



**HAL**  
open science

# Influence du métabolisme cellulaire sur la réponse antivirale dirigée contre les flavivirus ZIKV et DENV

Grégoire Lebeau

► **To cite this version:**

Grégoire Lebeau. Influence du métabolisme cellulaire sur la réponse antivirale dirigée contre les flavivirus ZIKV et DENV. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de la Réunion, 2023. Français. NNT : 2023LARE0026 . tel-04434710

**HAL Id: tel-04434710**

**<https://theses.hal.science/tel-04434710>**

Submitted on 2 Feb 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.

## Thèse de Doctorat

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de la Réunion

École doctorale

Science, Technologies et Santé

Discipline : Biologie-Santé

Unité mixte de Recherche :

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

# Influence du métabolisme cellulaire sur la réponse antivirale dirigée contre les *Flavivirus* ZIKV et DENV

Présentée pour soutenance le 14 décembre 2023

## Grégoire LEBEAU

Pr. Laurent CHATEL-CHAIX

Rapporteur

Pr. Marie-Edith LAFON

Rapporteuse

Pr. Christian LEFEBVRE D'HELLENCOURT

Examineur

Dr. Marie FLAMAND

Examinatrice

Dr. Marjolaine ROCHE

Co-encadrante de thèse

Dr. Wildriss VIRANAICKEN

Directeur de thèse

## Résumé :

L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser les interactions entre deux *Flavivirus* d'importance, les virus de la Dengue (DENV) et Zika (ZIKV), et leur hôte humain. Le premier représente la plus grande menace à l'échelle mondiale avec plus de 390 millions de cas par an et 2 milliards de personnes potentiellement à risque. Alors que l'autre a, depuis quelques années, une croissance effrayante passant de quelques cas sporadiques répertoriés au siècle dernier, à des épidémies de plus grande ampleur dans le Pacifique et en Amérique du Sud entre 2007 et 2015. Si la majorité des cas d'infection par ces virus sont asymptomatiques voire paucisymptomatiques, avec surtout un syndrome pseudo-grippal (éruptions cutanées, fièvre, arthralgie), ce qui inquiète c'est la part fine mais non négligeable de cas graves pouvant être retrouvés, et pouvant à terme saturer les systèmes de soin, comme ça a été le cas pendant l'épidémie de COVID-19. La réponse antivirale développée par la cellule infectée est un moyen de contrôler l'infection et d'en limiter les effets délétères. Ces dernières années, la notion d'immunométabolisme a fait émerger le rôle capital que possède le métabolisme cellulaire sur l'activation des cellules immunes mais également sur le développement de programmes immuns. Ce travail aura été l'occasion de nous intéresser à l'importance du métabolisme oxydatif à la fois sur la réponse interférons et sur la réponse antioxydante, en mettant à profit un modèle *in vitro*, mais aussi de discuter des conséquences physiopathologiques du contrôle que le virus semble exercer sur ces réponses. J'ai ainsi pu mettre en évidence que le métabolisme glutaminergique et la phosphorylation oxydative ont une place capitale dans la mise en place d'une régulation bivalente de la réponse interférons, notamment en contexte d'infection par ZIKV et DENV. Cependant, le métabolisme oxydatif mal régulé pourrait être la source d'effets délétères lors de l'infection, comme nous l'avons montré pour ZIKV, via la formation d'agrégats intracellulaires, concomitants à une diminution des capacités antioxydantes cellulaires.

**Abstract :**

The objective of my doctoral thesis was to characterize the interactions between two significant *Flaviviruses*, namely Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV), and their human host. The former poses the greatest global threat, with over 390 million cases annually and the potential risk to approximately 2 billion people. Meanwhile, the latter, over recent years, has seen a frightening surge, transitioning from sporadic cases documented in the last century to larger-scale epidemics in the Pacific and South America between 2007 and 2015. While the majority of virus infections manifest as asymptomatic or mildly symptomatic, primarily displaying flu-like symptoms such as skin rashes, fever, and joint pain, what is concerning is the small yet significant proportion of severe cases that can be encountered. These severe cases have the potential to overwhelm healthcare systems, as was witnessed during the COVID-19 pandemic. The antiviral response mounted by the infected cell serves as a means to control the infection and mitigate its deleterious effects. In recent years, the concept of immunometabolism has shed light on the crucial role that cellular metabolism plays in the activation of immune cells and the development of immune programs. This research has provided us with the opportunity to delve into the significance of oxidative metabolism in both the interferon response and the antioxidant response. We have employed an *in vitro* model to investigate these aspects and discuss the pathophysiological consequences of the apparent control exerted by the virus on these responses. Through this work, I have been able to highlight the pivotal role played by glutaminergic metabolism and oxidative phosphorylation in establishing a bivalent regulation of the interferon response, notably in the context of ZIKV and DENV infections. However, improperly regulated oxidative metabolism could be the source of deleterious effects during infection, as we have demonstrated in the case of ZIKV, leading to the formation of intracellular aggregates concomitant with a reduction in cellular antioxidant capacity.

### **Publications en premier auteur :**

**Lebeau Grégoire**, El Safadi Daed, Paulo-Ramos Aurélie, Hoareau Mathilde, Desprès Philippe, Krejbich-Trotot Pascale, Chouchou Florian, Roche Marjolaine, Viranaicken Wildriss. The Efficient Antiviral Response of A549 Cells Is Enhanced When Mitochondrial Respiration Is Promoted. *Pathogens*. 2022 Oct 11;11(10):1168. doi: 10.3390/pathogens11101168.

**Lebeau Grégoire**, Turpin Jonathan, Frumence Etienne, El Safadi Daed, Harrabi Wissal, Desprès Philippe, Krejbich-Trotot Pascale, Viranaicken Wildriss. Evidence of RedOX Imbalance during Zika Virus Infection Promoting the Formation of Disulfide-Bond-Dependent Oligomers of the Envelope Protein. *Viruses*. 2022 May 24;14(6):1131. doi: 10.3390/v14061131.

**Lebeau Grégoire**, Frumence Etienne, Turpin Jonathan, Begue Floran, Hoarau Jean-Jacques, Gadea Gilles, Krejbich-Trotot Pascale, Desprès Philippe, Viranaicken Wildriss. Zika E Glycan Loop Region and Guillain-Barré Syndrome-Related Proteins: A Possible Molecular Mimicry to Be Taken in Account for Vaccine Development. *Vaccines (Basel)*. 2021 Mar 19;9(3):283. doi: 10.3390/vaccines9030283.

**Lebeau Grégoire**, Lagrave Alisé, Ogire Eva, Grondin Laurianne, Seriacaroupin Soundary, Moutoussamy Cédric, Mavingui Patrick, Hoarau Jean-Jacques, Roche Marjolaine, Krejbich-Trotot Pascale, Desprès Philippe, Viranaicken Wildriss. Viral Toxin NS1 Implication in Dengue Pathogenesis Making It a Pivotal Target in Development of Efficient Vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2021 Aug 25;9(9):946. doi: 10.3390/vaccines9090946.

**Lebeau Grégoire**, Vagner Damien, Frumence Étienne, Ah-Pine Franck, Guillot Xavier, Nobécourt Estelle, Raffray Loïc, Gasque Philippe. Deciphering SARS-CoV-2 Virologic and Immunologic Features. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 18;21(16):5932. doi: 10.3390/ijms21165932.

**Lebeau Grégoire**, Ah-Pine Franck, Daniel Matthieu, Bedoui Yosra, Vagner Damien, Frumence Étienne, Gasque Philippe. Perivascular Mesenchymal Stem/Stromal Cells, an Immune Privileged Niche for Viruses? *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 21;23(14):8038. doi: 10.3390/ijms23148038.

### **Publications en tant que co-auteur :**

Turpin Jonathan, El-Safadi Daed, **Lebeau Grégoire**, Frumence Etienne, Desprès Philippe, Viranaïcken Wildriss, Krejbich-Trotot Pascale. CHOP Pro-Apoptotic Transcriptional Program in Response to ER Stress Is Hacked by Zika Virus. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 3;22(7):3750. doi: 10.3390/ijms22073750.

Frumence Etienne, **Lebeau Grégoire**, Viranaïcken Wildriss, Dobi Anthony, Vagner Damien, Lalarizo Rakoto Mahary, Sandenon Seteyen Anne-Laure, Giry Claude, Septembre-Malaterre Axelle, Raffray Loïc, Gasque Philippe. Robust and low-cost ELISA based on IgG-Fc tagged recombinant proteins to screen for anti-SARS-CoV-2 antibodies. *J Immunol Methods.* 2021 Aug;495:113082. doi: 10.1016/j.jim.2021.113082. Epub 2021 May 26.

Dobi Anthony, Dubernet Arthur, Rakoto Mahary Lalarizo, Seteyen Anne-Laure Sandenon, Vagner Damien, **Lebeau Grégoire**, Raffray Loïc, Gasque Philippe. Low levels of the key B cell activation marker, HLA-DR, in COVID-19 hospitalized cases are associated with disease severity, dexamethasone treatment, and circulating IL-6 levels. *Immunol Res.* 2022 Oct;70(5):714-719. doi: 10.1007/s12026-022-09269-w. Epub 2022 Jun 9.

Dobi Anthony, Sandenon Seteyen Anne-Laure, Lalarizo Rakoto Mahary, **Lebeau Grégoire**, Vagner Damien, Frumence Étienne, Giry Claude, Septembre-Malaterre Axelle, Raffray Loïc, Gasque Philippe. Serological Surveillance of COVID-19 Hospitalized Patients in Réunion Island (France) Revealed that Specific Immunoglobulin G Are Rapidly Vanishing in Severe Cases. *J Clin Med.* 2020 Nov 27;9(12):3847. doi: 10.3390/jcm9123847.

Bedoui Yosra, **Lebeau Grégoire**, Guillot Xavier, Dargai Farouk, Guiraud Pascale, Neal Jim W, Ralandison Stéphane, Gasque Philippe. Emerging Roles of Perivascular Mesenchymal Stem Cells in Synovial Joint Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2020 Dec;15(4):838-851. doi: 10.1007/s11481-020-09958-z. Epub 2020 Sep 23.

El Safadi Daed, **Lebeau Grégoire**, Lagrave Alisé, Mélade Julien, Grondin Lauriane, Rosanaly Sarah, Begue Floran, Horeau Mathilde, Veeren Bryan, Roche Marjolaine, Hoarau Jean-Jacques, Meilhac Olivier, Mavingui Patrick, Desprès Philippe, Viranaïcken Wildriss, Krejbich-Trotot Pascale. 2023. "Extracellular Vesicles Are Conveyors of the NS1 Toxin during Dengue Virus and Zika Virus Infection" *Viruses* 15, no. 2: 364. doi: 10.3390/v15020364.

## **Remerciements :**

Quel plaisir et quel honneur de pouvoir réunir, sous prétexte de l'évaluation de mes travaux, un tel rassemblement de spécialistes dans leur domaine. Je remercie infiniment les membres de mon jury d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mes travaux. D'abord, merci au Professeur Laurent CHATEL-CHAIX d'avoir répondu avec tant de bienveillance et d'intérêt à mon invitation à être rapporteur, et ce malgré une période que je sais riche de travail. Je suis persuadé que son expérience inestimable mènera à des débats intéressants. Merci également au Professeur Marie-Edith LAFON d'avoir accepté immédiatement mon invitation à analyser mon manuscrit, ses connaissances dans le domaine des maladies infectieuses nous offrira très certainement de belles discussions. Je tiens évidemment aussi à remercier les examinateurs, le Pr. Christian LEFEBVRE D'HELLENCOURT et Dr. Marie FLAMAND, avec qui les échanges enrichiront, à coup sûr, ma soutenance.

Je vais évidemment prendre la largesse nécessaire pour remercier mon laboratoire d'accueil, l'UMR PIMIT. Merci.

Malgré tout, ce laboratoire aura été l'opportunité de côtoyer des personnes formidables, dont deux que je tenais à remercier tout particulièrement. D'abord, Daed, merci pour ta joie de vivre et ton sourire rayonnant qui même dans les pires moments permettent de garder la motivation et l'envie de travailler. Au Dr. Pascale KREJBICH-TROTOT, je souhaiterais témoigner mon plus profond respect et ma plus grande admiration. Le stage de Master 1 que j'ai effectué à tes côtés avec Wildriss a été le premier pas dont tout le monde DEVRAIT rêver dans le milieu de la recherche. Les multiples discussions que nous avons eues à quatre dans votre bureau, durant ma thèse, ont vu émerger beaucoup d'idées, certaines menées à bien, beaucoup qui n'ont pas encore abouties. Mais ces moments ont aussi été l'occasion de s'échapper et de se relaxer, dans une ambiance bonne enfant, ce qui, je pense, est une chance inestimable. Je vous remercie donc



toutes les deux de m'avoir fait le cadeau de votre présence, tout comme je vous remercie de vous être autant impliquées dans nos travaux.

Je vais à présent prendre le temps de remercier le Pr. Philippe GASQUE qui a eu la sagesse d'esprit, et le franc parler de nous déclarer dès le premier jour de Master que c'était une voie de passion et que très peu arriverait au Graal. Philippe, je ne t'ai pas écouté, j'ai persévéré, maintenant j'espère que j'aurais l'occasion de l'atteindre ce Graal. Cela étant dit, discuter science avec toi restera toujours un plaisir, même si à chaque fois je dois réviser tous les clusters de différenciation en amont.

