* 45(4): 327–331.
- Ivashkiv L. B. & Donlin L. T. (2014)** Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology* 14(1): 36–49.
- Iwasaki A. (2020a)** Adaptive Immunity. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5f178ad877526300ae487d8f-adaptive-immunity>
- Iwasaki A. (2020b)** Innate Immune System: Cellular Locations of Pattern Recognition Receptors. <https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5f982500e0ed5600a3c307b0-innate-immune-system-cellular-locations-of-pattern-recogniti>
- Iwasaki A. (2020c)** TLR Signaling Pathway. <https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5fcacfadacbb9100a83169de-tlr-signaling-pathway>
- Jindadamrongwech S., Thepparit C. & Smith D. R. (2004)** Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Archives of Virology* 149(5): 915–927.
- Johnson A. J., Guirakhoo F. & Roehrig J. T. (1994)** The Envelope Glycoproteins of Dengue 1 and Dengue 2 Viruses Grown in Mosquito Cells Differ in Their Utilization of Potential Glycosylation Sites. *Virology* 203(2): 241–249.
- Johnston J. A., Illing M. E. & Kopito R. R. (2002)** Cytoplasmic dynein/dynactin mediates the assembly of aggresomes. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 53(1): 26–38.
- Junjhon J., Edwards T. J., Utaipat U., Bowman V. D., Holdaway H. A., Zhang W., Keelapang P., Puttikhunt C., Perera R., Chipman P. R., Kasinrerk W., Malasit P., Kuhn R. J. & Sittisombut N. (2010)** Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *Journal of Virology* 84(16): 8353–8358.
- Kaid C., Goulart E., Caires-Júnior L. C., Araujo B. H. S., Soares-Schanoski A., Bueno H. M. S., Telles-Silva K. A., Astray R. M., Assoni A. F., Júnior A. F. R., Ventini D. C., Puglia A. L. P., Gomes R. P., Zatz M. & Okamoto O. K. (2018)** Zika Virus Selectively Kills Aggressive Human Embryonal CNS Tumor Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Cancer Research* 78(12): 3363–3374.
- Kakumani P. K., Ponia S. S., S R. K., Sood V., Chinnappan M., Banerjea A. C., Medigeshi G. R., Malhotra P., Mukherjee S. K. & Bhatnagar R. K. (2013)** Role of RNA Interference (RNAi) in Dengue Virus Replication and Identification of NS4B as an RNAi Suppressor. *Journal of Virology* 87(16): 8870–8883.
- Kakumani P. K., Rajgokul K. S., Ponia S. S., Kaur I., Mahanty S., Medigeshi G. R., Banerjea A. C., Chopra A. P., Malhotra P., Mukherjee S. K. & Bhatnagar R. K. (2015)** Dengue NS3, an RNAi suppressor, modulates the human miRNA pathways through its interacting partner. *Biochemical Journal* 471(1): 89–99.
- Kalayanarooj S. (2011)** Clinical Manifestations and Management of Dengue/DHF/DSS. *Tropical Medicine and Health* 39(4SUPPLEMENT): S83–S87.
- Kamiyama N., Soma R., Hidano S., Watanabe K., Umekita H., Fukuda C., Noguchi K., Gendo Y., Ozaki T., Sonoda A., Sachi N., Runtuwene L. R., Miura Y., Matsubara E., Tajima S., Takasaki T., Eshita Y. & Kobayashi T. (2017)** Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. *Antiviral Research* 146: 1–11.
- Kato H., Takeuchi O., Mikamo-Satoh E., Hirai R., Kawai T., Matsushita K., Hiiragi A., Dermody T. S., Fujita T. & Akira S. (2008)** Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic

## - RÉFÉRENCES -

acids by retinoic acid-inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of Experimental Medicine* 205(7): 1601–1610.

**Kaufmann B. & Rossmann M. G. (2011)** Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and Infection* 13(1): 1–9.

**Kawai T. & Akira S. (2006)** Antiviral Signaling Through Pattern Recognition Receptors. *Journal of Biochemistry* 141(2): 137–145.

**Kawasaki T. & Kawai T. (2014)** Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology* 5. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00461/abstract>

**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(14): 6719–6728.

**Kim S., Li B. & Linhardt R. (2017)** Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. *Pharmaceuticals* 10(4): 44.

**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(8): 1151–1162.

**King N. J. C., Getts D. R., Getts M. T., Rana S., Shrestha B. & Kesson A. M. (2007)** Immunopathology of flavivirus infections. *Immunology & Cell Biology* 85(1): 33–42.

**Klema V., Padmanabhan R. & Choi K. (2015)** Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses* 7(8): 4640–4656.

**Kong K.-F., Delroux K., Wang X., Qian F., Arjona A., Malawista S. E., Fikrig E. & Montgomery R. R. (2008)** Dysregulation of TLR3 Impairs the Innate Immune Response to West Nile Virus in the Elderly. *Journal of Virology* 82(15): 7613–7623.

**Konishi E. & Mason P. W. (1993)** Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *Journal of Virology* 67(3): 1672–1675.

**Kostyuchenko V. A., Lim E. X. Y., Zhang S., Fibriansah G., Ng T.-S., Ooi J. S. G., Shi J. & Lok S.-M. (2016)** Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* 533(7603): 425–428.

**Kostyuchenko V. A., Zhang Q., Tan J. L., Ng T.-S. & Lok S.-M. (2013)** Immature and Mature Dengue Serotype 1 Virus Structures Provide Insight into the Maturation Process. *Journal of Virology* 87(13): 7700–7707.

**Kramer L. D. & Ebel G. D. (2003)** Dynamics of Flavivirus Infection in Mosquitoes. *Advances in Virus Research*. Elsevier: 187–232. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352703600060>

**Kuhn R. J., Zhang W., Rossmann M. G., Pletnev S. V., Corver J., Lenches E., Jones C. T., Mukhopadhyay S., Chipman P. R., Strauss E. G., Baker T. S. & Strauss J. H. (2002)** Structure of Dengue Virus. *Cell* 108(5): 717–725.

**Kulkarni R. (2020)** Antibody-Dependent Enhancement of Viral Infections. In: Bramhachari P. V. (ed.) *Dynamics of Immune Activation in Viral Diseases*. Springer Singapore, Singapore: 9–41. [http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-1045-8\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-1045-8_2)

**Kumar H., Kawai T. & Akira S. (2011)** Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology* 30(1): 16–34.

## - RÉFÉRENCES -

- Kuno G. & Chang G.-J. J. (2005)** Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. *Clinical Microbiology Reviews* 18(4): 608–637.
- Kuno G., Chang G.-J. J., Tsuchiya K. R., Karabatsos N. & Cropp C. B. (1998)** Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *Journal of Virology* 72(1): 73–83.
- Kuno G., Mackenzie J., Junglen S., Hubálek Z., Plyusnin A. & Gubler D. (2017)** Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? *Viruses* 9(7): 185.
- Lai Z., Zhou T., Zhou J., Liu S., Xu Y., Gu J., Yan G. & Chen X.-G. (2020)** Vertical transmission of zika virus in *Aedes albopictus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 14(10): e0008776.
- Lambrechts L., Chevillon C., Albright R. G., Thaisomboonsuk B., Richardson J. H., Jarman R. G. & Scott T. W. (2009)** Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evolutionary Biology* 9(1): 160.
- Lanciotti R. S., Lewis J. G., Gubler D. J. & Trent D. W. (1994)** Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *Journal of General Virology* 75(1): 65–75.
- Laureti M., Narayanan D., Rodriguez-Andres J., Fazakerley J. K. & Kedzierski L. (2018)** Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in Immunology* 9: 2180.
- Lee C. M., Xie X., Zou J., Li S.-H., Lee M. Y. Q., Dong H., Qin C.-F., Kang C. & Shi P.-Y. (2015)** Determinants of Dengue Virus NS4A Protein Oligomerization. *Journal of Virology* 89(12): 6171–6183.
- Lee E., Leang S. K., Davidson A. & Lobigs M. (2010)** Both E Protein Glycans Adversely Affect Dengue Virus Infectivity but Are Beneficial for Virion Release. *Journal of Virology* 84(10): 5171–5180.
- Lei Y., Yu H., Dong Y., Yang J., Ye W., Wang Y., Chen W., Jia Z., Xu Z., Li Z. & Zhang F. (2015)** Characterization of N-Glycan Structures on the Surface of Mature Dengue 2 Virus Derived from Insect Cells. *PLOS ONE* 10(7): e0132122.
- Lequime S., Paul R. E. & Lambrechts L. (2016)** Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLOS Pathogens* 12(5): e1005548.
- Levine A. J. & Oren M. (2009)** The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer* 9(10): 749–758.
- 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(1): 120–126.
- Li G., Bos S., Tsetsarkin K., Pletnev A., Desprès P., Gadea G. & Zhao R. (2019)** The Roles of prM-E Proteins in Historical and Epidemic Zika Virus-mediated Infection and Neurocytotoxicity. *Viruses* 11(2): 157.
- Li L., Lok S.-M., Yu I.-M., Zhang Y., Kuhn R. J., Chen J. & Rossmann M. G. (2008)** The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science* 319(5871): 1830–1834.
- 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. *Frontiers in Microbiology* 11: 242.
- Li Y., Li Q., Wong Y. L., Liew L. S. Y. & Kang C. (2015)** Membrane topology of NS2B of dengue

## - RÉFÉRENCES -

virus revealed by NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848(10): 2244–2252.

**Liao M. & Kielian M. (2005)** Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. *The Journal of Cell Biology* 171(1): 111–120.

**Lin R.-J., Yu H.-P., Chang B.-L., Tang W.-C., Liao C.-L. & Lin Y.-L. (2009)** Distinct Antiviral Roles for Human 2',5'-Oligoadenylate Synthetase Family Members against Dengue Virus Infection. *The Journal of Immunology* 183(12): 8035–8043.