Je me dois de remercier avec beaucoup de chaleur le Dr. Olivier MEILHAC pour son aptitude à aller au combat quand il le faut, et sans qui, j'en suis persuadé, je n'aurais pas pu faire de thèse. Celui-Dont-On-Ne-Doit-Pas-Prononcer-Le-Nom m'a dit un jour, qu'il m'avait sauvé alors que j'étais un naufragé, sans perspective de thèse. Tu-Sais-Qui se trompait lourdement, je pense que ce sont tes actions qui m'ont permises d'en être là où j'en suis aujourd'hui. Comment remercier le directeur de l'UMR DÉTROIT, sans remercier toute l'unité qu'il a à ses côtés, et pas sous ses ordres ! Ainsi je remercie Nicolas, Marie-Paule, Philippe, Pierre, Benoît, Bryan, Steeve, Aurélien, Emmanuel, Christine et Matthieu pour leur accueil.

Je remercie maintenant mon directeur de thèse, le Dr. Wildriss VIRANAICKEN et ma co-encadrante la Dr. Marjolaine ROCHE. Je pense que la portée des mots que je vais employer ne rapporteront que l'infime partie de la reconnaissance que j'ai envers eux. Marjolaine, merci pour ta bonne humeur constante et ton aide sans faille dans les aspects relationnels qui me font souvent défaut. En plus d'être devenue miss NS1 Réunion, il a fallu que tu deviennes miss NS1 *Australia* !

Wildriss, cabo en chef. Probablement la rencontre la plus enrichissante, et je pèse mes mots, que j'ai pu faire depuis que j'ai atteint l'âge de raison. Ce qui m'impressionnera toujours chez toi, c'est cette capacité d'abstraction et cette fulgurance d'esprit, qui je pense, en font jalouser

plus d'un. Vous pouvez poser n'importe quelle question à Wil, en ce qui concerne n'importe quelle manipulation, ou n'importe quel sujet de recherche, et pour peu que vous lui ayez présenté les choses correctement, au pire il vous proposera une conversation éclairée vous permettant de faire émerger des idées nouvelles, au mieux il saura trouver LA solution à la difficulté que vous rencontrez depuis des mois. Et ça simplement, sans fioriture, sans se faire mousser. Le pire, c'est qu'il se paye le luxe d'avoir une culture vaste, on peut aborder avec lui le cinéma, la littérature, la politique, tout ça sans jugement ! Même si un petit moukatage se perd de temps en temps. Mais le sujet qui je pense nous a le plus ouvert l'un comme l'autre aura été la psychologie. Merci infiniment pour tous ces échanges qui ont su me faire grandir et évoluer, j'espère à l'avenir continuer à travailler avec toi, et peut-être un jour arriver à la cheville du chercheur que tu es. Je sais que tu m'as dit que tout arrive à point, j'attends.

Je vais maintenant prendre le temps de remercier un autre pilier qui a su me faire tenir pendant ma thèse. Mes amis, le petit groupe de la 1<sup>ère</sup> ligne : Floran (Jobi ou Joba, je ne me rappelle jamais), Julien et Teva (alias Tic et Tac). Les gars, on se suit depuis le Master 1, c'est là qu'on a commencé les quatre cent coups. On se disait que nous quatre dans le même labo ça pourrait conduire à la catastrophe. Et on a décidé quoi ? Tous faire une thèse, des grands malades. Je vous remercie sincèrement, pour les fous rires, les engueulades mais surtout le soutien inébranlable qu'on a réussi à instaurer. Mon regard se tourne vers vous maintenant, j'assisterai dans le plus grand calme à vos soutenances à venir, bande de cabos. A ce petit cœur (lipidique ?) est venu s'ajouter par la suite une bien belle ribambelle de gens sans qui mes journées auraient été moins douces. Je remercie donc aussi Katy, Jonathan (même si toi tu ne m'as pas remercié dans ta thèse.), Laurine, Danielle, Sébastien, Mathilde et Aurélie. Est-ce qu'on peut dire que vous êtes la 2<sup>ème</sup> ligne ? Je tiens également à remercier ceux qui ont partagé le même bureau que nous ces derniers mois et avec qui cela s'est toujours très bien passé, et ce malgré le brouhaha dont nous étions la cause. Merci Ali, Kévin, Dimitri et Guillaume.

Maintenant que tout le labo y est passé, il serait temps que je remercie les personnes de ma vie personnelle sans qui je ne serais jamais arrivé au bout de ce chemin. D'abord, je tiens à te remercier du plus profond de mon coeur 'La Fille qui rocke'. Je sais que tu te reconnaîtras. A la base j'avais dit que tu n'aurais pas de place dans mes remerciements, mais à la réflexion tu as tellement fait, depuis le jour où tu m'as sauvé la vie avec cet ibuprofène. Tu ne m'as pas lâché et tu m'as permis de supporter des situations compliquées desquelles je ne voyais pas toujours d'échappatoire.

Je remercie évidemment ma famille, et plus particulièrement mes grands-parents qui, depuis que je suis enfant, ont toujours été une force. Papy, merci de m'avoir ouvert aux sciences, aux maths, à l'astrologie. Mamie, merci pour ta gentillesse sans borne et ta disponibilité infaillible. Je ne sais pas si je dois te remercier ou pas pour tous les carries aussi, vu le poids que ça m'a fait prendre... ? Ma chère Maman, s'il y a bien une personne qui s'est sacrifiée pour moi toute sa vie, c'est bien toi. Je n'aurai jamais le temps de faire assez pour te rendre le quart de ce que tu m'as donné. Tu as toujours eu un amour inconditionnel envers moi et je t'en remercie, cela doit paraître normal pour un parent, mais pas si normal quand on voit mon autre parent. Je me rends compte de la chance que j'ai de t'avoir et j'espère pouvoir en profiter encore bien longtemps...C'est dans cet objectif que je ferai peut-être de la recherche sur les maladies chroniques.

Cela peut paraître un peu bizarre de finir par ça, mais je me dois de remercier mes chats, Sirius et Calypso qui l'a rejoint en cours de thèse. Ces petites boules de poil m'en font voir de toutes les couleurs mais ma vie ne serait pas aussi passionnante sans eux. Ils sont ma petite famille à moi. Et même si je sais qu'ils ne peuvent pas lire ces mots, je fais également cela pour rappeler au monde entier que les animaux non-humains nous apportent autant que nous leur apportons, et que nous devons prendre soin d'eux à tout prix.

## Table des matières

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>2</b>
I.1. LES <i>FLAVIVIRUS</i> .....	5
I.1.i. Découverte, émergence et diversité .....	5
I.1.ii. Transmission et distribution .....	8
I.1.iii. Diagnostic .....	12
I.1.iv. Tableaux cliniques et formes graves .....	14
I.1.iv.a. L'infection à DENV .....	14
I.1.iv.b. L'infection à ZIKV .....	17
I.1.v. Prise en charge (traitements, vaccins et stratégie de lutte anti-vectorielle) .....	18
I.1.v.a. Traitements anti-infectieux .....	18
I.1.v.b. Vaccins .....	20
I.1.v.c. Lutte anti-vectorielle .....	22
I.1.vi. Organisation et structure virale .....	24
I.1.vi.a. Structure génomique des <i>Flavivirus</i> .....	24
I.1.vi.b. Organisation de la particule virale .....	28
I.1.vii. Cycle viral .....	30
I.1.vii.a. Attachement et entrée .....	30
I.1.vii.b. Réplication et progénie .....	33
I.1.vii.c. Tropisme cellulaire .....	35
I.1.vii.d. Persistance virale .....	37
I.1.viii. Les particularités associées aux <i>Flavivirus</i> .....	37
I.1.viii.a. La protéine NS1 .....	37
I.1.viii.b. Les sfRNA .....	40
I.2. LA REPONSE IMMUNE DIRIGEE CONTRE ZIKV ET DENV : IMPLICATIONS DE L'IMMUNOMETABOLISME .....	42
I.2.i. Immunométabolisme et cancer .....	42
I.2.ii. Au niveau systémique : interconnexions entre le statut métabolique de l'hôte et les maladies infectieuses .....	44
I.2.ii.a. Le diabète .....	44
I.2.ii.b. L'obésité .....	48
I.2.ii.c. L'activité physique .....	53
I.2.iii. L'immunité à médiation cellulaire .....	55
I.2.iii.a. Les monocytes et macrophages .....	55
I.2.iii.b. Les cellules dendritiques .....	61
I.2.iii.c. Les neutrophiles .....	64
I.2.iii.d. Les lymphocytes NK .....	66
I.2.iii.e. Les lymphocytes T .....	70
I.2.iv. L'immunité à médiation humorale .....	76
I.2.iv.a. Les lymphocytes B .....	76
I.2.iv.b. La facilitation de l'infection par les anticorps .....	80
I.2.iv.c. Le complément .....	81
I.2.v. L'immunité intrinsèque : implications du métabolisme cellulaire dans la détection des virus et la réponse antivirale associée .....	83
I.2.v.a. Les voies métaboliques impliquées dans la détection virale et la sécrétion d'interférons .....	83
I.2.v.b. Dépendance de la réponse antivirale au métabolisme .....	90
I.2.v.c. Reprogrammation métabolique par les virus et évasion immunitaire associée .....	93
<b>II. PROBLEMATIQUE ET CONTEXTE DE RECHERCHE .....</b>	<b>98</b>
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>103</b>
III.1. ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE SUR LA REPONSE ANTIVIRALE .....	103
III.1.i. La phosphorylation oxydative comme moteur de la réponse antivirale (Article 1) .....	103
III.1.i.a. Mise en place du modèle .....	103

III.1.i.b.	La phosphorylation oxydative est primordiale pour la production des effecteurs antiviraux.....	107
III.1.i.c.	Discussion de l'article 1 .....	128
III.1.ii.	<i>Mise en évidence d'une réponse antivirale bivalente selon le contexte métabolique cellulaire ....</i>	<i>131</i>
III.1.ii.a.	La L-glutamine alimente la phosphorylation oxydative facilitant la mise en place de la réponse antivirale	134
III.1.ii.b.	Des effecteurs antiviraux maintiennent une capacité antivirale en cas de glycolyse.....	135
III.1.ii.c.	Discussion de l'article 2.....	163
III.2.	LE METABOLISME OXYDATIF EST REGULE LORS DE L'INFECTION PAR LE VIRUS ZIKA .....	168
III.2.i.	<i>Le déséquilibre de la balance rédox lors de l'infection par ZIKV est lié à la formation d'agrégats</i> <i>(Article 3)</i> .....	<i>168</i>
III.2.i.a.	Introduction.....	168
III.2.i.b.	Discussion de l'article 3 .....	187
III.2.ii.	<i>Le statut rédox est régulé lors de l'infection par ZIKV, via le contrôle de l'axe antioxydant (Article</i> <i>4)</i> .....	<i>187</i>
III.2.ii.a.	Introduction.....	187
III.2.ii.b.	Discussion de l'article 4.....	201
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>204</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>211</b>

## Liste des figures :

FIGURE 1 – SCHEMATISATION DE L’EFFET WARBURG.....	3
FIGURE 2 – ARBRE PHYLOGENETIQUE DES VIRUS DU GENRE <i>FLAVIVIRUS</i> . ....	6
FIGURE 3 – CYCLE DE TRANSMISSION DES FLAVIVIRUS. ....	9
FIGURE 4 – CARTES DE REPARTITION DE DENV ET ZIKV AINSI QUE DE LEURS PRINCIPAUX VECTEURS.....	11
FIGURE 5 – CINETIQUE DES BIOMARQUEURS D’INFECTION LORS D’UNE INFECTION A ZIKV / DENV. ....	13
FIGURE 6 – TABLEAUX CLINIQUES ASSOCIES A DENV ET ZIKV. ....	16
FIGURE 7 – STRUCTURE GENOMIQUE ET PROTEIQUE DES FLAVIVIRUS. ....	25
FIGURE 8 – STRUCTURE DE LA PARTICULE VIRALE DE FLAVIVIRUS. ....	29
FIGURE 9 – CYCLE VIRAL CHEZ LES <i>FLAVIVIRUS</i> . ....	33
FIGURE 10 – IMPLICATIONS DE LA NS1 SECRETEE SUR LA PATHOGENESE CHEZ DENV. ....	40
FIGURE 11 – FORMATION DE L’ANNEAU RESISTANT A XRN1 PAR SLII. ....	42
FIGURE 12 – IMPACT DU DIABETE DE TYPE 2 SUR L’IMMUNITE. ....	47
FIGURE 13 – INFLUENCE DE L’OBESITE SUR L’IMMUNITE.....	51
FIGURE 14 – BENEFICE ET RISQUE DE L’ACTIVITE PHYSIQUE EN CONTEXTE INFECTIEUX. ....	54
FIGURE 15 – LE ROLE DU METABOLISME DANS L’ACTIVATION ET LA FONCTION DES MACROPHAGES M1.....	58
FIGURE 16 – LE ROLE DU METABOLISME DANS L’ACTIVATION ET LA FONCTION DES MACROPHAGES M2.....	60
FIGURE 17 – LE ROLE DU METABOLISME DANS L’ACTIVATION ET LA FONCTION DES CELLULES DENDRITIQUES. .....	62
FIGURE 18 – LE ROLE DU METABOLISME DANS L’ACTIVATION ET LA FONCTION DES NEUTROPHILES. ....	66
FIGURE 19 – LE ROLE DU METABOLISME DANS L’ACTIVATION ET LA FONCTION DES LYMPHOCYTES NK. ....	67
FIGURE 20 – LE ROLE DU METABOLISME DANS L’ACTIVATION ET LA FONCTION DES LYMPHOCYTES T.....	72
FIGURE 21 – LE ROLE DU METABOLISME DANS L’ACTIVATION ET LA FONCTION DES LYMPHOCYTES B.....	77
FIGURE 22 – SYSTEME DU COMPLEMENT LORS DE L’INFECTION PAR UN <i>FLAVIVIRUS</i> . ....	82
FIGURE 23 – MECANISMES MOLECULAIRES MENANT A LA DETECTION DU GENOME DES <i>FLAVIVIRUS</i> .....	86
FIGURE 24 – L’IMPLICATION DU METABOLISME DANS LA DETECTION DU GENOME VIRAL. ....	88
FIGURE 25 – EFFECTEURS ANTIVIRAUX ET <i>FLAVIVIRUS</i> . ....	93
FIGURE 26 – MANIPULATION DE LA REPOSE INTERFERONS PAR ZIKV ET DENV.....	95
FIGURE 27 – PERMISSIVITE DES A549 A ZIKV ET A DENV. ....	103
FIGURE 28 – SYSTEMES RAPPORTEURS NF- $\kappa$ B BLUE ET ISRE-LUCIFERASE DES A549 DUAL™. ....	104
FIGURE 29 – UTILISATION DU GALACTOSE POUR REORIENTER LE METABOLISME CELLULAIRE VERS LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE. ....	105
FIGURE 30 – LES A549 <sup>DUAL</sup> S’APPUIENT SUR L’OXPHOS EN PRESENCE DE GALACTOSE. ....	106
FIGURE 31 – L’EXPRESSION DE LA VIPERINE SEMBLE AUGMENTER EN CONTEXTE GLYCOLYTIQUE. ....	129
FIGURE 32 – INFECTION DES A549 <sup>DUAL</sup> PAR DENV.....	130
FIGURE 33 – INFECTION PAR DENV DU MODELE D’A549 <sup>DUAL</sup> CULTIVEES EN GLUCOSE VERSUS GALACTOSE. ....	131
FIGURE 34 – VARIATION DES CONDITIONS D’INFECTION. ....	132
FIGURE 35 – LE GALACTOSE ALIMENTE LE CYCLE DE KREBS DE MANIERE ANAPLEROTIQUE VIA LA L- GLUTAMINE.....	134
FIGURE 36 – LE METABOLISME CELLULAIRE DRESSE LES CONTOURS D’UNE REPOSE ANTIVIRALE AMBIVALENTE.....	136
FIGURE 37 – L’INFECTION PAR DENV EST DEPENDANTE DE LA L-GLUTAMINE. ....	164
FIGURE 38 – L’INFECTION PAR ZIKV EST EGALEMENT DEPENDANTE DE LA L-GLUTAMINE. ....	165
FIGURE 39 – ACTEURS DU SYSTEME DE REPLIEMENT PROTEIQUE.....	169
FIGURE 40 – SCHEMA RECAPITULATIF DE L’INFLUENCE DU METABOLISME OXYDATIF LORS DE L’INFECTION PAR DENV ET ZIKV.....	206
FIGURE 41 – IMPACT DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE SUR LA TOLERANCE VIRALE.....	209

**Liste des abréviations :**

<b>2-DG</b>	<b>2-déoxyglucose</b>
<b>25HC</b>	<b>25-hydroxycholestérol</b>
<b><math>\alpha</math>-KG</b>	<b><math>\alpha</math> -cétoglutarate</b>
<b>A549</b>	<b>Cellules de carcinome épithélial pulmonaire</b>
<b>A549<sup>Dual</sup></b>	<b>A549 exprimant des systèmes rapporteurs</b>
<b>ADE</b>	<b>Facilitation de l'infection par les anticorps</b>
<b>AMPK</b>	<b>AMP-activated protein kinase</b>
<b>ATP</b>	<b>Adénosine triphosphate</b>
<b>BACH1</b>	<b>BTB domain and CNC homolog 1</b>
<b>BAFF-R</b>	<b>B-cell activating factor receptor</b>
<b>BCR</b>	<b>B cell receptor</b>
<b>C</b>	<b>Protéine de capsid</b>
<b>cDCs</b>	<b>Cellules dendritiques conventionnelles</b>
<b>CARD</b>	<b>Caspase Activation and Recruitment Domains</b>
<b>CCL</b>	<b>Chemokine Ligand</b>
<b>cGAMP</b>	<b>GMP-AMP cyclique</b>
<b>cGAS</b>	<b>cyclic GMP-AMP Synthase</b>
<b>CMH</b>	<b>Complexe majeur d'histocompatibilité</b>
<b>CPA</b>	<b>Cellules présentatrices d'antigène</b>
<b>CZS</b>	<b>Syndrome congénital à ZIKV</b>
<b>DB</b>	<b>Dumbbell</b>
<b>DCs</b>	<b>Cellules dendritiques</b>
<b>DENV</b>	<b>Virus de la Dengue</b>
<b>DHF</b>	<b>Fièvre hémorragique à DENV</b>

<b>E</b>	<b>Protéine d'enveloppe</b>
<b>ED</b>	<b>Ectodomaine</b>
<b>ERK</b>	<b>Extracellular signal-regulated kinase</b>
<b>ERO-1</b>	<b>ER oxidoreductin-1</b>
<b>ETC</b>	<b>Chaîne de transport des électrons</b>
<b>FAO</b>	<b>Oxydation des acides gras</b>
<b>FAS</b>	<b>Synthèse des acides gras</b>
<b>GAS</b>	<b>Gamma interferon activation site</b>
<b>GBS</b>	<b>Syndrome de Guillain-Barré</b>
<b>GLUT1</b>	<b>Transporteur du glucose de type 1</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutathion réduit</b>
<b>GSSG</b>	<b>Glutathion oxydé</b>
<b>HEK</b>	<b>Cellules embryonnaires rénales humaines</b>
<b>HIF</b>	<b>Hypoxia Inducible Factor</b>
<b>HIV</b>	<b>Virus de l'immunodéficience humaine</b>
<b>HK2</b>	<b>Hexokinase 2</b>
<b>HO-1</b>	<b>Heme Oxygenase 1</b>
<b>IFIT</b>	<b>Interfon Induced protein with Tetratricopeptide repeats</b>
<b>IFN</b>	<b>Interféron</b>
<b>IKK<math>\epsilon</math></b>	<b>I<math>\kappa</math>B kinase <math>\epsilon</math></b>
<b>IL</b>	<b>Interleukine</b>
<b>IMC</b>	<b>Indice de masse corporelle</b>
<b>IRF</b>	<b>Interferon regulatory factor</b>
<b>ISG</b>	<b>Interferon Stimulated Genes</b>
<b>ISGF</b>	<b>Interferon stimulated gene factor</b>



<b>ISRE</b>	<b>Interferon-Sensitive Responsive Element</b>
<b>LB</b>	<b>Lymphocyte B</b>
<b>LNK</b>	<b>Lymphocyte natural killer</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolysaccharide</b>
<b>LT</b>	<b>Lymphocyte T</b>
<b>M</b>	<b>Protéine de membrane</b>
<b>MAVS</b>	<b>Mitochondrial antiviral-signaling protein</b>
<b>MERS-CoV</b>	<b>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</b>
<b>mo-DCs</b>	<b>Cellules dendritiques dérivées des monocytes</b>
<b>MOI</b>	<b>Multiplicité d'infection</b>
<b>mTOR</b>	<b>mechanistic Target Of Rapamycin</b>
<b>mTORC</b>	<b>mechanistic Target Of Rapamycin Complex</b>
<b>MYD88</b>	<b>Myeloid differentiation primary response 88</b>
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamide Adénine Dinucléotide</b>
<b>NADPH</b>	<b>Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate</b>
<b>NETs</b>	<b>Neutrophil Extracellular Traps</b>
<b>NQO1</b>	<b>NAD(P)H déshydrogénase [quinone] 1</b>
<b>NRF2</b>	<b>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</b>
<b>NS</b>	<b>Protéine non-structurale</b>
<b>OAS1</b>	<b>2'-5'-oligoadenylate synthase 1</b>
<b>OCR</b>	<b>Taux de consommation de l'O<sub>2</sub></b>
<b>OMS</b>	<b>Organisation Mondiale de la Santé</b>
<b>ORF</b>	<b>Cadre de lecture ouvert</b>
<b>OXPHOS</b>	<b>Phosphorylation oxydative</b>
<b>PAMPs</b>	<b>Motifs moléculaires associés aux pathogènes</b>

<b>PBMCs</b>	<b>Cellules mononuclées périphériques sanguines</b>
<b>pDCs</b>	<b>Cellules dendritiques plasmacytoïdes</b>
<b>PDI</b>	<b>Protein disulfide isomerase</b>
<b>PI3K</b>	<b>Phosphoinositide-3 kinase</b>
<b>PIC ; poly:IC</b>	<b>Acide polyinosinique:polycytidylique</b>
<b>PPP</b>	<b>Voie des pentoses phosphates</b>
<b>prM</b>	<b>Protéine de membrane immature</b>
<b>PRRs</b>	<b>Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires</b>
<b>PtdSer</b>	<b>Phosphatidylsérine</b>
<b>PTEN</b>	<b>Phosphatase and TENsin homolog</b>
<b>RE</b>	<b>Réticulum endoplasmique</b>
<b>RLR</b>	<b>RIG-I-Like receptor</b>
<b>RNS</b>	<b>Espèces réactives de l'azote</b>
<b>ROS</b>	<b>Espèces réactives de l'oxygène</b>
<b>RT-qPCR</b>	<b>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</b>
<b>SARS-CoV-2</b>	<b>Coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2</b>
<b>sfRNA</b>	<b>ARN flaviviraux subgénomiques</b>
<b>sHP</b>	<b>Small hairpin</b>
<b>SL</b>	<b>Stem Loop</b>
<b>sNS1</b>	<b>NS1 soluble sécrétée</b>
<b>STING</b>	<b>Stimulator of Interferon genes</b>
<b>T2D</b>	<b>Diabète de type 2</b>
<b>TBK1</b>	<b>TANK-binding kinase 1</b>
<b>TCA</b>	<b>Cycle de l'acide tricarboxylique</b>
<b>TCR</b>	<b>T Cell Receptor</b>

<b>T<sub>H</sub></b>	<b>Lymphocytes T helper</b>
<b>TLR</b>	<b>Toll-like receptor</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></b>
<b>TSC</b>	<b>Tuberous sclerosis complex</b>
<b>UPR</b>	<b>Unfolded protein response</b>
<b>UTR</b>	<b>Untranslated Regions</b>
<b>VPs</b>	<b>Vesicles Packets</b>
<b>WNV</b>	<b>Virus West Nile</b>
<b>Xrn1</b>	<b>Exoribonucléase 1</b>
<b>YFV</b>	<b>Virus de la fièvre jaune</b>
<b>ZIKV</b>	<b>Virus Zika</b>

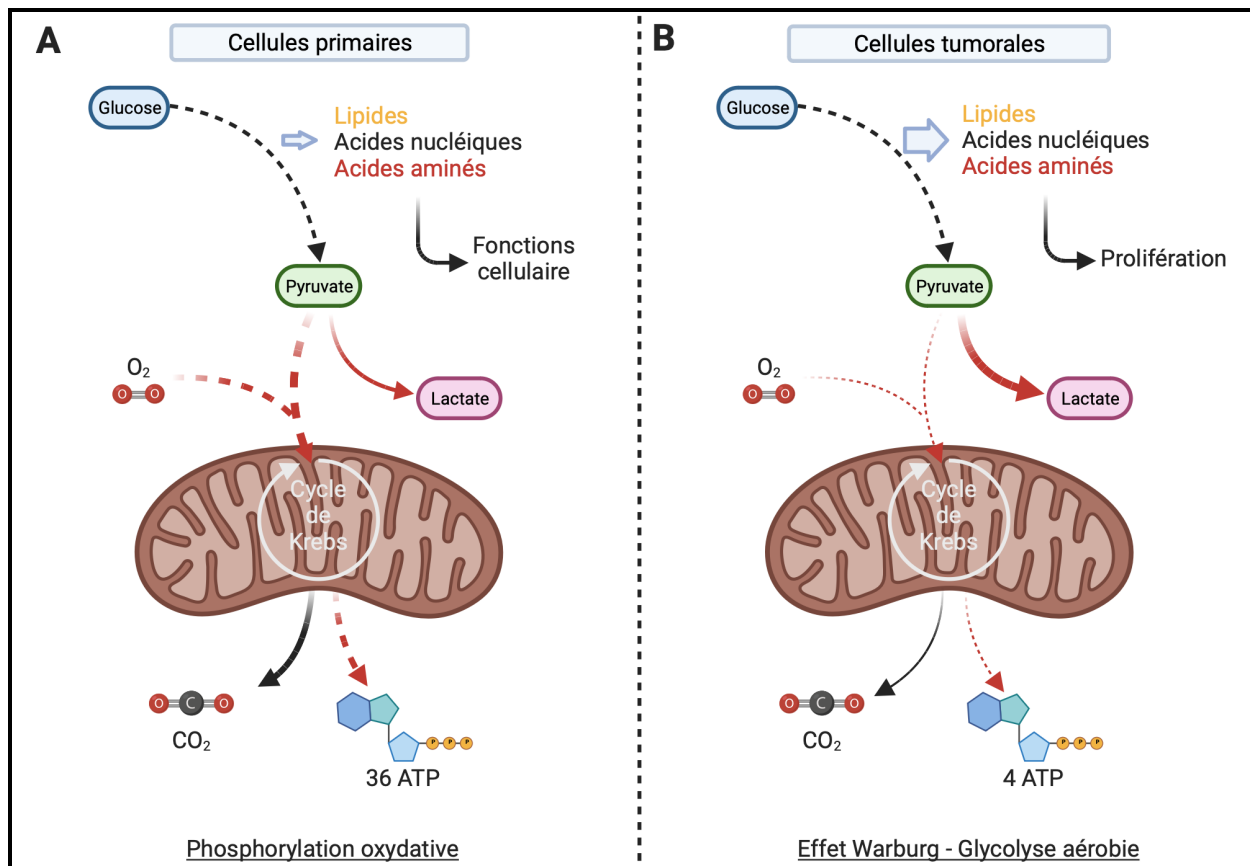
# **Introduction**

## **I. Introduction**

Le métabolisme est censé faire l'objet d'enseignements approfondis dès les premières années d'enseignement supérieur, mais aussi surprenant que cela puisse paraître, la définition faite du métabolisme est souvent réductrice à bien des égards. En effet, le métabolisme devrait couramment désigner l'ensemble des réactions biochimiques au sein d'un organisme, destinées à produire ou consommer de l'énergie, et par extension, à garantir le maintien de la vie. Ainsi, le métabolisme englobe l'ensemble des réactions anaboliques ou cataboliques qui se déroulent au niveau cellulaire ou systémique d'un organisme. D'une part, celui-ci assure l'approvisionnement énergétique nécessaire à la cellule pour garantir ses fonctions, qu'il s'agisse d'adénosine triphosphate (ATP) ou de substrats réduits tels que le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) ou encore le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). D'autre part, par le biais de voies métaboliques anaboliques, il est responsable de la synthèse de biomasse (acides nucléiques, acides aminés, lipides, glucides), utile au stockage d'énergie, à la transmission d'information et à la formation des unités fonctionnelles de la cellule, notamment les protéines. L'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme est finement régulé afin de préserver l'homéostasie énergétique au moyen d'enzymes sensibles aux fluctuations de l'état énergétique. En effet, la cellule s'efforce de maintenir un rapport ATP/ADP en adéquation avec ses besoins pour garantir des fonctions cellulaires optimales et sa croissance.