**Lin Y., Wen K., Guo Y., Qiu L., Pan Y., Yu L., Di B. & Chen Y. (2015)** [Mapping of the B Cell Neutralizing Epitopes on ED III of Envelope Protein from Dengue Virus]. *Bing Du Xue Bao = Chinese Journal of Virology* 31(6): 665–673.

**Lin Y.-J., Peng J.-G. & Wu S.-C. (2010)** Characterization of the GXXXG motif in the first transmembrane segment of Japanese encephalitis virus precursor membrane (prM) protein. *Journal of Biomedical Science* 17(1): 39.

**Lin Y.-J. & Wu S.-C. (2005)** Histidine at Residue 99 and the Transmembrane Region of the Precursor Membrane prM Protein Are Important for the prM-E Heterodimeric Complex Formation of Japanese Encephalitis Virus. *Journal of Virology* 79(13): 8535–8544.

**Lindenbach B. D., Thiel H.-J. & Rice C. M. (2007)** Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology*. 1101–1151.

**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. *International Journal of Biological Sciences* 14(9): 1099–1108.

**Loo Y.-M. & Gale M. (2011)** Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* 34(5): 680–692.

**Lorenz I. C., Allison S. L., Heinz F. X. & Helenius A. (2002)** Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Virology* 76(11): 5480–5491.

**Louis N., Eveleigh C. & Graham F. L. (1997)** Cloning and Sequencing of the Cellular-Viral Junctions from the Human Adenovirus Type 5 Transformed 293 Cell Line. *Virology* 233(2): 423–429.

**Lu W., Cheng F., Yan W., Li X., Yao X., Song W., Liu M., Shen X., Jiang H., Chen J., Li J. & Huang J. (2017)** Selective targeting p53WT lung cancer cells harboring homozygous p53 Arg72 by an inhibitor of CypA. *Oncogene* 36(33): 4719–4731.

**Luckheeram R. V., Zhou R., Verma A. D. & Xia B. (2012)** CD4<sup>+</sup> T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 1–12.

**Ma L., Jones C. T., Groesch T. D., Kuhn R. J. & Post C. B. (2004)** Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(10): 3414–3419.

**Mackenzie J. M. & Westaway E. G. (2001)** Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear To Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and along the Secretory Pathway, Respectively. *Journal of Virology* 75(22): 10787–10799.

**MacNamara F. N. (1954)** Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 48(2):

139–145.

**Mairiang D., Zhang H., Sodja A., Murali T., Suriyaphol P., Malasit P., Limjindaporn T. & Finley R. L. (2013)** Identification of New Protein Interactions between Dengue Fever Virus and Its Hosts, Human and Mosquito. *PLoS ONE* 8(1): e53535.

**Malavige G. N. & Ogg G. S. (2017)** Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology* 151(3): 261–269.

**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(13): 1916–1925.

**Mandl C. W., Guirakhoo F., Holzmann H., Heinz F. X. & Kunz C. (1989)** Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *Journal of Virology* 63(2): 564–571.

**Marcombe S., Mathieu R. B., Pocquet N., Riaz M.-A., Poupardin R., Sélior S., Darriet F., Reynaud S., Yébakima A., Corbel V., David J.-P. & Chandre F. (2012)** Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. *PLoS ONE* 7(2): e30989.

**McElroy K. L., Tssetsarkin K. A., Vanlandingham D. L. & Higgs S. (2006)** Role of the yellow fever virus structural protein genes in viral dissemination from the *Aedes aegypti* mosquito midgut. *Journal of General Virology* 87(10): 2993–3001.

**McSherry J. (1993)** The Cambridge World History of Human Disease. In: Kiple K. F. (ed.). Cambridge University Press: 660–664.  
[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781139053518A105/type/book\\_part](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781139053518A105/type/book_part)

**Meertens L., Carnec X., Lecoin M. P., Ramdasi R., Guivel-Benhassine F., Lew E., Lemke G., Schwartz O. & Amara A. (2012)** The TIM and TAM Families of Phosphatidylinositol Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host & Microbe* 12(4): 544–557.

**Meier P., Finch A. & Evan G. (2000)** Apoptosis in development. *Nature* 407(6805): 796–801.

**Melian E. B., Edmonds J. H., Nagasaki T. K., Hinzman E., Floden N. & Khromykh A. A. (2013)** West Nile virus NS2A protein facilitates virus-induced apoptosis independently of interferon response. *Journal of General Virology* 94(2): 308–313.

**Mellor P. S. (2000)** Replication of Arboviruses in Insect Vectors. *Journal of Comparative Pathology* 123(4): 231–247.

**Mendes Y. S., Alves N. S., Souza T. L. F., Sousa I. P., Bianconi M. L., Bernardi R. C., Pascutti P. G., Silva J. L., Gomes A. M. O. & Oliveira A. C. (2012)** The Structural Dynamics of the Flavivirus Fusion Peptide–Membrane Interaction. *PLoS ONE* 7(10): e47596.

**Mercer J., Schelhaas M. & Helenius A. (2010)** Virus Entry by Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* 79(1): 803–833.

**Miller J. L., deWet B. J. M., Martinez-Pomares L., Radcliffe C. M., Dwek R. A., Rudd P. M. & Gordon S. (2008)** The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathogens* 4(2): e17.

**Miller S., Kastner S., Krijnse-Locker J., Bühler S. & Bartenschlager R. (2007)** The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner. *Journal of Biological Chemistry* 282(12): 8873–8882.

- Min K. A., Maharjan P., Ham S. & Shin M. C. (2018)** Pro-apoptotic peptides-based cancer therapies: challenges and strategies to enhance therapeutic efficacy. *Archives of Pharmacal Research* 41(6): 594–616.
- Minhas A. M., Nayab A., Iyer S., Narmeen M., Fatima K., Khan M. S. & Constantin J. (2017)** Association of Zika Virus with Myocarditis, Heart Failure, and Arrhythmias: A Literature Review. *Cureus*. <http://www.cureus.com/articles/7515-association-of-zika-virus-with-myocarditis-heart-failure-and-arrhythmias-a-literature-review>
- Minor P. D. (2015)** Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology* 479–480: 379–392.
- Modis Y., Ogata S., Clements D. & Harrison S. C. (2004)** Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427(6972): 313–319.
- Modis Y., Ogata S., Clements D. & Harrison S. C. (2005)** Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology* 79(2): 1223–1231.
- Monath T. P. (2005)** Yellow fever vaccine. *Expert Review of Vaccines* 4(4): 553–574.
- Montecillo-Aguado M. R., Montes-Gómez A. E., García-Cordero J., Corzo-Gómez J., Vivanco-Cid H., Mellado-Sánchez G., Muñoz-Medina J. E., Gutiérrez-Castañeda B., Santos-Argumedo L., González-Bonilla C. & Cedillo-Barrón L. (2019)** Cross-Reaction, Enhancement, and Neutralization Activity of Dengue Virus Antibodies against Zika Virus: A Study in the Mexican Population. *Journal of Immunology Research* 2019: 1–14.
- Moon S. L., Anderson J. R., Kumagai Y., Wilusz C. J., Akira S., Khromykh A. A. & Wilusz J. (2012)** A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability. *RNA* 18(11): 2029–2040.
- Morchang A., Lee R. C. H., Yenchitsomanus P., Sreekanth G. P., Noisakran S., Chu J. J. H. & Limjindaporn T. (2017)** RNAi screen reveals a role of SPHK2 in dengue virus-mediated apoptosis in hepatic cell lines. *PLOS ONE* 12(11): e0188121.
- Morello A., Sadelain M. & Adusumilli P. S. (2016)** Mesothelin-Targeted CARs: Driving T Cells to Solid Tumors. *Cancer Discovery* 6(2): 133–146.
- Morrison J., Aguirre S. & Fernandez-Sesma A. (2012)** Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. *Viruses* 4(3): 397–413.
- Mossenta M., Marchese S., Poggianella M., Slon Campos J. L. & Burrone O. R. (2017)** Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 492(4): 579–586.
- Moureau G., Cook S., Lemey P., Nougairede A., Forrester N. L., Khasnatinov M., Charrel R. N., Firth A. E., Gould E. A. & De Lamballerie X. (2015)** New Insights into Flavivirus Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences. *PLOS ONE* 10(2): e0117849.
- Moureau G., Temmam S., Gonzalez J. P., Charrel R. N., Grard G. & De Lamballerie X. (2007)** A Real-Time RT-PCR Method for the Universal Detection and Identification of Flaviviruses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7(4): 467–478.
- Mukhopadhyay S., Kuhn R. J. & Rossmann M. G. (2005a)** A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology* 3(1): 13–22.
- 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 Research*

98(2): 192–208.

**Muñoz L. S., Parra B., Pardo C. A., & Neuroviruses Emerging in the Americas Study (2017)** Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. *The Journal of Infectious Diseases* 216(suppl\_10): S897–S905.

**Muñoz-Jordán J. L., Laurent-Rolle M., Ashour J., Martínez-Sobrido L., Ashok M., Lipkin W. I. & García-Sastre A. (2005)** Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *Journal of Virology* 79(13): 8004–8013.

**Muñoz-Jordán J. L., Sánchez-Burgos G. G., Laurent-Rolle M. & García-Sastre A. (2003)** Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(24): 14333–14338.

**Murphy B. R. & Whitehead S. S. (2011)** Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Annual Review of Immunology* 29(1): 587–619.

**Murray C. L., Jones C. T. & Rice C. M. (2008)** Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 6(9): 699–708.

**Murray P. R., Rosenthal K. S. & Pfaller M. A. (2017)** Recognition of Pathogen-Associated Molecular Patterns (Virus, Fungi, Protozoa).