Étant donné que le métabolisme constitue le fondement de toutes les fonctions cellulaires, sa participation à ces processus fait l'objet de nombreuses investigations, tant du point de vue physiologique que pathologique. Il convient de noter que les conséquences des troubles métaboliques sur la fonction cellulaire sont étudiées dans différentes pathologies, telles que le diabète, l'obésité ou le cancer. De plus, la détection des agents pathogènes et les réponses immunitaires, qu'elles soient innées ou adaptatives, sont parmi les fonctions cellulaires pour lesquelles un lien étroit avec le métabolisme a été établi ces dernières années, notamment en lien

avec les maladies métaboliques évoquées (Berbudi et al., 2020). Dans le cadre des infections virales, certains états métaboliques semblent favoriser la multiplication virale, que ce soit par la modulation de la détection virale, par une action directe de certains métabolites aux premiers stades du cycle viral, voire dans l'établissement des réponses antivirales, dont celle qui dépend de l'interféron (IFN) (Palmer, 2022).



**Figure 1 – Schématisation de l'effet Warburg.** Otto Warburg est à l'origine de la description d'un effet qui porte aujourd'hui son nom, l'effet Warburg, selon lequel les cellules en prolifération (dont les cellules tumorales) combleraient leur besoin en biomasse grâce à une adaptation de leur métabolisme. Cette adaptation consiste en la mise en place d'une glycolyse dite aérobie. Les intermédiaires de la glycolyse servant alors à fournir les lipides, acides nucléiques et acides aminés nécessaires à la prolifération cellulaire.

Comme mentionné précédemment, la cellule doit adopter un statut métabolique cohérent avec son devenir, ce qui implique une adaptation constante de la dynamique de son métabolisme. De manière schématique, une cellule en état de quiescence tendra à baser son métabolisme sur l'utilisation de substrats glucidiques dégradés en pyruvate, pour entrer dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) ou cycle de Krebs et ainsi fournir une quantité considérable d'énergie sous forme d'ATP, grâce à la phosphorylation oxydative (OXPHOS), afin de maintenir

ses activités spécifiques. En revanche, une cellule en prolifération privilégiera la production rapide d'énergie par glycolyse aérobie, facilitant également par ce biais la synthèse abondante de biomasse (**Figure 1**) (J. Zhu & Thompson, 2019). Plus récemment, il a été établi que certains virus sont capables de moduler le métabolisme de la cellule qu'ils infectent de cette manière, ce qui rappelle l'effet de Warburg (Thaker et al., 2019; Warburg, 1956). Au cours de l'infection virale, le virus exploite la machinerie cellulaire à son avantage, afin de produire, en un laps de temps réduit, une quantité importante de virions qui sera libérée par la cellule infectée. Cette réplication virale intense dans la cellule infectée nécessite une quantité substantielle d'acides nucléiques, d'acides aminés et de lipides, fournis de la même manière que dans une cellule tumorale, grâce à une reprogrammation métabolique (Thaker et al., 2019). Cette capacité à reprogrammer, c'est à dire à détourner le métabolisme de l'hôte semble être présente chez de nombreux virus, appartenant à différentes familles et groupes, comme le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), le virus de la Dengue (DENV), le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère 2 (SARS-CoV-2) ou le virus de l'herpès simplex (HSV) (Allen et al., 2022; Thaker et al., 2019). Une autre raison de la modulation du métabolisme de l'hôte lors de l'infection est d'entraver l'établissement de la réponse cellulaire antivirale favorisant ainsi l'expansion virale. L'hypothèse selon laquelle certains états métaboliques transitoires ou particuliers du fait de maladies chroniques favorisent l'infection virale, prend dans ce cas toute son ampleur expliquant en partie les différences de réactivité systémique face à un même virus.

En effet, les interactions entre le métabolisme et l'immunité sont de plus en plus mis en évidence et ont donné lieu à l'émergence du concept d'immunométabolisme. Cet aspect de l'immunologie a connu de nombreuses avancées, surtout dans le contexte du cancer, comme nous le verrons dans la partie dédiée. Mais dans un monde où l'émergence de zoonoses représente un risque croissant, comme en témoigne la succession d'épidémies virales desquelles nous nous relevons à peine, la part du métabolisme dans l'immunité dédiée au virus est un sujet d'étude

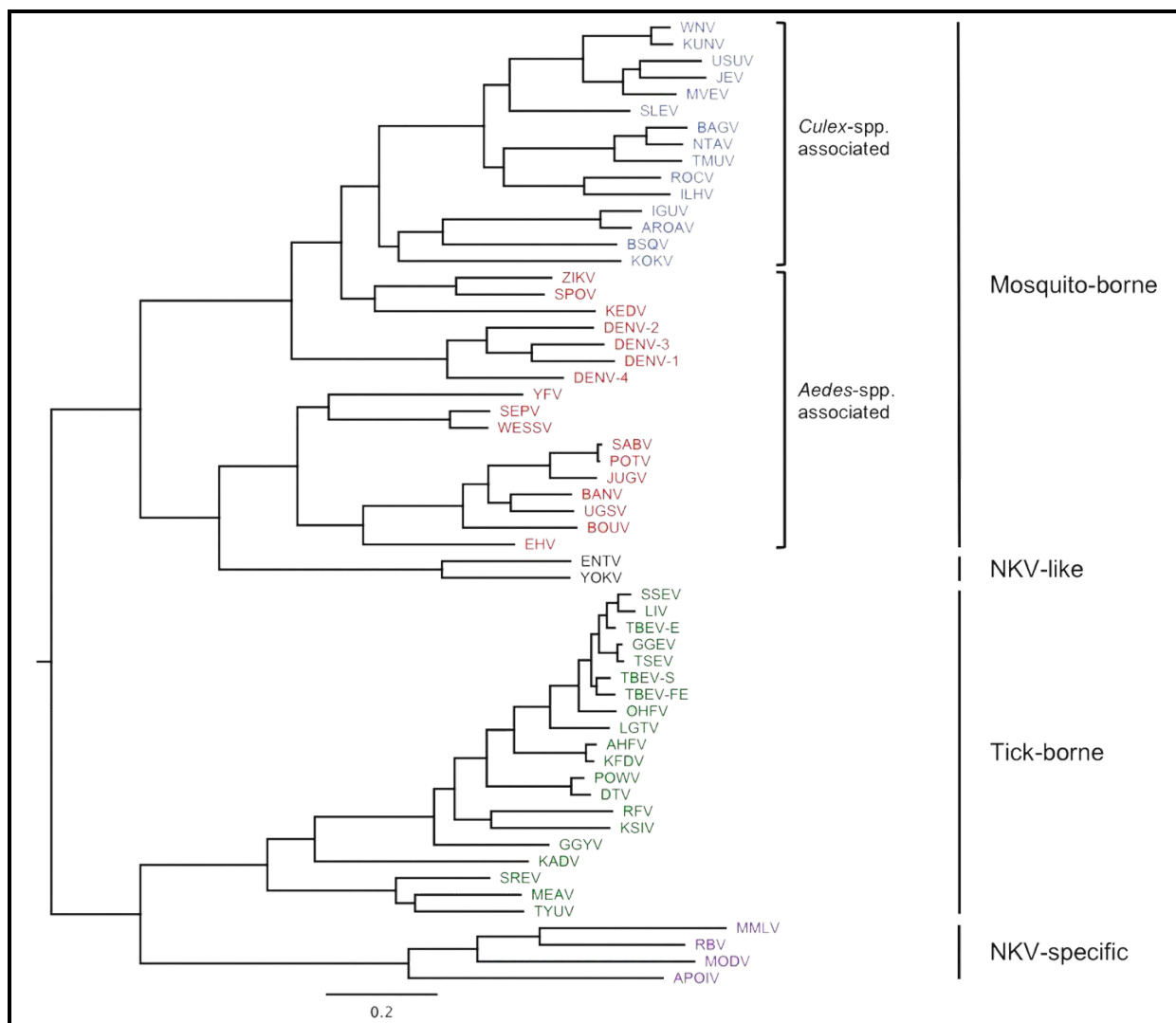
crucial. D'autant plus, en prenant en compte la prévalence grandissante des maladies métaboliques responsables de l'affaiblissement de l'immunité. Parmi les virus dont l'émergence est préoccupante, les *Flavivirus* tiennent une place non-négligeable, justifiant de moyens de recherche conséquents comme cela a été le cas suite à l'épidémie du virus Zika (ZIKV) au Brésil en 2015, ou dans la lutte contre le virus de la Dengue. Compte-tenu de l'intérêt que représente ce genre viral il semblait donc essentiel de se questionner sur l'influence du métabolisme vis-à-vis de la réponse antivirale, entre autres dirigée contre les *Flavivirus*.

## **I.1. Les *Flavivirus***

### *I.1.i. Découverte, émergence et diversité*

Les *Flavivirus* représentent un genre de la famille des *Flaviviridae*, dans laquelle on dénombre également les *Hepacivirus*, les *Pegivirus* et les *Pestivirus*. La dénomination attribuée aux virus du genre *Flavivirus* et par extension à la famille des *Flaviviridae*, signifiant littéralement « virus jaune », provient de la jaunisse associée à la dysfonction hépatique causée par l'infection au virus de la fièvre jaune (YFV, *Yellow Fever Virus*), le premier virus humain identifié par Walter Reed en 1901 et isolé en 1927 par Adrian Stokes (Reed, 1983; Staples, 2008). Depuis cette découverte, bon nombre d'espèces virales ont pu être définies, dont 55 uniquement parmi les *Flavivirus*. Les études phylogénétiques menées sur les espèces du genre *Flavivirus* ont permis de classer ces virus selon 4 clusters reflétant étonnamment bien les caractéristiques liées à la biologie et à l'écologie de ces virus (**Figure 2**), à savoir : les *mosquito-borne*, les *tick-borne*, les *no known vector* et les *insect-specific* (Kuno et al., 1998; Roundy et al., 2017). Il est également possible de noter que les *Flavivirus* semblent avoir une origine africaine datant vraisemblablement d'il y a approximativement 80 milliers d'années (Pettersson & Fiz-Palacios, 2014).





**Figure 2 – Arbre phylogénétique des virus du genre *Flavivirus*.** Arbre de ressemblance maximum généré en utilisant la séquence de la polyprotéine des *Flavivirus* indiqués. On distingue plusieurs clusters : *mosquito-borne*, *no known vector (NKV)*, *tick-borne*. Parmi les *mosquito-borne* on retrouve les virus associés aux moustiques du genre *Culex* et ceux associés au genre *Aedes*. C'est dans ce dernier clade que l'on retrouve les *Flavivirus* ayant le plus d'intérêt en santé humaine, dont ZIKV et DENV. Extrait de *Fields virology. Volume 1: Emerging viruses*, 7<sup>e</sup> édition (Howley et al., 2021).

Dans la suite de ces travaux, nous nous intéresserons au cluster des *mosquito-borne Flaviviruses*, regroupant deux clades distincts basés sur le genre de moustiques préférentiellement retrouvé comme vecteur, *Aedes* ou *Culex* (Grard et al., 2010) et plus particulièrement au clade dont la transmission repose sur les moustiques du genre *Aedes*, puisque ce sont ces virus qui peuvent être maintenus dans des cycles d'infection impliquant des primates, au contraire de ceux dépendants du genre *Culex* qui affectent majoritairement des espèces aviaires (Kitchen et al., 2011). Et parmi le clade des virus associés à *Aedes*, l'étude de DENV et ZIKV s'est montrée

pertinente du point de vue de la santé humaine en raison des récentes épidémies. Le premier est à l'origine de 390 millions de cas par an dont 500 000 cas graves, et menace plus de 2 milliards d'individus à travers le monde (Bhatt et al., 2013). Alors que l'autre est à l'origine de plusieurs épidémies successives dans le Pacifique depuis 2007, puis au Brésil en 2015, ayant été associées au développement de formes compliquées bien qu'avant son émergence récente le virus Zika était considéré comme bénin (Cao-Lormeau et al., 2014; Duffy et al., 2009; Faria et al., 2017).

Spécifiquement, même s'il n'était pas identifié comme en étant à l'origine, DENV semble avoir causé plusieurs épidémies en Chine durant le premier millénaire de notre ère. Toutefois, la première description d'une épidémie de DENV peut être attribuée à Benjamin Rush en 1780 (Rush, 1794), depuis DENV n'a cessé de se répandre jusqu'à devenir actuellement l'arbovirus le plus transmis à travers le monde, et ce, avec une grande variété de souches. En effet, le virus de la Dengue compte 4 sérotypes (DENV-1, -2, -3 et -4) qui se distinguent par la réponse sérique engendrée du fait de la variation de séquence de la protéine d'enveloppe virale, comprise entre 25 et 40% (Calisher et al., 1989; Howley et al., 2021). Au sein de ces sérotypes, on distingue plusieurs génotypes dont la classification repose sur des variations de séquence au sein de différentes régions génomiques, tantôt codant pour la protéine d'enveloppe et tantôt pour la jonction entre la séquence codant pour cette protéine et la protéine non-structurale 1. Il a ainsi été dénombré cinq génotypes de DENV-1, cinq de DENV-2, quatre de DENV-3 et trois de DENV-4 (Weaver & Vasilakis, 2009).

En 1947, dans la forêt Zika en Ouganda, ZIKV a été isolé chez un macaque rhésus sentinelle, puis chez des primates indigènes de cette même forêt (Buechler et al., 2017; Dick et al., 1952). Mais jusqu'à récemment, il ne faisait l'objet que d'une circulation sporadique chez l'Homme. C'est en 2007, en Micronésie, que l'introduction du virus au sein d'une petite population insulaire sans immunité préexistante a marqué l'émergence de ZIKV en tant que pathogène humain dont l'étude s'avèrerait d'intérêt (Duffy et al., 2009; Lanciotti et al., 2008). Durant

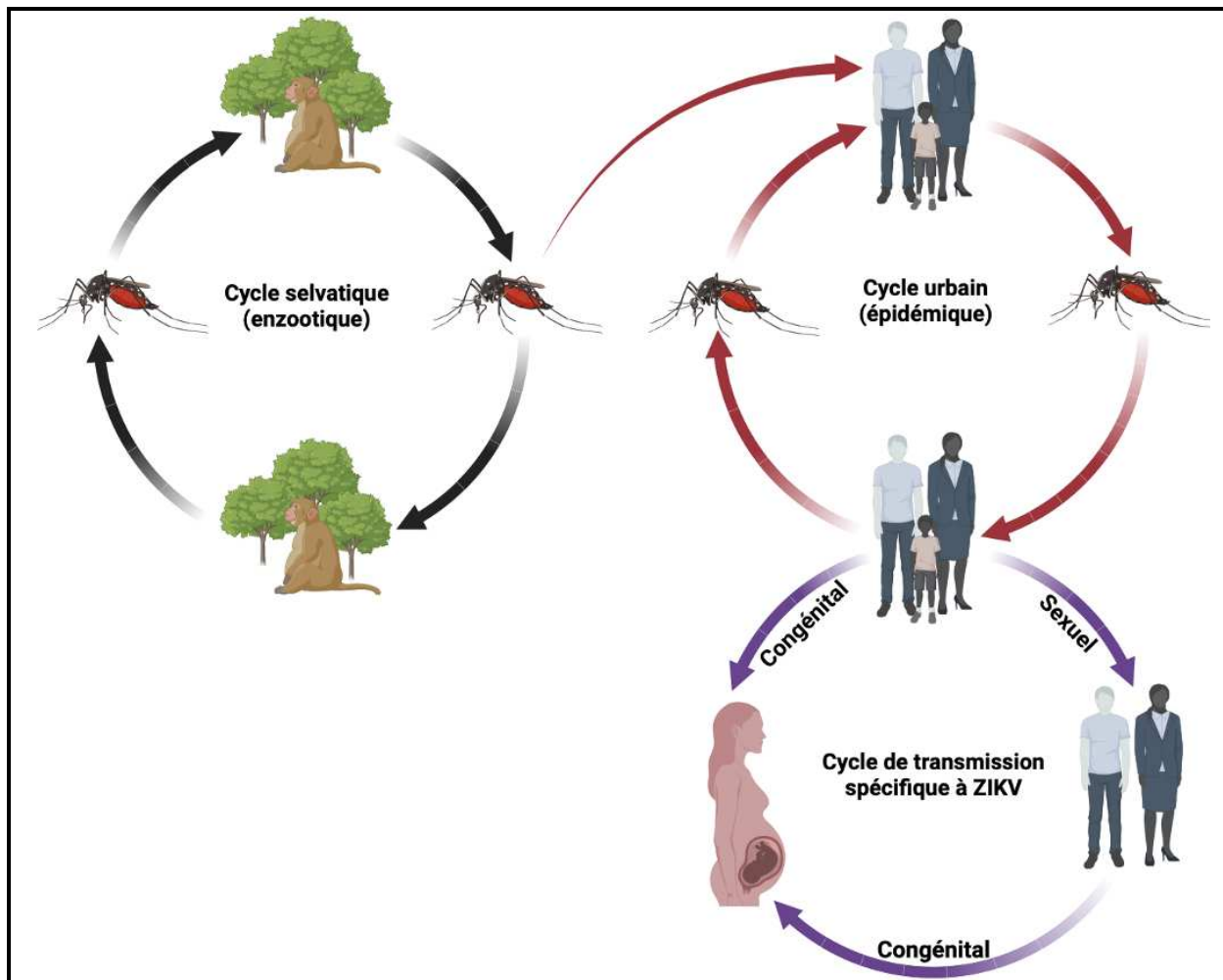
la décennie qui a suivi, ZIKV s'est répandu comme une trainée de poudre à travers l'Océanie (dont la Polynésie Française), jusqu'à rejoindre en 2015 l'Amérique Latine et les Caraïbes, avec au final 200 000 cas confirmés et probablement au moins un million de personnes atteintes, du fait des cas asymptomatiques (Campos et al., 2015; Cao-Lormeau et al., 2014; Faria et al., 2017). Plus récemment, des épidémies ont été rapportées à Singapour en 2017 et en Inde en 2018 (Z. J. M. Ho et al., 2017; Yadav et al., 2019). Pour ZIKV particulièrement, il est intéressant de noter comme la diversité virale peut impacter sa dissémination. Les souches épidémiques recensées appartiennent au génotype Asiatique (Enfissi et al., 2016). Par contre, le virus à l'origine des cas sporadiques recensés en Afrique au cours du siècle dernier fait partie du génotype Africain. Mais depuis, le génotype Asiatique a été réintroduit sur le territoire africain, les deux génotypes co-circulant désormais (Sasseti et al., 2018).

Enfin, il faut mentionner la capacité des *Flavivirus*, comme de nombreux virus à ARN, de former des quasi-espèces (W.-K. Wang et al., 2002). La variation rapide au sein d'un individu, liée à l'accumulation de mutations, permet une adaptation de la population virale dynamique en fonction de son environnement et de son hôte. Ainsi, les quasi-espèces retrouvées chez le vecteur sont adaptées à cet organisme et sont différentes des quasi-espèces retrouvées chez le mammifère (Villordo et al., 2015). L'accumulation de mutations est permise par un taux d'erreur important de la polymérase virale NS5, pouvant avoir un taux de mutations compris entre  $10^3$  et  $10^5$  substitutions par nucléotides copiés et par répllication (Twiddy et al., 2003). Ces mutations sont souvent situées dans des hotspots, permettant l'apparition de variants doués de résistances nouvelles et pouvant améliorer, de la sorte, la progénie virale (Mateo et al., 2015).

#### *1.1.ii. Transmission et distribution*

La circulation des *Flavivirus* dans la nature, en l'occurrence DENV et ZIKV, repose sur deux cycles de transmission relativement distincts, un cycle sylvatique dit enzootique où le

virus se maintient dans les populations de primates et un cycle urbain, endémique ou épidémique, où le virus se maintient dans les populations humaines (**Figure 3**) (Howley et al., 2021).

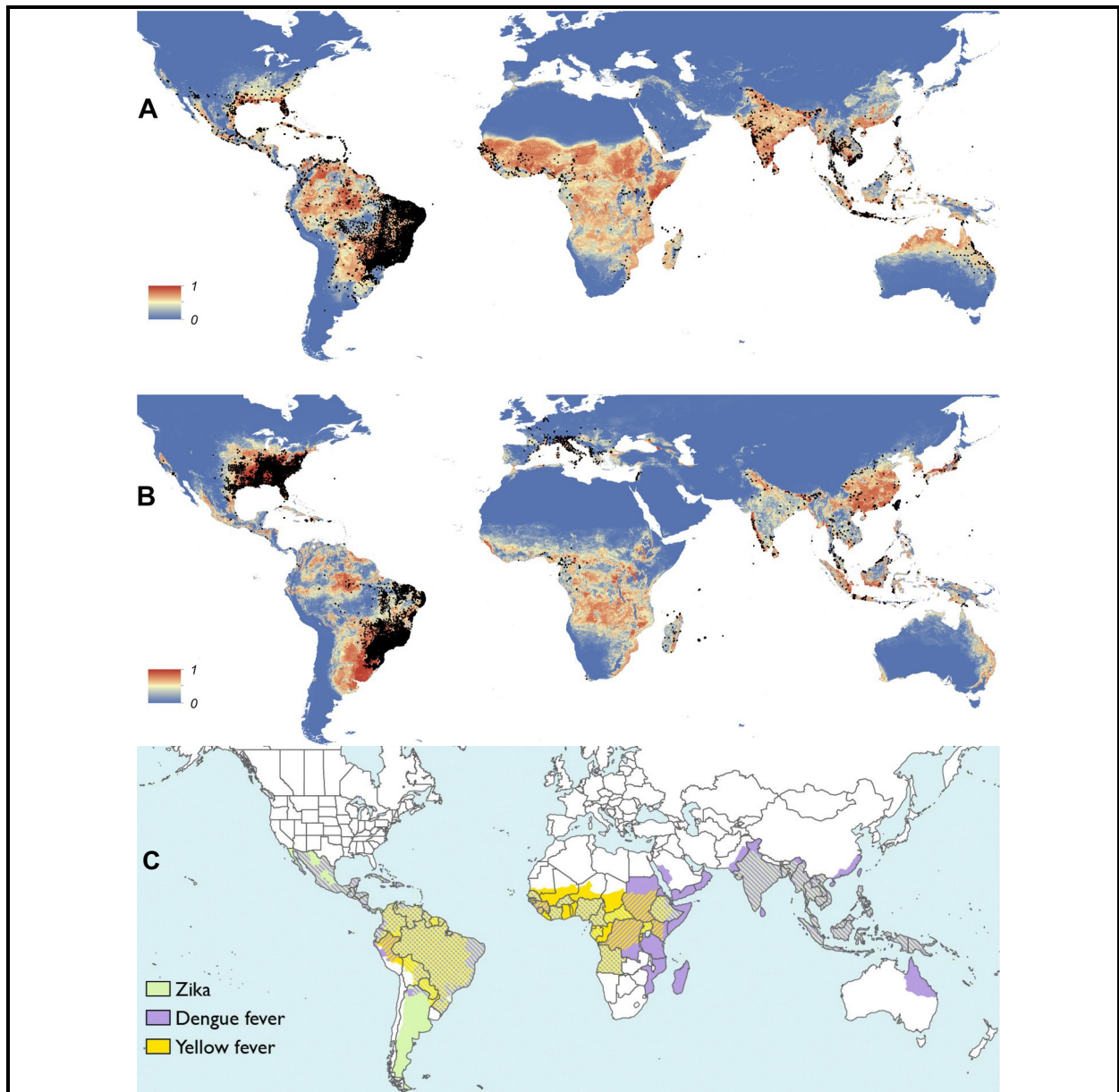


**Figure 3 – Cycle de transmission des *Flavivirus*.** Les virus de la Dengue et Zika circulent dans la nature selon deux cycles de transmission distincts, dans les deux cas vectorisés par les moustiques du genre *Aedes*. D’une part un cycle sylvatique ou enzootique, où le virus se maintient généralement chez des primates. Et d’autre part un cycle urbain où le virus se multiplie chez l’hôte humain. La virémie en cas d’infection chez l’Homme est suffisante pour supporter l’infection des moustiques, l’influence du cycle sylvatique est de ce fait minimale sur le cycle urbain. Une spécificité du virus Zika réside dans sa capacité à s’affranchir d’un vecteur, réalisation une transmission par la voie materno-fœtale ou sexuelle.

Dans les deux cas, en tant qu’arbovirose, leur chaîne de transmission vectorielle a pour maillon essentiel les moustiques du genre *Aedes*, et principalement les espèces *aegypti* et *albopictus* (Howley et al., 2021). Toutefois, DENV et ZIKV parviennent à se passer du cycle d’amplification enzootique, le taux de répllication en population humaine étant suffisant pour alimenter la transmission vectorielle (Howley et al., 2021). En effet, l’infection du moustique est permise par le prélèvement sur un hôte virémique lors d’un repas sanguin (Chouin-Carneiro

& Dos Santos, 2017). Les virus ingérés par ce biais transitent alors dans l'estomac et l'intestin moyen du moustique où ils vont se répliquer dans les cellules épithéliales, définissant le taux d'infection (*Infection Rate*, IR) propre au vecteur (Chouin-Carneiro & Dos Santos, 2017). Par la suite, comme chez son hôte mammifère, le virus est disséminé par la circulation (hémo-lymphe) aux tissus environnants, définissant ainsi le taux de dissémination virale (*Dissemination Rate*, DR) (Chouin-Carneiro & Dos Santos, 2017). Finalement, le virus rejoint les glandes salivaires où la production de progénie virale permet, via une nouvelle piqûre, la contamination d'un nouvel hôte, définissant le taux de transmission (*Transmission Rate*, TR) (Chouin-Carneiro & Dos Santos, 2017). Ces étapes représentent donc autant de barrières auxquelles le virus doit s'adapter afin d'être transmis, et définissent également la compétence vectorielle de l'hôte invertébré.