**Musso D., Bossin H., Mallet H. P., Besnard M., Brout J., Baudouin L., Levi J. E., Sabino E. C., Ghawche F., Lanteri M. C. & Baud D. (2018)** Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak. *The Lancet Infectious Diseases* 18(5): e172–e182.

**Musso D. & Desprès P. (2020)** Serological Diagnosis of Flavivirus-Associated Human Infections. *Diagnostics* 10(5): 302.

**Musso D. & Gubler D. J. (2016)** Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews* 29(3): 487–524.

**Musso D., Ko A. I. & Baud D. (2019)** Zika Virus Infection — After the Pandemic. *New England Journal of Medicine* 381(15): 1444–1457.

**Musso D., Nilles E. J. & Cao-Lormeau V.-M. (2014)** Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20(10): O595-596.

**Musso D., Roche C., Robin E., Nhan T., Teissier A. & Cao-Lormeau V.-M. (2015)** Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging Infectious Diseases* 21(2): 359–361.

**Navarro-Sanchez E., Altmeyer R., Amara A., Schwartz O., Fieschi F., Virelizier J., Arenzana-Seisdedos F. & Desprès P. (2003)** Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO reports* 4(7): 723–728.

**Ng W., Soto-Acosta R., Bradrick S., Garcia-Blanco M. & Ooi E. (2017)** The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses* 9(6): 137.

**Nguyen S. M., Antony K. M., Dudley D. M., Kohn S., Simmons H. A., Wolfe B., Salamat M. S., Teixeira L. B. C., Wiepz G. J., Thoong T. H., Aliota M. T., Weiler A. M., Barry G. L., Weisgrau K. L., Vosler L. J., Mohns M. S., Breitbach M. E., Stewart L. M., Rasheed M. N., Newman C. M., Graham M. E., Wieben O. E., Turski P. A., Johnson K. M., Post J., Hayes J. M., Schultz-Darken N., Schotzko M. L., Eudailey J. A., Permar S. R., Rakasz E. G., Mohr E. L., Capuano S., Tarantal A. F., Osorio J. E., O'Connor S. L., Friedrich T. C., O'Connor D. H. & Golos T. G. (2017)** Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. *PLOS Pathogens* 13(5): e1006378.

- Nicholls C. M. R., Sevvana M. & Kuhn R. J. (2020)** Structure-guided paradigm shifts in flavivirus assembly and maturation mechanisms. *Advances in Virus Research*. Elsevier: 33–83. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352720300397>
- Norrby E. (2007)** Yellow fever and Max Theiler: the only Nobel Prize for a virus vaccine. *The Journal of Experimental Medicine* 204(12): 2779–2784.
- Nybakken G. E., Oliphant T., Johnson S., Burke S., Diamond M. S. & Fremont D. H. (2005)** Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature* 437(7059): 764–769.
- Oehler E., Watrin L., Larre P., Leparac-Goffart I., Lastere S., Valour F., Baudouin L., Mallet H., Musso D. & Ghawche F. (2014)** Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 19(9): 20720.
- Ogire E., Diaz O., Vidalain P.-O., Lotteau V., Desprès P. & Roche M. (2021)** Instability of the NS1 Glycoprotein from La Reunion 2018 Dengue 2 Virus (Cosmopolitan-1 Genotype) in Huh7 Cells Is Due to Lysine Residues on Positions 272 and 324. *International Journal of Molecular Sciences* 22(4): 1951.
- Ogire E., El-Kalamouni C., Desprès P. & Roche M. (2023)** Stability of Dengue 2 Nonstructural Glycoprotein 1 (NS1) Is Affected by the Nature of Basic Residue at Position NS1-324. *Current Issues in Molecular Biology* 45(2): 1644–1654.
- Okamoto T., Suzuki T., Kusakabe S., Tokunaga M., Hirano J., Miyata Y. & Matsuura Y. (2017)** Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses* 9(9): 243.
- Okba N. M. A., Widjaja I., Van Dieren B., Aebischer A., Van Amerongen G., De Waal L., Stittelaar K. J., Schipper D., Martina B., Van Den Brand J. M. A., Beer M., Bosch B.-J. & Haagmans B. L. (2020)** Particulate multivalent presentation of the receptor binding domain induces protective immune responses against MERS-CoV. *Emerging Microbes & Infections* 9(1): 1080–1091.
- Oliva C. F., Benedict M. Q., Collins C. M., Baldet T., Bellini R., Bossin H., Bouyer J., Corbel V., Facchinelli L., Fouque F., Geier M., Michaelakis A., Roiz D., Simard F., Tur C. & Gouagna L.-C. (2021)** Sterile Insect Technique (SIT) against Aedes Species Mosquitoes: A Roadmap and Good Practice Framework for Designing, Implementing and Evaluating Pilot Field Trials. *Insects* 12(3): 191.
- Oliva C. F., Jacquet M., Gilles J., Lemperiere G., Maquart P.-O., Quilici S., Schooneman F., Vreysen M. J. B. & Boyer S. (2012)** The Sterile Insect Technique for Controlling Populations of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: Mating Vigour of Sterilized Males. *PLoS ONE* 7(11): e49414.
- Oliveira E. R. A., De Alencastro R. B. & Horta B. A. C. (2017)** New insights into flavivirus biology: the influence of pH over interactions between prM and E proteins. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 31(11): 1009–1019.
- Oliveira Melo A. S., Malinger G., Ximenes R., Szejnfeld P. O., Alves Sampaio S. & Bispo de Filippis A. M. (2016)** Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 47(1): 6–7.
- OMS, UNICEF, PNUD & Banque mondiale (2013)** Guide pour la prise en charge clinique de la dengue. Organisation mondiale de la Santé, Genève. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/85736>
- Ona S. (2020)** Apoptosis Extrinsic and Intrinsic Pathways. <https://app.biorender.com/biorender->

## - RÉFÉRENCES -

templates/figures/all/t-5f234f4fdc8c0a00ae43ec57-apoptosis-extrinsic-and-intrinsic-pathways

**Ona S. (2021)** ZIKV Infection Cycle. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-60773400286ffd00aa38926f-zikv-infection-cycle>

**Op De Beeck A., Rouillé Y., Caron M., Duvet S. & Dubuisson J. (2004)** The transmembrane domains of the prM and E proteins of yellow fever virus are endoplasmic reticulum localization signals. *Journal of Virology* 78(22): 12591–12602.

**Osorio J. E., Wallace D. & Stinchcomb D. T. (2016)** A recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate based on a dengue virus serotype 2 backbone. *Expert Review of Vaccines* 15(4): 497–508.

**Packard R. M. (2016)** The Fielding H. Garrison Lecture: “Break-Bone” Fever in Philadelphia, 1780: Reflections on the History of Disease. *Bulletin of the History of Medicine* 90(2): 193–221.

**Pan P., Zhang Q., Liu W., Wang W., Lao Z., Zhang Wei, Shen M., Wan P., Xiao F., Liu F., Zhang Wen, Tan Q., Liu X., Wu K., Liu Y., Li G. & Wu J. (2019)** Dengue Virus M Protein Promotes NLRP3 Inflammasome Activation To Induce Vascular Leakage in Mice. *Journal of Virology* 93(21): e00996-19.

**Pan Y., Cheng A., Wang M., Yin Z. & Jia R. (2021)** The Dual Regulation of Apoptosis by Flavivirus. *Frontiers in Microbiology* 12: 654494.

**Papageorgiou L., Loukatou S., Koumandou V. L., Makalowski W., Megalooikonomou V., Vlachakis D. & Kossida S. (2014)** Structural models for the design of novel antiviral agents against Greek Goat Encephalitis. *PeerJ* 2: e664.

**Paranjape S. M. & Harris E. (2007)** Y Box-binding Protein-1 Binds to the Dengue Virus 3'-Untranslated Region and Mediates Antiviral Effects. *Journal of Biological Chemistry* 282(42): 30497–30508.

**Pardi N., Hogan M. J., Pelc R. S., Muramatsu H., Andersen H., DeMaso C. R., Dowd K. A., Sutherland L. L., Scearce 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(7644): 248–251.

**Pascalis H., Biscornet L., Toty C., Hafsia S., Roche M., Desprès P., Atyame Nten C., Bibi J., Louange M., Gedeon J. & Mavingui P. (2020)** Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Epidemic Strains from Reunion Island and the Seychelles. *Microbiology Resource Announcements* 9(4): e01443-19.

**Pascalis H., Turpin J., Roche M., Krejbich P., Gadea G., Nten C. A., Desprès P. & Mavingui P. (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* 5(4): e01455.

**Pates H. & Curtis C. (2005)** MOSQUITO BEHAVIOR AND VECTOR CONTROL. *Annual Review of Entomology* 50(1): 53–70.

**Peng J.-G. & Wu S.-C. (2014)** Glutamic Acid at Residue 125 of the prM Helix Domain Interacts with Positively Charged Amino Acids in E Protein Domain II for Japanese Encephalitis Virus-Like-Particle Production. *Journal of Virology* 88(15): 8386–8396.

**Perera R., Khaliq M. & Kuhn R. J. (2008)** Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for

## - RÉFÉRENCES -

antiviral drug design. *Antiviral Research* 80(1): 11–22.

**Perera R. & Kuhn R. J. (2008)** Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology* 11(4): 369–377.

**Perera-Lecoin M., Meertens L., Carnec X. & Amara A. (2013)** Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses* 6(1): 69–88.

**Pestka S., Krause C. D. & Walter M. R. (2004)** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202(1): 8–32.

**Petersen L. R., Jamieson D. J., Powers A. M. & Honein M. A. (2016)** Zika Virus. *New England Journal of Medicine* 374(16): 1552–1563.