Les barrières se dressant face à la compétence vectorielle, limitent le nombre d'espèces invertébrées pouvant transmettre le virus, et par la même, les sites probables d'émergence aux seules localisations où l'on peut retrouver ces vecteurs. Il est intéressant de noter que les zones de flambées épidémiques et *a fortiori* d'endémisme de DENV et de ZIKV sont associées aux zones où sont présents *Aedes albopictus* et *aegypti* (**Figure 4A et B**), ainsi ces virus circulent de manière active en Amérique Latine, en Afrique subsaharienne et Afrique de l'Ouest, en Asie du Sud-Est et en Océanie (**Figure 4C**) (Faria et al., 2017; Herrera et al., 2017; Z. J. M. Ho et al., 2017; Kyle & Harris, 2008; Yadav et al., 2019). L'expansion récente des zones où sont retrouvés ces vecteurs laisse présager l'émergence possible de ces *Flavivirus* en Europe du Sud et aux États-Unis (Schaffner & Mathis, 2014). D'ailleurs, la circulation importante du virus de la Dengue (et du virus du Chikungunya) a été rapportée récemment au sud de l'Amérique Latine. Dans le même temps le premier cas autochtone d'infection par le virus de la Dengue a été rapporté en région parisienne. Illustrant la colonisation du vecteur aussi bien au Nord qu'au Sud et l'endémisme possible de DENV dans ces régions.



**Figure 4 – Cartes de répartition de DENV et ZIKV ainsi que de leurs principaux vecteurs. (A) *A. aegypti* (B) *A. albopictus*. Les zones en noir représentent les territoires déjà colonisés par ces espèces de moustique. La probabilité d’expansion de ce territoire va d’une faible probabilité de colonisation (bleu) à forte (rouge). (C) Distribution globale de DENV et ZIKV. Adapté du *Fields virology. Volume 1: Emerging viruses, 7e édition* (Howley et al., 2021) et de (Kraemer et al., 2015).**

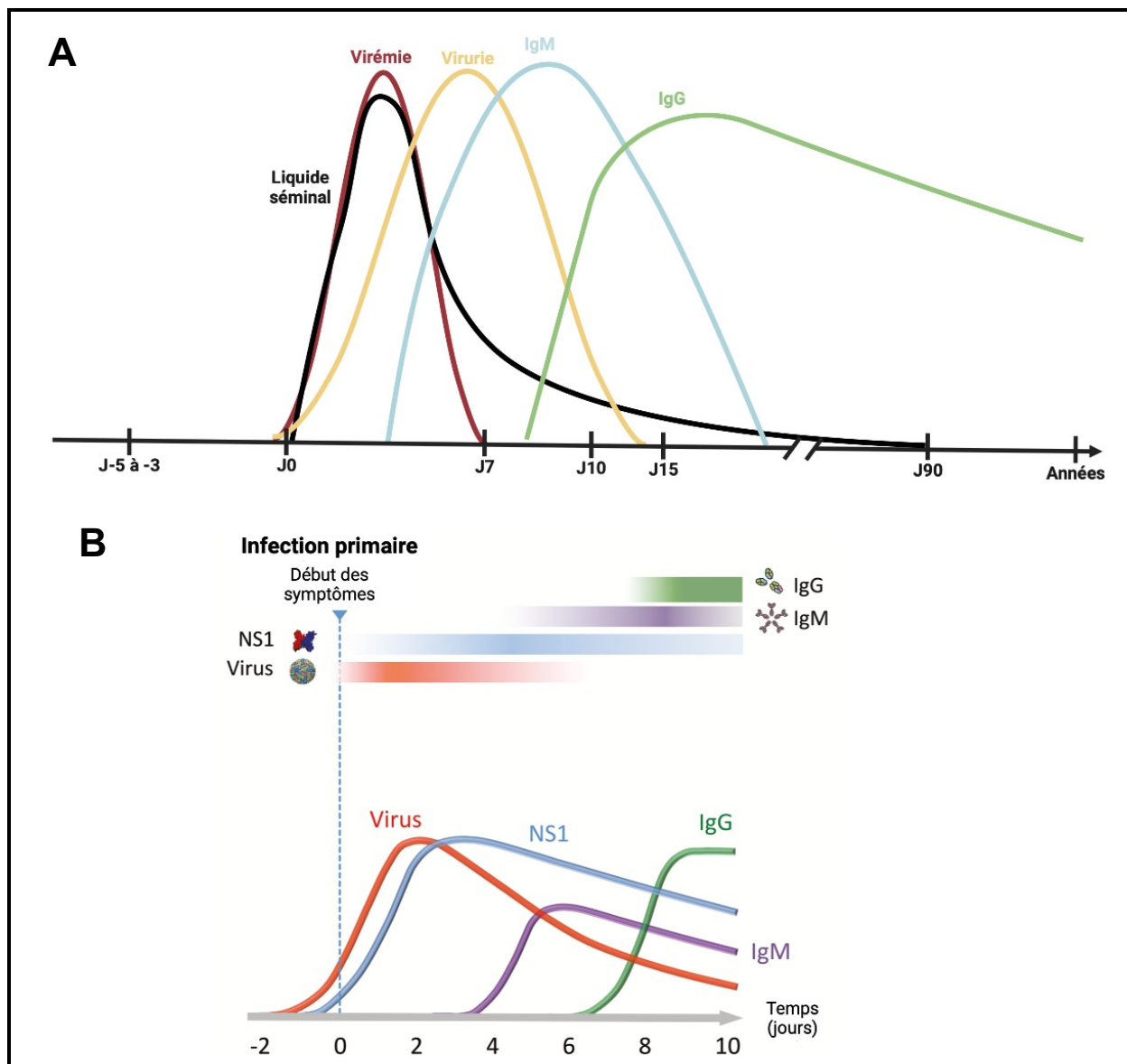
Parallèlement à ce mode de transmission vectorielle, des modes de transmission plus inhabituels ont été rapportés pour ZIKV, ce virus pouvant être transmis directement entre humains par contact sexuel, poussant l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à recommander l’utilisation du préservatif ou d’éviter les relations sexuelles pendant au moins 3 mois après une infection par ZIKV (Counotte et al., 2018; Foy et al., 2011). En effet, l’ARN de ZIKV a pu être détecté dans le liquide séminal pendant plusieurs mois post-infection, suggérant la persistance

du virus dans le tractus génital masculin, ce virus pouvant assurer des cycles réplicatifs en cas de transmission (Mead et al., 2018). Par ailleurs, le virus Zika a également démontré la capacité à passer la barrière placentaire, faisant de ZIKV le seul *Flavivirus* à être transmis de la mère à l'enfant aboutissant à des effets tératogènes, via le syndrome congénital à Zika (*Congenital Zika Syndrome, CZS*) (Driggers et al., 2016). L'affranchissement de la transmission vectorielle par ZIKV pourrait élargir les zones géographiques dans lesquelles les épidémies sont susceptibles d'être maintenues à des zones pauvres en moustiques *Aedes*.

### *I.1.iii. Diagnostic*

Devant un cas cliniquement évocateur d'infection par DENV ou ZIKV, en zone d'endémisme ou au retour d'une de ces zones, le diagnostic peut être réalisé par une approche moléculaire ou sérologique selon le délai depuis la date des premiers symptômes. La virémie modérée en cas d'infection par un de ces *Flavivirus* peut être mesurée par RT-qPCR jusqu'à 5 à 7 jours après la déclaration de l'infection, le pic virémique se situant approximativement au 2<sup>ème</sup> jour après le début des signes cliniques (Muller et al., 2017; Musso & Gubler, 2016). En cas de primo-infection, la virémie peut se maintenir dans une moindre mesure au-delà des 10 premiers jours après l'apparition des symptômes. Par ailleurs, la phase virémique s'accompagne pour DENV de la circulation de la protéine non-structurale 1 (*NonStructural protein 1, NS1*) dans le flux sanguin, à des taux bien supérieurs par rapport à ceux retrouvés pour d'autres *Flavivirus* dont ZIKV. En effet, NS1 est retrouvée jusqu'à 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  lors d'une infection à DENV contre 30  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  lors d'une infection à ZIKV (Alcon et al., 2002; Delfin-Riela et al., 2020). Le niveau auquel NS1 circule dans le cas de DENV a permis de mettre au point une méthode de diagnostic de l'infection basée sur la détection de cette protéine (Muller et al., 2017). Le diagnostic sérologique, quant à lui, peut être plus problématique du fait de la cross-réactivité courante entre les différentes espèces de *Flavivirus*. Toutefois, lors d'une primo-infection, la détection des IgM

se fait entre 6 et 7 jours après le début des symptômes alors que la détection des IgG intervient de manière plus tardive, après 10 jours (Muller et al., 2017; Musso & Gubler, 2016) (Figure 5).



**Figure 5 – Cinétique des biomarqueurs d'infection lors d'une infection à ZIKV / DENV.** (A) ZIKV. La virémie et la virurie sont détectables entre 3 et 10 jours. L'ARN viral peut être détecté jusqu'à 3 mois après l'infection dans certains fluides, comme le liquide séminal représenté par la courbe noire. Les anticorps apparaissent entre 5 et 15 jours après le début des symptômes pour les IgM et les IgG. (B) DENV. La virémie est détectable entre 3 et 10 jours. Contrairement à ZIKV, la NS1 peut servir au diagnostic puisqu'elle est retrouvée abondamment dans la circulation entre le 2<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour après le début des symptômes. Les anticorps apparaissent entre 5 et 15 jours après le début des symptômes pour les IgM et les IgG. Adapté de (Muller et al., 2017).

Pour outrepasser ces limitations et permettre un diagnostic plus discriminant entre les *Flavivirus*, des approches multiplex ou des tests d'amplification d'acides nucléiques (*Nucleic Acid Amplification Test*, NAAT) au-delà de la RT-qPCR peuvent être employés (Muller et al., 2017). Enfin, la séroneutralisation par réduction de plages de lyse (*Plaque reduction neutralization*



test, PRNT) permet un diagnostic plus sûr en cas de primo-infection par un *Flavivirus*, et constitue le test de référence pour la différenciation des *Flavivirus*, au contraire de l'ELISA (Musso & Gubler, 2016).

#### *I.1.iv. Tableaux cliniques et formes graves*

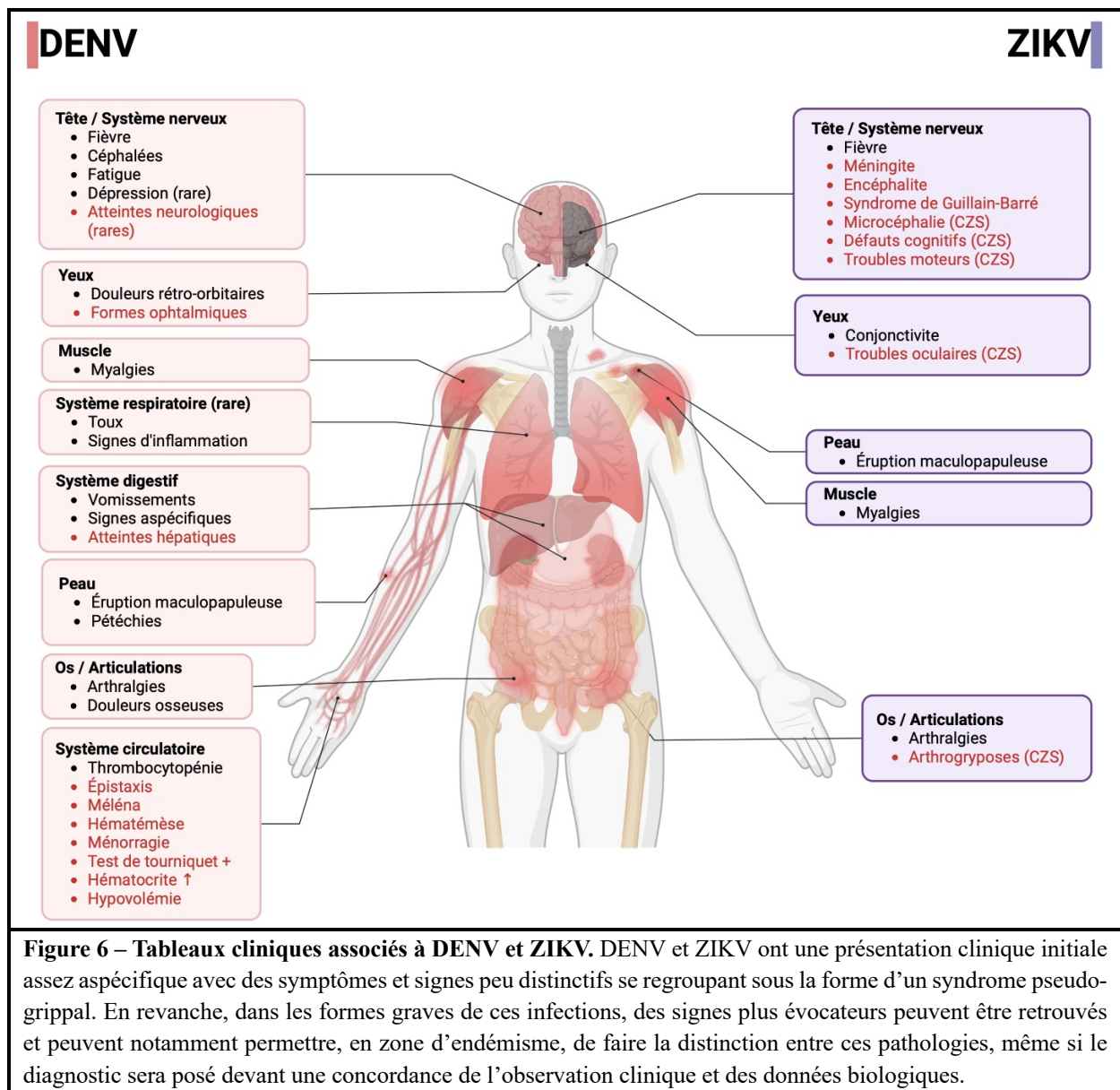
Environ 50% des personnes infectées, que ce soit à DENV ou à ZIKV, seraient asymptomatiques, entraînant probablement une sous-estimation de la circulation virale (Burke et al., 1988; Mitchell et al., 2019). Toutefois, les cas symptomatiques généralement retrouvés ne permettent pas de faire la distinction avec un syndrome pseudo-grippal, lors de la présentation clinique initiale.