**Pichlmair A., Schulz O., Tan C. P., Näslund T. I., Liljeström P., Weber F. & Reis E Sousa C. (2006)** RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates. *Science* 314(5801): 997–1001.

**Pieper K., Grimbacher B. & Eibel H. (2013)** B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(4): 959–971.

**Pierson T. C. & Diamond M. S. (2013)** *Fields virology*. Sixth edition. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

**Pierson T. C. & Diamond M. S. (2008)** Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10: e12.

**Pierson T. C. & Diamond M. S. (2020)** The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature Microbiology* 5(6): 796–812.

**Pierson T. C. & Kielian M. (2013)** Flaviviruses: braking the entering. *Current Opinion in Virology* 3(1): 3–12.

**Pierson T. C. & Kuhn R. J. (2012)** Capturing a virus while it catches its breath. *Structure (London, England: 1993)* 20(2): 200–202.

**Plevka P., Battisti A. J., Junjhon J., Winkler D. C., Holdaway H. A., Keelapang P., Sittisombut N., Kuhn R. J., Steven A. C. & Rossmann M. G. (2011)** Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. *EMBO reports* 12(6): 602–606.

**Plotkin S. (2014)** History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(34): 12283–12287.

**Plowright W., Parker J. & Peirce M. A. (1969)** African Swine Fever Virus in Ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from Animal Burrows in Tanzania. *Nature* 221(5185): 1071–1073.

**Poland G. A., Kennedy R. B., Ovsyannikova I. G., Palacios R., Ho P. L. & Kalil J. (2018)** Development of vaccines against Zika virus. *The Lancet Infectious Diseases* 18(7): e211–e219.

**Poland G. A., Ovsyannikova I. G. & Kennedy R. B. (2019)** Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clinic Proceedings* 94(12): 2572–2586.

**Pomar L., Vouga M., Lambert V., Pomar C., Hcini N., Jolivet A., Benoist G., Rousset D., Matheus S., Malinger G., Panchaud A., Carles G. & Baud D. (2018)** Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: prospective cohort study in French Guiana. *BMJ (Clinical research ed.)* 363: k4431.

**Post P. R., Santos C. N. D., Carvalho R., Cruz A. C. R., Ricet C. M. & Galler R. (1992)**

## - RÉFÉRENCES -

Heterogeneity in envelope protein sequence and N-Linked glycosylation among yellow fever virus vaccine strains. *Virology* 188(1): 160–167.

**Prisant N., Bujan L., Benichou H., Hayot P.-H., Pavili L., Lurel S., Herrmann C., Janky E. & Joguet G. (2016)** Zika virus in the female genital tract. *The Lancet Infectious Diseases* 16(9): 1000–1001.

**Pryor M. J., Azzola L., Wright P. J. & Davidson A. D. (2004)** Histidine 39 in the dengue virus type 2 M protein has an important role in virus assembly. *Journal of General Virology* 85(12): 3627–3636.

**Putnak R., Rothwell S. W. & La Russa V. F. (1996)** Dengue-2 Virus Infection of Human Bone Marrow: Characterization of Dengue-2 Antigen-Positive Stromal Cells. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54(5): 503–510.

**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): 5.

**Rabe I. B., Staples J. E., Villanueva J., Hummel K. B., Johnson J. A., Rose L., MTS, Hills S., Wasley A., Fischer M. & Powers A. M. (2016)** Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 65(21): 543–546.

**Rastogi M., Sharma N. & Singh S. K. (2016)** Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal* 13(1): 131.

**Ratajczak W., Niedźwiedzka-Rystwej P., Tokarz-Deptuła B. & Deptuła W. (2018)** Immunological memory cells. *Central European Journal of Immunology* 43(2): 194–203.

**Rathore A. P. S. & St. John A. L. (2020)** Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. *Frontiers in Immunology* 11: 334.

**Rey F. A., Heinz F. X., Mandl C., Kunz C. & Harrison S. C. (1995)** The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375(6529): 291–298.

**Rey F. A., Stiasny K. & Heinz F. X. (2017)** Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. *Current Opinion in Virology* 24: 132–139.

**Rey F. A., Stiasny K., Vaney M., 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(2): 206–224.

**Reyes-del Valle J., Chávez-Salinas S., Medina F. & Del Angel R. M. (2005)** Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells. *Journal of Virology* 79(8): 4557–4567.

**Reyes-del Valle J., Salas-Benito J., Soto-Acosta R. & Del Angel R. M. (2014)** Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. *Current Tropical Medicine Reports* 1(1): 36–43.

**Richter M. K. S., Da Silva Voorham J. M., Torres Pedraza S., Hoornweg T. E., Van De Pol D. P. I., Rodenhuis-Zybert I. A., Wilschut J. & Smit J. M. (2014)** Immature Dengue Virus Is Infectious in Human Immature Dendritic Cells via Interaction with the Receptor Molecule DC-SIGN. *PLoS ONE* 9(6): e98785.

**Rico-Hesse R. (1990)** Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174(2): 479–493.

**Riedl W., Acharya D., Lee J.-H., Liu G., Serman T., Chiang C., Chan Y. K., Diamond M. S. &**

## - RÉFÉRENCES -

- Gack M. U. (2019)** Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity. *Cell Host & Microbe* 26(4): 493-503.e6.
- Ripon Md. K. H., Lee H., Dash R., Choi H. J., Oktaviani D. F., Moon I. S. & Haque Md. N. (2020)** N-acetyl-D-glucosamine kinase binds dynein light chain roadblock 1 and promotes protein aggregate clearance. *Cell Death & Disease* 11(8): 619.
- Rivera L., Biswal S., Sáez-Llorens X., Reynales H., López-Medina E., Borja-Tabora C., Bravo L., Sirivichayakul C., Kosalaraksa P., Martinez Vargas L., Yu D., Watanaveeradej V., Espinoza F., Dietze R., Fernando L., Wickramasinghe P., Duarte Moreira Jr E., Fernando A. D., Gunasekera D., Luz K., Venânciada Cunha R., Rauscher M., Zent O., Liu M., Hoffman E., LeFevre I., Tricou V., Wallace D., Alera M. & Borkowski A. (2022)** Three-year Efficacy and Safety of Takeda's Dengue Vaccine Candidate (TAK-003). *Clinical Infectious Diseases* 75(1): 107–117.
- Robinson C. L., Chong A. C. N., Ashbrook A. W., Jeng G., Jin J., Chen H., Tang E. I., Martin L. A., Kim R. S., Kenyon R. M., Do E., Luna J. M., Saeed M., Zeltser L., Ralph H., Dudley V. L., Goldstein M., Rice C. M., Cheng C. Y., Seandel M. & Chen S. (2018)** Male germ cells support long-term propagation of Zika virus. *Nature Communications* 9(1): 2090.
- Roby J. A., Hall R. A., Setoh Y. X. & Khromykh A. A. (2015)** Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *Journal of General Virology* 96(7): 1551–1569.
- Rodenhuis-Zybert I. A., Van Der Schaar H. M., Da Silva Voorham J. M., Van Der Ende-Metselaar H., Lei H.-Y., Wilschut J. & Smit J. M. (2010)** Immature Dengue Virus: A Veiled Pathogen? *PLoS Pathogens* 6(1): e1000718.
- Rosen L. (1989)** Disease Exacerbation Caused by Sequential Dengue Infections: Myth or Reality? *Clinical Infectious Diseases* 11(Supplement\_4): S840–S842.
- Rosso F., Sanz A. M., Parra-Lara L. G., Moncada P. A., Vélez J. D. & Caicedo L. A. (2019)** Dengue Virus Infection in Solid Organ Transplant Recipients: A Case Series and Literature Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 101(6): 1226–1231.
- Routhu N. K., Lehoux S. D., Rouse E. A., Bidokhti M. R. M., Giron L. B., Anzurez A., Reid S. P., Abdel-Mohsen M., Cummings R. D. & Byrareddy S. N. (2019)** Glycosylation of Zika Virus is Important in Host–Virus Interaction and Pathogenic Potential. *International Journal of Molecular Sciences* 20(20): 5206.
- Ruchusatsawat K., Wongjaroen P., Posanacharoen A., Rodriguez-Barraquer I., Sangkitporn S., Cummings D. A. T. & Salje H. (2019)** Long-term circulation of Zika virus in Thailand: an observational study. *The Lancet Infectious Diseases* 19(4): 439–446.
- Ruddock L. W. & Molinari M. (2006)** N-glycan processing in ER quality control. *Journal of Cell Science* 119(21): 4373–4380.
- Rush B. (1951)** An account of the bilious remitting fever. *The American Journal of Medicine* 11(5): 546–550.
- Sabin A. B. (1952)** Research on Dengue during World War II 1. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1(1): 30–50.
- Saeedi B. J. & Geiss B. J. (2013)** Regulation of flavivirus RNA synthesis and capping. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 4(6): 723–735.
- Samanta J. (2015)** Dengue and its effects on liver. *World Journal of Clinical Cases* 3(2): 125.
- Samsa M. M., Mondotte J. A., Iglesias N. G., Assunção-Miranda I., Barbosa-Lima G., Da Poian**

## - RÉFÉRENCES -

- A. T., Bozza P. T. & Gamarnik A. V. (2009)** Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation. *PLoS Pathogens* 5(10): e1000632.
- Sanchez David R. Y., Combredet C., Najburg V., Millot G. A., Beauclair G., Schwikowski B., Léger T., Camadro J.-M., Jacob Y., Bellalou J., Jouvenet N., Tangy F. & Komarova A. V. (2019)** LGP2 binds to PACT to regulate RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Science Signaling* 12(601): eaar3993.
- Santé Publique France (2021)** Surveillance de la dengue à La Réunion. Point au 7 décembre 2021. <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2021/surveillance-de-la-dengue-a-la-reunion.-point-au-7-decembre-2021>
- Sapparapu G., Fernandez E., Kose N., Bin Cao, Fox J. M., Bombardi R. G., Zhao H., Nelson C. A., Bryan A. L., Barnes T., Davidson E., Mysorekar I. U., Fremont D. H., Doranz B. J., Diamond M. S. & Crowe J. E. (2016)** Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature* 540(7633): 443–447.
- Scaramozzino N., Crance J. M., Jouan A., DeBriel D. A., Stoll F. & Garin D. (2001)** Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 39(5): 1922–1927.
- Schaffner F. & Mathis A. (2014)** Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *The Lancet Infectious Diseases* 14(12): 1271–1280.
- Schalich J., Allison S. L., Stiasny K., Mandl C. W., Kunz C. & Heinz F. X. (1996)** Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *Journal of Virology* 70(7): 4549–4557.
- Schmid M. A., Diamond M. S. & Harris E. (2014)** Dendritic Cells in Dengue Virus Infection: Targets of Virus Replication and Mediators of Immunity. *Frontiers in Immunology* 5. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00647/abstract>
- Schmid M. A. & Harris E. (2014)** Monocyte Recruitment to the Dermis and Differentiation to Dendritic Cells Increases the Targets for Dengue Virus Replication. *PLoS Pathogens* 10(12): e1004541.
- Schneider W. M., Chevillotte M. D. & Rice C. M. (2014)** Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology* 32(1): 513–545.
- 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(24): 13486–13500.
- Schoggins J. W. (2014)** Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 6: 40–46.
- Schoggins J. W. & Rice C. M. (2011)** Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology* 1(6): 519–525.
- Schuessler A., Funk A., Lazear H. M., Cooper D. A., Torres S., Daffis S., Jha B. K., Kumagai Y., Takeuchi O., Hertzog P., Silverman R., Akira S., Barton D. J., Diamond M. S. & Khromykh A. A. (2012)** West Nile Virus Noncoding Subgenomic RNA Contributes to Viral Evasion of the Type I Interferon-Mediated Antiviral Response. *Journal of Virology* 86(10): 5708–5718.
- Schuffenecker I., Iteman I., Michault A., Murri S., Frangeul L., Vaney M.-C., Lavenir R., Pardigon N., Reynes J.-M., Pettinelli F., Biscornet L., Diancourt L., Michel S., Duquerroy S.,**

**Guigon G., Frenkiel M.-P., Bréhin A.-C., Cubito N., Desprès P., Kunst F., Rey F. A., Zeller H. & Brisse S. (2006)** Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLoS Medicine* 3(7): e263.

**Schuler-Faccini L., Ribeiro E. M., Feitosa I. M. L., Horovitz D. D. G., Cavalcanti D. P., Pessoa A., Doriqui M. J. R., Neri J. I., Neto J. M. de P., Wanderley H. Y. C., Cernach M., El-Husny A. S., Pone M. V. S., Srao C. L. C., Sanseverino M. T. V., & Brazilian Medical Genetics Society– Zika Embryopathy Task Force (2016)** Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 65(3): 59–62.

**Schwartz D. (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* 6(4): 81.

**Seligman S. J. & Bucher D. J. (2003)** The importance of being outer: consequences of the distinction between the outer and inner surfaces of flavivirus glycoprotein E. *Trends in Microbiology* 11(3): 108–110.

**Seth R. B., Sun L., Ea C.-K. & Chen Z. J. (2005)** Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell* 122(5): 669–682.

**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(9): 1169-1177.e3.

**Shan C., Xie X., Luo H., Muruato A. E., Liu Y., Wakamiya M., La J.-H., Chung J. M., Weaver S. C., Wang T. & Shi P.-Y. (2019)** Maternal vaccination and protective immunity against Zika virus vertical transmission. *Nature Communications* 10(1): 5677.

**Shi P.-Y. (2014)** Unraveling a Flavivirus Enigma. *Science* 343(6173): 849–850.

**Shiryaev S. A., Chernov A. V., Aleshin A. E., Shiryaeva T. N. & Strongin A. Y. (2009)** NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *Journal of General Virology* 90(9): 2081–2085.

**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., & ICTV Report Consortium (2017)** ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *Journal of General Virology* 98(1): 2–3.

**Simon H.-U., Haj-Yehia A. & Levi-Schaffer F. (2000)** Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *APOPTOSIS* 5(5): 415–418.

**Simonin Y., Van Riel D., Van De Perre P., Rockx B. & Salinas S. (2017)** Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(9): e0005821.

**Sirohi D., Chen Z., Sun L., Klose T., Pierson T. C., Rossmann M. G. & Kuhn R. J. (2016)** The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* 352(6284): 467–470.

**Sirohi D. & Kuhn R. J. (2017)** Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *The Journal of Infectious Diseases* 216(suppl\_10): S935–S944.

**Smit J., Moesker B., Rodenhuis-Zybert I. & Wilschut J. (2011)** Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses* 3(2): 160–171.

**Song B.-H., Yun S.-I., Woolley M. & Lee Y.-M. (2017)** Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology* 308: 50–64.

## - RÉFÉRENCES -

- Sotcheff S. & Routh A. (2020)** Understanding Flavivirus Capsid Protein Functions: The Tip of the Iceberg. *Pathogens* 9(1): 42.
- 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., Santos R. R. dos & Soares M. B. P. (2016)** Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Scientific Reports* 6(1): 39775.
- Sridhar S., Luedtke A., Langevin E., Zhu M., Bonaparte M., Machabert T., Savarino S., Zambrano B., Moureau A., Khromava A., Moodie Z., Westling T., Mascareñas C., Frago C., Cortés M., Chansinghakul D., Noriega F., Bouckenoghe A., Chen J., Ng S.-P., Gilbert P. B., Gurunathan S. & DiazGranados C. A. (2018)** Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *New England Journal of Medicine* 379(4): 327–340.
- St. John A. L., Abraham S. N. & Gubler D. J. (2013)** Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 11(6): 420–426.
- Stadler K., Allison S. L., Schalich J. & Heinz F. X. (1997)** Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology* 71(11): 8475–8481.
- Stanaway J. D., Shepard D. S., Undurraga E. A., Halasa Y. A., Coffeng L. E., Brady O. J., Hay S. I., Bedi N., Bensenor I. M., Castañeda-Orjuela C. A., Chuang T.-W., Gibney K. B., Memish Z. A., Rafay A., Ukwaja K. N., Yonemoto N. & Murray C. J. L. (2016)** The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases* 16(6): 712–723.
- Stassen L., Armitage C., Van Der Heide D., Beagley K. & Frentiu F. (2018)** Zika Virus in the Male Reproductive Tract. *Viruses* 10(4): 198.
- Steichen S. D., Caldorera-Moore M. & Peppas N. A. (2013)** A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 48(3): 416–427.
- Stiasny K., Fritz R., Pangerl K. & Heinz F. X. (2011)** Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids* 41(5): 1159–1163.
- Stiasny K. & Heinz F. X. (2006)** Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology* 87(10): 2755–2766.
- Su K. Y. & Balasubramaniam V. R. M. T. (2019)** Zika Virus as Oncolytic Therapy for Brain Cancer: Myth or Reality? *Frontiers in Microbiology* 10: 2715.
- Sui L., Zhao Yinghua, Wang W., Chi H., Tian T., Wu P., Zhang J., Zhao Yicheng, Wei Z.-K., Hou Z., Zhou G., Wang G., Wang Z. & Liu Q. (2023)** Flavivirus prM interacts with MDA5 and MAVS to inhibit RLR antiviral signaling. *Cell & Bioscience* 13(1): 9.
- Sun L., Wu J., Du F., Chen X. & Chen Z. J. (2013)** Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science* 339(6121): 786–791.
- 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(9): e1007299.
- Tabas I. & Ron D. (2011)** Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology* 13(3): 184–190.

## - RÉFÉRENCES -

- Tait S. W. G. & Green D. R. (2013)** Mitochondrial Regulation of Cell Death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(9): a008706–a008706.
- Tambyah P. A., Koay E. S. C., Poon M. L. M., Lin R. V. T. P. & Ong B. K. C. (2008)** Dengue Hemorrhagic Fever Transmitted by Blood Transfusion. *New England Journal of Medicine* 359(14): 1526–1527.
- 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. *Nature Communications* 11(1): 895.
- Tay M. Y. F. & Vasudevan S. G. (2018)** The Transactions of NS3 and NS5 in Flaviviral RNA Replication. In: Hilgenfeld R. & Vasudevan S. G. (eds.) *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore, Singapore: 147–163. [http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8727-1\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8727-1_11)
- Teo C. S. H. & Chu J. J. H. (2014)** Cellular Vimentin Regulates Construction of Dengue Virus Replication Complexes through Interaction with NS4A Protein. *Journal of Virology* 88(4): 1897–1913.
- Thomas S. J. & Yoon I.-K. (2019)** A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 15(10): 2295–2314.
- 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(8): 1251–1262.
- Tisoncik J. R., Korth M. J., Simmons C. P., Farrar J., Martin T. R. & Katze M. G. (2012)** Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(1): 16–32.
- Tomar P. P. S., Krugliak M., Singh A. & Arkin I. T. (2022)** Zika M—A Potential Viroporin: Mutational Study and Drug Repurposing. *Biomedicines* 10(3): 641.
- Torres-Flores J. M., Reyes-Sandoval A. & Salazar M. I. (2022)** Dengue Vaccines: An Update. *BioDrugs* 36(3): 325–336.
- Touret F., Baronti C., Goethals O., Van Loock M., Lamballerie X. de & Querat G. (2019)** Phylogenetically based establishment of a dengue virus panel, representing all available genotypes, as a tool in dengue drug discovery. *Antiviral Research* 168: 109–113.
- Trent D. W., Lanciotti R. S. & Gubler D. J. (1997)** Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *Journal of General Virology* 78(9): 2279–2284.
- Troupin A., Shirley D., Londono-Renteria B., Watson A. M., McHale C., Hall A., Hartstone-Rose A., Klimstra W. B., Gomez G. & Colpitts T. M. (2016)** A Role for Human Skin Mast Cells in Dengue Virus Infection and Systemic Spread. *The Journal of Immunology* 197(11): 4382–4391.
- Tsai Y.-T., Chang S.-Y., Lee C.-N. & Kao C.-L. (2009)** Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication *in vitro*. *Cellular Microbiology* 11(4): 604–615.
- Tsetsarkin K. A., Vanlandingham D. L., McGee C. E. & Higgs S. (2007)** A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathogens* 3(12): e201.
- Tummers B. & Green D. R. (2017)** Caspase-8: regulating life and death. *Immunological Reviews* 277(1): 76–89.
- Turmel J. M., Abgueguen P., Hubert B., Vandamme Y. M., Maquart M., Le Guillou-Guillemette H. & Leparac-Goffart I. (2016)** Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the

## - RÉFÉRENCES -

semen. *The Lancet* 387(10037): 2501.