##### *I.1.iv.a. L'infection à DENV*

Le tableau clinique retrouvé lors d'une primo-infection à DENV rapporte le plus souvent, l'apparition rapide et brutale d'une fièvre accompagnée de céphalées, de vomissements, de douleurs rétro-orbitaires, de myalgies, d'arthralgies et d'éruptions maculopapuleuses voire de symptômes digestifs aspécifiques (**Figure 6**) (Guzman et al., 2016; Sabin, 1952). À ces symptômes déjà invalidants, peuvent s'ajouter des symptômes plus rares, tels que de la toux ou des signes d'inflammation de l'appareil respiratoire supérieur (Kularatne, 2015). Enfin, certains individus ressentent des douleurs squelettiques et articulaires sévères, justifiant ainsi du nom attribué à ce syndrome, « *breakbone fever* » (Howley et al., 2021). La résolution de l'infection s'accompagne régulièrement de l'apparition de pétéchies, traduisant la thrombocytopénie bénigne à sévère pouvant intervenir lors de l'infection (Howley et al., 2021). Aussi, chez 25% des personnes ayant été hospitalisées, la phase de convalescence est suivie d'asthénie et du développement d'un syndrome dépressif post-infection, pouvant subsister durant plusieurs semaines, à l'instar de ce qui est connu après une infection par le virus Epstein-Barr (Seet et al., 2007).

Le développement de formes sévères d'infection par la Dengue est très rare en cas de primo-infection, cependant, l'incidence d'apparition de ces formes augmente jusqu'à atteindre 0,5% des cas lors d'une réinfection (S. B. Halstead et al., 1970). L'infection secondaire par un autre sérotype est le facteur de risque le plus important lié au développement de ces formes, allant jusqu'à un risque d'apparition dix fois plus importants chez les enfants (S. B. Halstead et al., 1970; Vaughn et al., 2000). L'augmentation du risque dans ces cas d'infection secondaire a été associée au phénomène de facilitation de l'infection par les anticorps issue de la primo-infection (*Antibody Dependent Enhancement, ADE*), développé plus loin (Brandt et al., 1989; Katzelnick et al., 2017; Nimmanitya et al., 1988). Les formes sévères de l'infection par DENV se déclinent en fièvre hémorragique (*Dengue Hemorrhagic Fever, DHF*) et en syndrome de choc (*Dengue Shock Syndrome, DSS*). La DHF se caractérise par l'apparition de fuites capillaires accompagnées d'une thrombocytopénie ainsi que d'une atteinte hépatique, traduite par l'augmentation des taux sanguins circulants d'aspartate aminotransférase (ASAT) et d'alanine aminotransférase (ALAT) (S. B. Halstead, 2007). Les manifestations hémorragiques associées aux fuites capillaires incluent pétéchies, épistaxis, hématomèse, méléna, ménorragie, et un test de tourniquet positif (présentant 10 pétéchies ou plus) (Kularatne, 2015). Cependant ces manifestations ne reflètent pas la fuite dans l'espace interstitiel pouvant mener à un hématokrite élevé et une hypotension aboutissant au syndrome de choc, qui représente la principale cause de mortalité en cas d'infection sévère (Nhan et al., 2001). Enfin, même si historiquement DENV n'a pas été classé parmi les *Flavivirus* neuroinvasifs, des manifestations neurologiques incluant myélite transverse, syndrome de Guillain-Barré (GBS), encéphalite et encéphalopathie sont retrouvées dans 1 à 5% des cas sévères de Dengue (G.-H. Li et al., 2017). Plus récemment, des atteintes oculaires lors de cas sévères d'infections par le virus de la Dengue ont été rapportées (Lim et al., 2004; Mbu-Nyamsi et al., 2023). Ces formes ophtalmiques associent des hémorragies intra-

rétiniennes localisées au niveau de l'épithélium rétinien pigmentaire, ainsi que des troubles de la vision (scotomes et baisse de l'acuité visuelle) pouvant être persistants.



À la Réunion, après une épidémie importante dans les années 1970, le virus de la Dengue n'a fait que des cas sporadiques jusqu'en 2017. À partir de cette date, on note une circulation ininterrompue du virus, même pendant les périodes d'hiver austral en 2017 et 2018 (SPF, 2021). Cette période étant habituellement peu propice à la circulation virale. Depuis que la circulation de DENV fait l'objet d'un suivi régulier, c'est-à-dire 2018, les services sanitaires ont recensé plus de 70 000 cas, 2 600 hospitalisations et 75 décès (SPF, 2021). Si au début de cette épidémie,

le sérotype 2 était le seul circulant, en 2019 et 2020, les sérotypes 1, 2 et 3 co-circulaient, jusqu'à ce que le sérotype 1 prenne le dessus en 2021 (SPF, 2021) et ce jusqu'à ce que l'épidémie se tarienne courant 2022, comme le montre la diminution du nombre de cas retrouvés chaque semaine. Notre île a été le théâtre du développement de formes sévères, dont des formes ophtalmiques, notamment chez des individus jeunes (SPF, 2021). Parmi les facteurs de risque de développer des formes sévères, les études épidémiologiques ont rapporté la présence de comorbidités d'origine métabolique, comme le diabète ou l'hypertension et également, des antécédents de maladies cardiovasculaires, tout ceci corroborant des données déjà disponibles dans la littérature (Carras et al., 2023; Sangkaew et al., 2021; SPF, 2021).

#### I.1.iv.b. L'infection à ZIKV

Le tableau clinique retrouvé en cas d'infection symptomatique par le virus Zika est proche de celui que nous avons décrit pour la Dengue. Les manifestations principales sont bénignes et incluent de la fièvre, des éruptions maculopapuleuses, des céphalées, des myalgies, de l'arthralgie et une conjonctivite (Paixão et al., 2016). Mais des cas plus sévères ont été rapportés chez des individus immunodéprimés ou souffrant de comorbidités (Carteaux et al., 2016). Parmi les complications graves chez l'adulte, on peut ainsi noter le développement de méningites et d'encéphalites (**Figure 6**). Enfin, le virus Zika a été associé au développement post-infection de GBS, une neuropathie périphérique post-infectieuse d'origine auto-immune, avec une incidence de 2 à 3 personnes pour 10 000 personnes infectées contre une incidence moyenne attendue annuelle de 1 à 2 sur 100 000 personnes (Mier-y-Teran-Romero et al., 2018).

Les épidémies successives et à grande échelle ont révélé l'existence du syndrome congénital à Zika, celui-ci devenant la complication la plus redoutée intervenant lors d'une infection par ZIKV. En effet, si l'infection de l'adulte n'entraîne que très rarement une morbidité conséquente, l'infection du fœtus durant la grossesse, par voie materno-fœtale, peut mener à des effets tératogènes. Le spectre de troubles associé à l'infection du nouveau-né est variable et

inclut des atteintes neurologiques et motrices, tels que des troubles oculaires, des arthrogryposes, de l'épilepsie, des défauts cognitifs ou des troubles moteurs, chez 10 à 15% des nouveau-nés de mères contaminées (Aragao et al., 2017; França et al., 2016; Howley et al., 2021). Toutefois, dans 4 à 6% des cas, on rapporte l'apparition d'une microcéphalie, caractérisée par une réduction du périmètre crânien d'au moins 3 déviations standard, et de calcifications sous-corticales à l'imagerie par résonance magnétique (Aragao et al., 2017; França et al., 2016). L'origine physiopathologique de ces défauts neurodéveloppementaux fait l'objet d'exploration mais aucun mécanisme consensus n'a pour l'heure été établi. Par ailleurs, ZIKV peut induire des dommages placentaires conduisant à une restriction de la croissance fœtale *in utero*, le faible poids à la naissance représentant un facteur aggravant de mortalité pour les cas de CZS (Hirsch et al., 2018; N. Costa et al., 2020; Noronha et al., 2016).

#### *I.1.v. Prise en charge (traitements, vaccins et stratégie de lutte anti-vectorielle)*

Devant la possibilité d'épidémie et de développement de formes graves associées, le management du risque infectieux s'avère d'une importance capitale. Malheureusement, pour l'instant la prise en charge des patients se cantonne à la prescription de traitements symptomatiques. Sans possibilité de traiter la cause sous-jacente, les patients reçoivent de manière aspécifique du paracétamol à visée apyrétique et antalgique associé à la mise en place d'une hydratation par voie intraveineuse. Un effort de recherche intensif est mené pour la recherche d'options thérapeutiques viables, que ce soit à titre préventif ou curatif. Toutefois, c'est la lutte antivectorielle lors des saisons à risque qui apporte jusqu'à présent les meilleurs résultats pour endiguer la propagation des infections flavivirales.

##### *I.1.v.a. Traitements anti-infectieux*

La découverte de molécules anti-infectieuses repose sur deux axes de recherche, d'une part des molécules ciblant directement les protéines virales, d'autre part, des molécules ayant pour cible des protéines d'intérêt de l'hôte. La majorité des campagnes de recherche d'antiviraux

directs s'est attelée à cibler les protéines avec une activité enzymatique connue, telles que la protéase flavivirale NS2B-NS3 ou l'ARN polymérase ARN dépendante NS5 (Bifani et al., 2023). Basés sur des approches *in silico* ou *cell-based*, de nombreux composés ont ainsi pu être rapportés comme étant efficace que ce soit sur ZIKV ou sur DENV (Bifani et al., 2023). Pour autant aucun n'a jusqu'à présent dépassé toutes les étapes de développement clinique (Bifani et al., 2023; Low et al., 2017). Même si, deux inhibiteurs de NS4B sont actuellement en essai clinique de phase II chez l'Homme (JNJ-1802 de Janssen et NITD-688 de Novartis) et pourraient représenter de bonnes opportunités thérapeutiques à l'avenir (Goethals et al., 2023; Moquin et al., 2021). Par ailleurs, la recherche de molécules exerçant un effet antiviral et provenant de plantes est également en essor, même si là encore, aucune opportunité thérapeutique solide n'a émergé (Clain et al., 2019; Ramiharimanana et al., 2022). L'éventualité d'un traitement antiviral ciblant les protéines virales devra évidemment prendre en compte le développement possible de résistance, la meilleure solution pour y faire face étant la combinaison de composés dirigés contre plusieurs cibles d'intérêt, l'émergence simultanée de résistances à plusieurs composés étant peu probable. De manière alternative, la recherche de molécules orientées plutôt vers l'hôte et ayant une activité sur des cibles d'intérêt pour le virus permettrait de limiter l'émergence de ces résistances, tout en offrant la possibilité d'avoir une action panflavivirale. Jusqu'à présent, six antiviraux dirigés contre l'hôte ont atteint le stade des essais cliniques (dont la metformine et l'ivermectine) mais aucun n'a malheureusement montré la capacité de réduire les symptômes, ni le risque de développer des formes sévères (Bifani et al., 2023). De manière plus générale, le repositionnement de molécules ayant déjà une activité pharmacologique utile dans d'autres pathologies, en tant qu'antiviraux pourrait permettre l'émergence rapide de solutions thérapeutiques pérennes.

### I.1.v.b. Vaccins

Le développement de stratégies vaccinales dirigées contre les *Flavivirus* a drastiquement réduit l'impact clinique de certains d'entre eux. Ainsi plus de 500 millions de doses de vaccins contre le YFV ont pu être administrées prévenant des conséquences dramatiques de celui-ci sur la santé humaine mondiale. Pour autant, la mise en place avec succès d'une solution vaccinale sûre dédiée à chacun des *Flavivirus* d'importance médicale, dont DENV ou ZIKV, n'a pour l'instant pas été achevée.