**Turner M. D., Nedjai B., Hurst T. & Pennington D. J. (2014)** Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843(11): 2563–2582.

**Turpin J., El Safadi D., Lebeau G., Krejbich M., Chatelain C., Desprès P., Viranaïcken W. & Krejbich-Trotot P. (2022)** Apoptosis during ZIKA Virus Infection: Too Soon or Too Late? *International Journal of Molecular Sciences* 23(3): 1287.

**Twiddy S. S., Farrar J. J., Vinh Chau N., Wills B., Gould E. A., Gritsun T., Lloyd G. & Holmes E. C. (2002)** Phylogenetic Relationships and Differential Selection Pressures among Genotypes of Dengue-2 Virus. *Virology* 298(1): 63–72.

**Umareddy I., Chao A., Sampath A., Gu F. & Vasudevan S. G. (2006)** Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *Journal of General Virology* 87(9): 2605–2614.

**Vairo F., Mboera L. E. G., De Nardo P., Oriyo N. M., Meschi S., Rumisha S. F., Colavita F., Mhina A., Carletti F., Mwakapeje E., Capobianchi M. R., Castilletti C., Di Caro A., Nicastrì E., Malecela M. N. & Ippolito G. (2016)** Clinical, Virologic, and Epidemiologic Characteristics of Dengue Outbreak, Dar es Salaam, Tanzania, 2014. *Emerging Infectious Diseases* 22(5): 895–899.

**Valentine M. J., Murdock C. C. & Kelly P. J. (2019)** Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasites & Vectors* 12(1): 463.

**Van Den Elsen K., Quek J. P. & Luo D. (2021)** Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses* 13(6): 956.

**Van Der Schaar H. M., Rust M. J., Chen C., Van Der Ende-Metselaar H., Wilschut J., Zhuang X. & Smit J. M. (2008)** Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells. *PLoS Pathogens* 4(12): e1000244.

**Van Vlack E. R. & Seeliger J. C. (2018)** Acid Trip: Zika Virus Goes Off-Pathway during pH-Triggered Membrane Fusion. *ACS Central Science* 4(11): 1454–1456.

**Vanwalscappel B., Haddad J. G., Almokdad R., Decotter J., Gadea G. & Desprès P. (2020)** Zika M Oligopeptide ZAMP Confers Cell Death-Promoting Capability to a Soluble Tumor-Associated Antigen through Caspase-3/7 Activation. *International Journal of Molecular Sciences* 21(24): 9578.

**Vanwalscappel B., Tada T. & Landau N. R. (2018)** Toll-like receptor agonist R848 blocks Zika virus replication by inducing the antiviral protein viperin. *Virology* 522: 199–208.

**Vaughn D. W., Green S., Kalayanarooj S., Innis B. L., Nimmannitya S., Suntayakorn S., Endy T. P., Raengsakulrach B., Rothman A. L., Ennis F. A. & Nisalak A. (2000)** Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. *The Journal of Infectious Diseases* 181(1): 2–9.

**Venter M. (2018)** Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. *Current Opinion in Virology* 28: 74–84.

**Ventura C. V. & Ventura L. O. (2018)** Ophthalmologic Manifestations Associated With Zika Virus Infection. *Pediatrics* 141(Supplement\_2): S161–S166.

**Viglietta M., Bellone R., Blisnick A. A. & Failloux A.-B. (2021)** Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Frontiers in Microbiology* 12: 773211.

- Villar L., Dayan G. H., Arredondo-García J. L., Rivera D. M., Cunha R., Deseda C., Reynales H., Costa M. S., Morales-Ramírez J. O., Carrasquilla G., Rey L. C., Dietze R., Luz K., Rivas E., Miranda Montoya M. C., Cortés Supelano M., Zambrano B., Langevin E., Boaz M., Tornieporth N., Saville M. & Noriega F. (2015)** Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *New England Journal of Medicine* 372(2): 113–123.
- Vincent M., Paty M. C., Gerardin P., Balleydier E., Etienne A., Daoudi J., Thouillot F., Jaffar-Bandjee M.-C., Clinical Investigation Team, Laboratory Network, on behalf of the study collaborators Réseau de médecins sentinelles de la Réunion & Menudier L. (2023)** From dengue outbreaks to endemicity: Reunion Island, France, 2018 to 2021. *Eurosurveillance* 28(29). <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.29.2200769>
- Vitetta E. S., Berton M. T., Burger C., Kepron M., Lee W. T. & Yin X. M. (1991)** Memory B and T Cells. *Annual Review of Immunology* 9(1): 193–217.
- Volk D. E., May F. J., Gandham S. H. A., Anderson A., Von Lindern J. J., Beasley D. W. C., Barrett A. D. T. & Gorenstein D. G. (2009)** Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. *Virology* 394(1): 12–18.
- Wahaab A., Liu K., Hameed M., Anwar M. N., Kang L., Li C., Ma X., Wajid A., Yang Y., Khan U. H., Wei J., Li B., Shao D., Qiu Y. & Ma Z. (2021)** Identification of Cleavage Sites Proteolytically Processed by NS2B-NS3 Protease in Polyprotein of Japanese Encephalitis Virus. *Pathogens* 10(2): 102.
- Wang C.-C., Huang Z.-S., Chiang P.-L., Chen C.-T. & Wu H.-N. (2009)** Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. *FEBS Letters* 583(4): 691–696.
- Wang E., Ni H., Xu R., Barrett A. D. T., Watowich S. J., Gubler D. J. & Weaver S. C. (2000)** Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *Journal of Virology* 74(7): 3227–3234.
- Wang E., Ryman K. D., Jennings A. D., Wood D. J., Taffs F., Minor P. D., Sanders P. G. & Barrett A. D. T. (1995)** Comparison of the genomes of the wild-type French viscerotropic strain of yellow fever virus with its vaccine derivative French neurotropic vaccine. *Journal of General Virology* 76(11): 2749–2755.
- Wang Y., Ling L., Zhang Z. & Marin-Lopez A. (2022)** Current Advances in Zika Vaccine Development. *Vaccines* 10(11): 1816.
- Wang Y., Si L.-L., Guo X.-L., Cui G., Fang D.-Y., Zhou J.-M., Yan H.-J. & Jiang L.-F. (2017)** Substitution of the precursor peptide prevents anti-prM antibody-mediated antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Virus Research* 229: 57–64.
- Weaver S. C. (2005)** Host range, amplification and arboviral disease emergence. In: Peters C. J. & Calisher C. H. (eds.) *Infectious Diseases from Nature: Mechanisms of Viral Emergence and Persistence*. Springer-Verlag, Vienna: 33–44. [http://link.springer.com/10.1007/3-211-29981-5\\_4](http://link.springer.com/10.1007/3-211-29981-5_4)
- Weaver S. C. (2018)** Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: A challenge for the global virology community. *Antiviral Research* 156: 80–84.
- Weaver S. C. & Barrett A. D. T. (2004)** Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology* 2(10): 789–801.
- Weaver S. C., Charlier C., Vasilakis N. & Lecuit M. (2018)** Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annual Review of Medicine* 69(1): 395–408.
- Weaver S. C., Costa F., Garcia-Blanco M. A., Ko A. I., Ribeiro G. S., Saade G., Shi P.-Y. &**

## - RÉFÉRENCES -

- Vasilakis N. (2016)** Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research* 130: 69–80.
- Weaver S. C. & Reisen W. K. (2010)** Present and future arboviral threats. *Antiviral Research* 85(2): 328–345.
- Weingartl H. M., Drebot M. A., Hubálek Z., Halouzka J., Andonova M., Dibernardo A., Cottam-Birt C., Larence J. & Marszal P. (2003)** Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* 67(2): 128–132.
- Welsch S., Miller S., Romero-Brey I., Merz A., Bleck C. K. E., Walther P., Fuller S. D., Antony C., Krijnse-Locker J. & Bartenschlager R. (2009)** Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe* 5(4): 365–375.
- Wen D., Li S., Dong F., Zhang Y., Lin Y., Wang J., Zou Z. & Zheng A. (2018)** N-glycosylation of Viral E Protein Is the Determinant for Vector Midgut Invasion by Flaviviruses. *mBio* 9(1): e00046-18.
- Wengler G. & Wengler G. (1989)** Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *Journal of Virology* 63(6): 2521–2526.
- 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* 1813(4): 521–531.
- White E. (2001)** Regulation of the cell cycle and apoptosis by the oncogenes of adenovirus. *Oncogene* 20(54): 7836–7846.
- White J. M., Delos S. E., Brecher M. & Schornberg K. (2008)** Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 43(3): 189–219.
- WHO (2022)** Countries and territories with current or previous Zika virus transmission. <https://www.who.int/health-topics/zika-virus-disease>
- WHO. (2023)** Dengue and Severe Dengue. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
- Wichgers Schreur P. J., Tacke M., Gutjahr B., Keller M., Van Keulen L., Kant J., Van De Water S., Lin Y., Eiden M., Rissmann M., Von Arnim F., König R., Brix A., Charreyre C., Audonnet J.-C., Groschup M. H. & Kortekaas J. (2021)** Vaccine Efficacy of Self-Assembled Multimeric Protein Scaffold Particles Displaying the Glycoprotein Gn Head Domain of Rift Valley Fever Virus. *Vaccines* 9(3): 301.
- Wilder-Smith A., Chang C. R. & Leong W. Y. (2018)** Zika in travellers 1947-2017: a systematic review. *Journal of Travel Medicine* 25(1).
- Willison H. J., Jacobs B. C. & Van Doorn P. A. (2016)** Guillain-Barré syndrome. *The Lancet* 388(10045): 717–727.
- Winkler G., Randolph V. B., Cleaves G. R., Ryan T. E. & Stollar V. (1988)** Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology* 162(1): 187–196.
- Wispelaere M. de, Khou C., Frenkiel M.-P., Desprès P. & Pardigon N. (2015)** A Single Amino Acid Substitution in the M Protein Attenuates Japanese Encephalitis Virus in Mammalian Hosts.

## - RÉFÉRENCES -

Journal of Virology 90(5): 2676–2689.

**Wispelaere M. de, Khou C., Frenkiel M.-P., Desprès P. & Pardigon N. (2016)** A Single Amino Acid Substitution in the M Protein Attenuates Japanese Encephalitis Virus in Mammalian Hosts. *Journal of Virology* 90(5): 2676–2689.

**Wu D., Gao Y., Qi Y., Chen L., Ma Y. & Li Y. (2014)** Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Letters* 351(1): 13–22.

**Wu S.-J. L., Grouard-Vogel G., Sun W., Mascola J. R., Brachtel E., Putvatana R., Louder M. K., Filgueira L., Marovich M. A., Wong H. K., Blauvelt A., Murphy G. S., Robb M. L., Innes B. L., Birx D. L., Hayes C. G. & Frankel S. S. (2000)** Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine* 6(7): 816–820.

**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(1): 17006.

**Wuerth J. & Weber F. (2016)** Phleboviruses and the Type I Interferon Response. *Viruses* 8(6): 174.

**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(1): 414.

**Xie X., Zou J., Puttikhunt C., Yuan Z. & Shi P.-Y. (2015)** Two Distinct Sets of NS2A Molecules Are Responsible for Dengue Virus RNA Synthesis and Virion Assembly. *Journal of Virology* 89(2): 1298–1313.

**Xie X., Zou J., Wang Q.-Y. & Shi P.-Y. (2015)** Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery. *Antiviral Research* 118: 39–45.

**Yao Y., Zhou Y., Liu L., Xu Y., Chen Q., Wang Y., Wu S., Deng Y., Zhang J. & Shao A. (2020)** Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences* 7: 193.

**Yenamandra S. P., Koo C., Chiang S., Lim H. S. J., Yeo Z. Y., Ng L. C. & Hapuarachchi H. C. (2021)** Evolution, heterogeneity and global dispersal of cosmopolitan genotype of Dengue virus type 2. *Scientific Reports* 11(1): 13496.

**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(1): 27–38.

**Young P. R. (2018)** Arboviruses: A Family on the Move. In: Hilgenfeld R. & Vasudevan S. G. (eds.) *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Singapore, Singapore: 1–10. [http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8727-1\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8727-1_1)

**Yu I.-M., Holdaway H. A., Chipman P. R., Kuhn R. J., Rossmann M. G. & Chen J. (2009)** Association of the pr Peptides with Dengue Virus at Acidic pH Blocks Membrane Fusion. *Journal of Virology* 83(23): 12101–12107.

**Yu I.-M., Zhang W., Holdaway H. A., Li L., Kostyuchenko V. A., Chipman P. R., Kuhn R. J., Rossmann M. G. & Chen J. (2008)** Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science* 319(5871): 1834–1837.

## - RÉFÉRENCES -

- Yu L. & Markoff L. (2005)** The Topology of Bulges in the Long Stem of the Flavivirus 3' Stem-Loop Is a Major Determinant of RNA Replication Competence. *Journal of Virology* 79(4): 2309–2324.
- Yu L., Nomaguchi M., Padmanabhan R. & Markoff L. (2008)** Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology* 374(1): 170–185.
- Yuan L., Huang X.-Y., Liu Z.-Y., Zhang F., Zhu X.-L., Yu J.-Y., Ji X., Xu Y.-P., Li G., Li C., Wang H.-J., Deng Y.-Q., Wu M., Cheng M.-L., Ye Q., Xie D.-Y., Li X.-F., Wang X., Shi W., Hu B., Shi P.-Y., Xu Z. & Qin C.-F. (2017)** A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* 358(6365): 933–936.
- 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.
- Zhang W., Chipman P. R., Corver J., Johnson P. R., Zhang Y., Mukhopadhyay S., Baker T. S., Strauss J. H., Rossmann M. G. & Kuhn R. J. (2003)** Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural & Molecular Biology* 10(11): 907–912.
- Zhang Xiaokang, Ge P., Yu X., Brannan J. M., Bi G., Zhang Q., Schein S. & Zhou Z. H. (2013)** Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology* 20(1): 105–110.
- 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(11): 338.
- Zhang Xinzheng, Sheng J., Plevka P., Kuhn R. J., Diamond M. S. & Rossmann M. G. (2013)** Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(17): 6795–6799.
- Zhang Y. (2003)** Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO Journal* 22(11): 2604–2613.
- Zhao H., Fernandez E., Dowd K. A., Speer S. D., Platt D. J., Gorman M. J., Govero J., Nelson C. A., Pierson T. C., Diamond M. S. & Fremont D. H. (2016)** Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell* 166(4): 1016–1027.
- Zhao R., Wang M., Cao Jing, Shen J., Zhou X., Wang D. & Cao Jimin (2021)** Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development. *Life* 11(7): 615.
- Zheng A., Yuan F., Kleinfelter L. M. & Kielian M. (2014)** A toggle switch controls the low pH-triggered rearrangement and maturation of the dengue virus envelope proteins. *Nature Communications* 5(1): 3877.
- Zhou Y., Ray D., Zhao Y., Dong H., Ren S., Li Z., Guo Y., Bernard K. A., Shi P.-Y. & Li H. (2007)** Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *Journal of Virology* 81(8): 3891–3903.
- Zhu Z., Gorman M. J., McKenzie L. D., Chai J. N., Hubert C. G., Prager B. C., Fernandez E., Richner J. M., Zhang R., Shan C., Tycksen E., Wang X., Shi P.-Y., Diamond M. S., Rich J. N. & Chheda M. G. (2017)** Correction: Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *Journal of Experimental Medicine* 214(10): 3145–3145.
- Zmurko J., Marques R. E., Schols D., Verbeken E., Kaptein S. J. F. & Neyts J. (2016)** The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(5): e0004695.

- RÉFÉRENCES -

**Zou J., Xie X., Wang Q.-Y., Dong H., Lee M. Y., Kang C., Yuan Z. & Shi P.-Y. (2015)** Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. *Journal of Virology* 89(7): 3455–3470.

**Zybert I. A., Van Der Ende-Metselaar H., Wilschut J. & Smit J. M. (2008)** Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *Journal of General Virology* 89(12): 3047–3051.

# Partie VII : Annexes

**Annexe n°1: Decotter J., Mavingui P., Desprès P. and Gadea G. Expression of Cosmopolitan Dengue 2 envelope glycoproteins in human cells identifies a role for the residues M-33/35/38 in the stability of E protein. Résumé pour la conférence internationale « American Society of Virology 2022 » (ASV2022)**

**Expression of Cosmopolitan Dengue 2 envelope glycoproteins in human cells identifies a role for the residues M-33/35/38 in the stability of E protein**

Jason DECOTTER, Patrick MAVINGUI, Philippe DESPRES, Gilles GADEA

Université de La Réunion, UM134 Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249. Plateforme Technologique CYROI, 97490 Sainte-Clotilde, France.

Dengue disease has recently evolved into a major public health problem in the South West Indian Ocean (SWIO) islands, including the French territory La Reunion where a DENV-2 epidemic occurred in 2018-19. The Reunion/2018 DENV-2 clinical isolates were sequenced including the prototypical RUJJul strain (Genbank # MN272404.1). It has been reported that all Reunion/2018 DENV-2 strains belong to the Cosmopolitan-1 (C1) lineage. Too little is still known about the molecular characteristics of SWIO DENV-2 C1. The aim of our study is to better understand the biological properties of structural proteins from DENV-2 of cosmopolitan lineage. Consequently, expression of DENV-2 RUJJul envelope glycoproteins was assessed in human epithelial A549 cells transfected by a plasmid vector containing a codon-optimized sequence encoding the prM and E glycoproteins in tandem. The antigenic reactivity of recombinant E protein was verified by flow cytometry and western blot assays using anti-E mAbs 4G2 and 4E11. At 30h post-transfection, we observed that expression of recombinant prM and E proteins caused a loss of cell membrane integrity and metabolic activity in A549 cells. Flaviviruses are formed by the assembly of prM and E envelope proteins leading to prME heterodimer accumulation into the endoplasmic reticulum membranes. The topology of prME complex suggests that the 41-residues long M ectodomain (M-1/41) which composes the C-terminal part of prM is adjacent to the domain II of the E protein (EDII). We found that amino-acid changes in which all three residues M-33E, M-35W and M-38R of DENV-2 RUJJul were replaced by Ala resulted in a lower expression level of the E protein in A549 cells. Expression of mutant prME-(M-E33A/W35A/R38A) was less cytotoxic as compared to wild-type prME construct. As such, this study highlights an important role for the M ectodomain in the expression of prME heterodimer from SWIO DENV-2 C1 strains in human cells.

**Annexe n°2: Decotter J., Mavingui P., Desprès P. and Gadea G. Expression of Cosmopolitan Dengue 2 envelope glycoproteins in human cells identifies a role for the residues M-33/35/38 in the stability of E protein. Session poster à la conférence internationale « American Society of Virology 2022 » (ASV2022)**

## Expression of Cosmopolitan Dengue 2 envelope glycoproteins in human cells identifies a role for the residues M-33/35/38 in the stability of E protein



**PIMIT**  
Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical

Jason DECOTTER, Patrick MAVINGUI, Philippe DESPRES and Gilles GADEA  
UMR PIMIT – University of Reunion Island – INSERM 1187 – CNRS 9192 – IRD 249



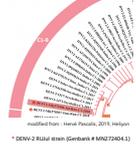
INSERM  
UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

### Background

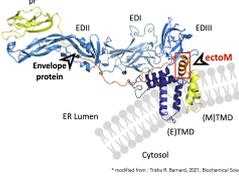


Dengue disease has recently evolved into a major public health problem in the South West Indian Ocean (SWIO) islands, including the French territory La Reunion where a DENV-2 epidemic occurred in 2018-19.

The Reunion/2018 DENV-2 clinical isolates were sequenced and it has been reported that all Reunion/2018 DENV-2 strains belong to the Cosmopolitan-1 (C1) lineage. We are still lacking information about the pathogenic properties of SWIO DENV-2.

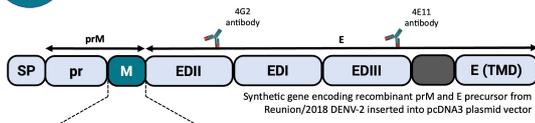


The first step of DENV assembly is the non-covalent association of prM protein (166 AA) with the envelope E protein leading to ER membrane-associated prME heterodimer. As precursor of the small structural M protein (75 AA), prM has been identified as mandatory chaperone for the proper folding of E protein.

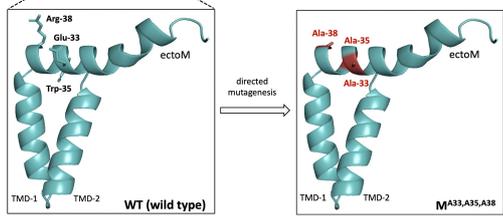


In the present study, we investigated the role of the M ectodomain (ectoM ; M-1/41) in the stability of prME heterodimer. The effect of amino-acid substitutions at conserved positions M-E33/W35/R38 on prME was studied.

### Materials & Methods

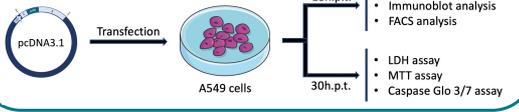


Synthetic gene encoding recombinant prM and E precursor from Reunion/2018 DENV-2 inserted into pcDNA3 plasmid vector



directed mutagenesis

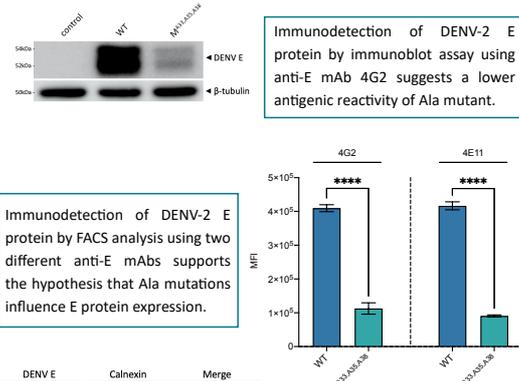
WT (wild type) vs M33A35A38



pcDNA3.1 → Transfection → A549 cells → 18h p.t. / 30h p.t. → Immunofluorescence, Immunoblot analysis, FACS analysis, LDH assay, MTT assay, Caspase Glo 3/7 assay

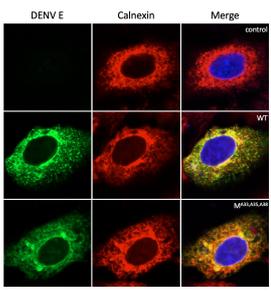
### Results

The Ala introduction at positions M-33/35/38 changes the behavior of DENV-2 E protein in A549 cells



Immunodetection of DENV-2 E protein by immunoblot assay using anti-E mAb 4G2 suggests a lower antigenic reactivity of Ala mutant.

Immunodetection of DENV-2 E protein by FACS analysis using two different anti-E mAbs supports the hypothesis that Ala mutations influence E protein expression.

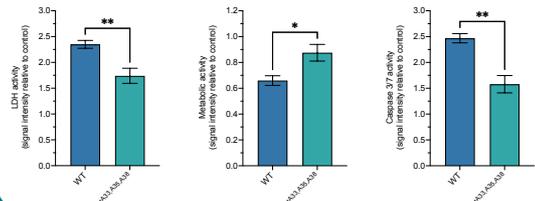


Immunodetection of DENV-2 E protein by confocal IF analysis using mAb 4G2 reveals an obvious change in subcellular distribution for Ala mut.

### Concluding remarks

The Ala introduction at positions M-33/35/38 decreases DENV-2 prME-induced toxicity in A549 cells

Considering the differences of detection and subcellular localization observed between both constructs, cytotoxicity assays were carried out in order to evaluate the impact of recombinant DENV prM and E proteins on human cell viability



LDH activity, Metabolic activity, Caspase 3/7 activity (signal intensity relative to control)

### Acknowledgments



Région Réunion, Union Européenne, Europe Engagement La Réunion, INSERM, CNRS, IRD

### References

1. Jason DECOTTER, Patrick MAVINGUI, Philippe DESPRES and Gilles GADEA, 2022. Expression of Cosmopolitan Dengue 2 envelope glycoproteins in human cells identifies a role for the residues M-33/35/38 in the stability of E protein. Conference abstract at American Society for Virology 65th Annual Meeting, Seattle, Washington

2. Benedek Varnai, János G. Hossai, Saba Ahmed, Jason Decotter, Gilles Gadea and Philippe Desprès. The M Ectodomain of Dengue Virus Cell Death-Inducing Capacity is a Stable Tumor-Associated Antigen through Caspase-3/7 Activation. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 9278.

**Annexe n°3: Substitutions nucléotidiques présentes dans les souches DENV-2 RUN-18, DES-14, Seychelles 2016 et la souche vaccinale PDK-53**

DENV-2 protein	DENV-2 DES-14	DENV-2 RUN-18	DENV-2 Seychelles 2016	Vaccin PDK-53
C	Ile	<b>Val</b>	Val	Ile
C	Val	<b>Ala</b>	Ala	Val
prM	Asn	<b>Asp</b>	Asp	Val
prM	Val	<b>Ile</b>	Ile	Ile
E	His	<b>Tryp</b>	Tryp	Tryp
E	Ile	<b>Val</b>	Val	Ile
E	Thr	<b>Ala</b>	Ala	Thr
E	Ile	<b>Val</b>	Val	Ile
NS1	Val	<b>Ile</b>	Ile	Val
NS1	Leu	<b>Pro</b>	Pro	Ser
NS1	His	<b>Tryp</b>	Tryp	Tryp
NS1	Arg	<b>Lys</b>	Lys	Lys
NS1	Arg	<b>Lys</b>	Lys	Arg
NS2A	Ile	<b>Val</b>	Val	Val
NS2A	Val	<b>Met</b>	Met	Val
NS2A	Thr	<b>Ala</b>	Ala	Thr
NS2A	Val	<b>Ile</b>	Ile	Val
NS2A	Thr	<b>Ile</b>	Ile	Ile
NS2A	Ser	<b>Asn</b>	Asn	Ser
NS2B	Glu	<b>Asp</b>	Asp	Asp
NS3	Lys	<b>Arg</b>	Arg	Lys
NS3	Ile	<b>Val</b>	Asp	Ile
NS3	Val	<b>Ile</b>	Ile	Ile
NS3	Asp	<b>Glu</b>	Glu	Asp
NS3	Val	<b>Ile</b>	Ile	Val
NS3	Arg	<b>Lys</b>	Lys	Arg
NS3	Leu	<b>Met</b>	Met	Leu
NS4B	Thr	<b>Val</b>	Val	Ala
NS5	Ala	<b>Ser</b>	Ser	Ala
NS5	Lys	<b>Arg</b>	Arg	Lys
NS5	Val	<b>Met</b>	Met	Val
NS5	Lys	<b>Arg</b>	Arg	Arg
NS5	Ala	<b>Thr</b>	Thr	Ala
NS5	Gly	<b>Arg</b>	Arg	Arg
NS5	Asp	<b>Glu</b>	Glu	Asp
NS5	Val	<b>Gly</b>	Gly	Gly
NS5	Glu	<b>Gly</b>	Gly	Glu
NS5	Tryp	<b>His</b>	His	Tryp
NS5	Val	<b>Thr</b>	Thr	Thr
NS5	Ile	<b>Val</b>	Val	Ile
NS5	Lys	<b>Tryp</b>	Tryp	Tryp
NS5	Asn	<b>Asp</b>	Asp	Asn
NS5	Thr	<b>Arg</b>	Arg	Lys
NS5	Asn	<b>Ser</b>	Ser	Asn