Le développement de vaccins pour prévenir l'infection par ZIKV a exploré plusieurs possibilités allant du virus vivant atténué à l'utilisation de vecteurs adénoviraux, en passant par la possibilité de vaccins à ARN. Le développement de souches vaccinales inactivées n'a pas attendu les épidémies intervenues en Amérique du Sud pour être initié mais pour l'instant aucune n'a dépassé le stade des premiers essais cliniques (Baldwin et al., 2018; Modjarrad et al., 2018; Sumathy et al., 2017), alors que plusieurs tentatives pour obtenir une souche vaccinale vivante atténuée sont en cours d'évaluation sur modèles murins et de primates (Shan et al., 2017; Xie et al., 2017). L'utilisation de vecteurs viraux construits pour exprimer les gènes de ZIKV a également été explorée, notamment basés des plateformes adénovirales (Bullard et al., 2018; Q. Guo et al., 2018; K. Xu et al., 2018). L'administration de ces candidats-vaccins a d'ailleurs prouvé le développement d'une réponse immune et d'anticorps neutralisants durables chez les primates, et ce jusqu'à un an après inoculation (Abbink et al., 2016). Toutefois, le délai nécessaire à l'obtention de vaccins efficaces chez l'Homme et dont l'innocuité a été prouvée, a vu poindre l'émergence de stratégies vaccinales synthétiques basées sur l'inoculation d'ARN messagers délivrés sous la forme de complexes lipidiques. Devant le succès de telles préparations lors de la pandémie à SARS-CoV-2 pour éviter les formes graves, ce type de stratégie s'impose maintenant en tant que réponse rapide aux menaces à venir, vu le délai raccourci (approximativement 4 mois) entre l'identification d'une séquence candidate appropriée au développement

vaccinal et les premiers essais cliniques (Dagan et al., 2021). Des vaccins à ARN développés pour encoder les protéines prM et E de ZIKV ont d'ailleurs montré leur immunogénicité et leur capacité à protéger de l'infection sur des modèles précliniques et font depuis l'objet d'essais cliniques (NCT04917861, NCT03014089) (Pardi et al., 2017; Richner, Himansu, et al., 2017; Richner, Jagger, et al., 2017).

Si le développement d'un vaccin contre DENV est un travail mené depuis plus longtemps, celui-ci se révèle également être un exercice plus complexe. En effet, une stratégie vaccinale efficace se doit de conférer une protection contre les quatre sérotypes de DENV, en conséquence la mise au point d'un vaccin tétravalent a fait l'objet d'efforts importants. Le premier vaccin tétravalent à avoir reçu une autorisation d'utilisation chez l'Homme, Dengvaxia<sup>®</sup>, est l'association de quatre chimères de la souche vaccinale YF-17D exprimant chacune les protéines prM et E d'un des sérotypes de DENV (Guy et al., 2010). Ce vaccin a fait l'objet de plusieurs essais cliniques de phase III qui ont prouvé son efficacité et son immunogénicité sur une tranche de sujets âgés de 9 ans à 45 ans, avec l'administration de trois doses à six mois d'intervalle (Capeding et al., 2014; Villar et al., 2015). La principale difficulté rencontrée avec ce vaccin tétravalent est l'absence de protection uniforme contre les quatre sérotypes de DENV. Notamment, un essai de phase IIb mené sur de jeunes élèves thaïlandais a rapporté un échec dans la protection contre DENV-2, alors que l'efficacité contre les autres sérotypes variaient entre 56 et 100% (Sabchareon et al., 2012). Par ailleurs, il a été démontré par des études menées post-vaccination, que les bénéfices liés à la vaccination chez une population naïve face à l'infection par DENV étaient supplantés par un risque accru de développer des formes sévères à cause du phénomène d'ADE à l'issue d'une infection postérieure (S. B. Halstead, 2017; Sridhar et al., 2018). En effet, Dengvaxia<sup>®</sup> suscite une réponse immunitaire analogue à une primo-infection par DENV, favorisant les formes sévères en cas d'infection secondaire (Ferguson et al., 2016). En revanche, l'utilisation de cette solution vaccinale a montré son intérêt sur une population



d'individus séropositifs pour DENV (S. B. Halstead, 2017). Les recommandations d'utilisation de ce vaccin devraient donc se limiter à une population d'individus séropositifs âgés de 9 à 45 ans, réduisant considérablement l'intérêt clinique de ce vaccin, puisque les formes les plus graves sont notamment plus prévalentes chez les jeunes individus. D'autres préparations tétra-valentes sont encore actuellement en développement, TV003/TV005 et TDV, respectivement par le *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (États-Unis) et Takeda (Japon). Les premiers sont basés sur un mélange en concentrations différentes de chimères DENV-4 $\Delta$ 30, un virus vivant atténué suite à une mutation de 30 nucléotides dans la région 3'UTR (*Untranslated Regions*), exprimant les protéines prM et E des sérotypes 2, 3 et 4 de DENV (Kirkpatrick et al., 2015). À ces virus atténués vient s'ajouter le virus DENV-1 $\Delta$ 30 qui, sur le même principe que DENV-4 $\Delta$ 30, est un virus atténué de DENV-1 (Kirkpatrick et al., 2015). L'administration de ces vaccins s'est montrée sûre et efficace, et jusqu'à 90% des receveurs présentaient, 90 jours après vaccination, des anticorps neutralisants circulants contre les quatre sérotypes de DENV (Kirkpatrick et al., 2015). La solution proposée par Takeda, quant à elle, repose sur l'association du virus vivant atténué DENV-2/PDK-50 à des souches chimériques dérivées de ce dernier exprimant les protéines prM et E des trois autres sérotypes (George et al., 2015). Les études menées jusqu'à présent ont rapporté une protection contre au moins trois sérotypes dans 96% des cas et des essais cliniques de phase III sont encore actuellement en cours (NCT03999996, NCT02747927) (Osorio et al., 2014). À noter, des vaccins destinés à lutter contre d'autres *Flavivirus* d'importance médicale ont été développés, à savoir pour limiter l'infection par WNV et TBEV, ces derniers ayant été approuvés au niveau vétérinaire.

#### I.1.v.c. Lutte anti-vectorielle

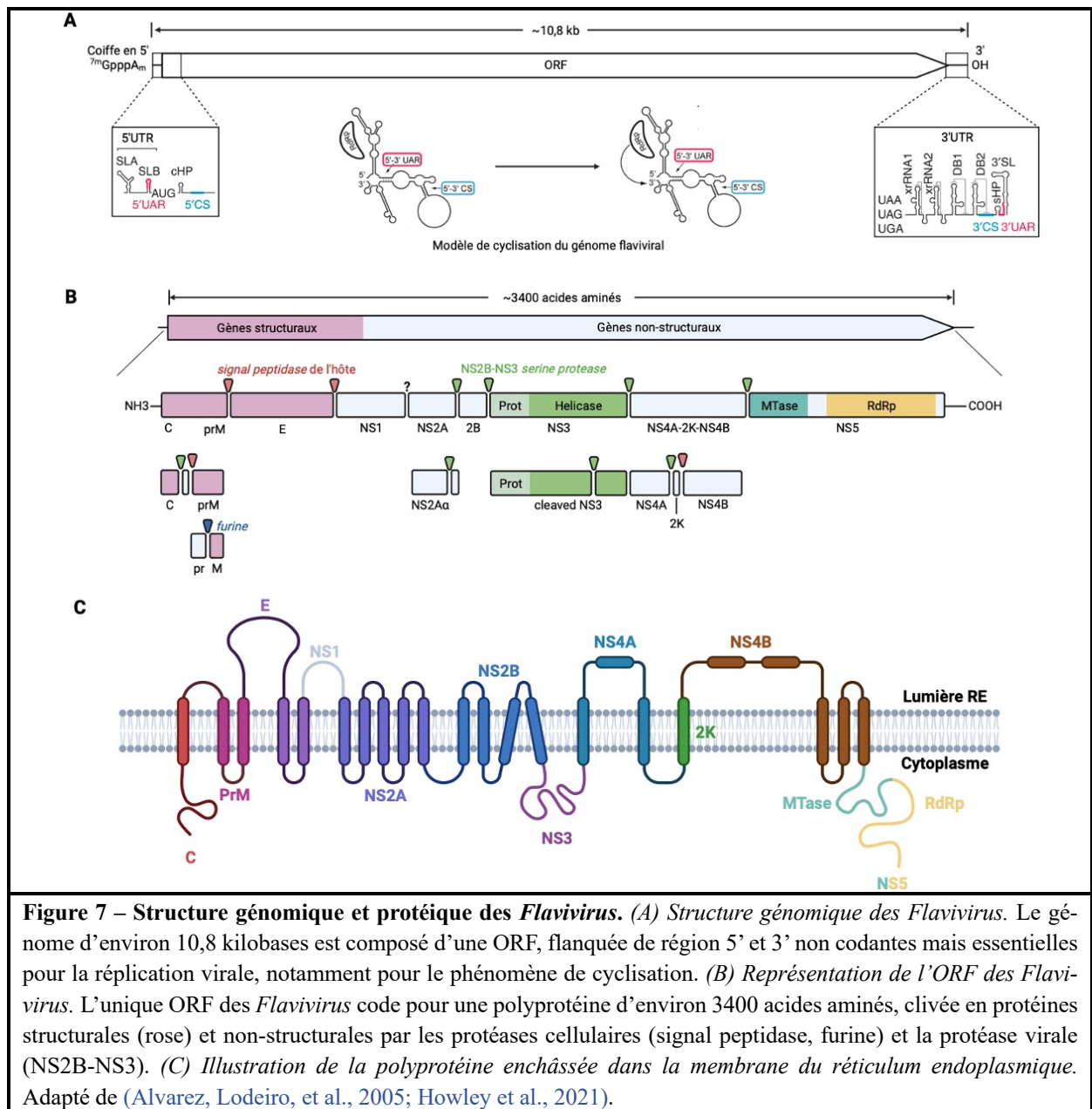
Après ce focus sur les opportunités disponibles pour prévenir ou traiter les infections par DENV ou ZIKV, il s'avère évident qu'aucune solution pérenne ne fait l'unanimité pour le moment. La stratégie la plus adéquate pour lutter contre ces infections reste encore de limiter leur

transmission grâce au contrôle de leur vecteur. Ainsi, lors de l'émergence d'une maladie transmise par les moustiques, l'utilisation de barrières physiques telles que les moustiquaires ou de répulsifs efficaces constituent une solution efficace (Fradin & Day, 2002). L'entretien récurrent des zones de développement de gîtes larvaires ainsi que l'élimination de ces gîtes représentent également une mesure de prévention à ne pas sous-estimer (Elsinga et al., 2017). Toutes ces mesures doivent être menées à grande échelle et donc pour être pleinement efficace, une communication adéquate doit être réalisée pour promouvoir leur mise en place. Pour réguler la circulation du pathogène, l'utilisation d'insecticides peut être envisagée, même si le recours à cette stratégie devrait être limité à cause de son impact éventuel sur la biodiversité mais également du fait de l'apparition irrémédiable d'individus résistants à ces insecticides (Barbosa et al., 2018; Brühl et al., 2020; Rivero et al., 2010). Pour tenter de dépasser ce problème, le développement de mesures de contrôle novatrices ont vu le jour. On peut notamment citer l'irradiation de moustiques mâles, rendus ainsi stériles et relâchés aux États-Unis, en Italie, en Chine ou au Brésil, conduisant à une réduction des populations de moustiques, suite à une baisse de la reproduction (Bellini et al., 2013; X. Zheng et al., 2019). Sur un principe différent, mais avec une finalité qui se veut similaire, l'étude de l'incompatibilité cytoplasmique se base sur la présence de bactéries de souches différentes (notamment *Wolbachia*) chez les individus mâles et femelles, aboutissant à un défaut de mitose suite à la fécondation et donc à la genèse d'une descendance non viable (Gebiola et al., 2017; Iturbe-Ormaetxe et al., 2011). Par ailleurs, la présence de *Wolbachia* est capable de limiter la répllication de bon nombre de virus dont DENV et ZIKV chez le vecteur porteur, limitant de ce fait leur compétence vectorielle. La relâche de moustiques porteurs de la bactérie semble avoir des effets positifs sur la circulation virale. En effet, les dernières expérimentations menées en Colombie ont rapporté des résultats encourageants, puisqu'elles ont corrélé avec une réduction des cas en 2023.

### *I.1.vi. Organisation et structure virale*

#### *I.1.vi.a. Structure génomique des *Flavivirus**

Les *Flavivirus* font partie du groupe IV de la classification de Baltimore. L'*International Committee on Taxonomy of Viruses* les range dans cette catégorie car leur génome est composé d'un ARN monocaténaire de polarité positive, d'une taille moyenne de 11 kb (Wengler et al., 1978). Une fois libéré dans le cytoplasme de la cellule cible, cet ARN viral va être traduit, à l'instar d'un ARNm cellulaire, à la différence que l'étude du génome des *Flavivirus* a montré des différences notables de structure avec les ARN messagers cellulaires. Tout d'abord, l'absence de queue poly-A en position 3', qui joue un rôle chez les eucaryotes dans la stabilité et la protection des ARNm contre la dégradation mais aussi dans l'initiation de la traduction (Wengler et al., 1978). On note également la présence en 5' d'une coiffe de type 1  $5' \text{ m}^7\text{GpppA}_m\text{N}$  qui participe à l'initiation de la traduction différente de celle des ARNm cellulaires qui ont, eux, une coiffe type 0  $5' \text{ m}^7\text{GpppN}$  (Wengler et al., 1978). Le génome viral comprend un seul cadre de lecture ouvert (*Open Reading Frame*, ORF) flanquée des régions 5' et 3' non codantes (*Untranslated Regions*, UTR) longues respectivement d'environ 100 nucléotides et 400 à 700 nucléotides (Figure 7) (W. Ng et al., 2017).



**Figure 7 – Structure génomique et protéique des *Flavivirus*.** (A) Structure génomique des *Flavivirus*. Le génome d'environ 10,8 kilobases est composé d'une ORF, flanquée de région 5' et 3' non codantes mais essentielles pour la réplication virale, notamment pour le phénomène de cyclisation. (B) Représentation de l'ORF des *Flavivirus*. L'unique ORF des *Flavivirus* code pour une polyprotéine d'environ 3400 acides aminés, clivée en protéines structurales (rose) et non-structurales par les protéases cellulaires (signal peptidase, furine) et la protéase virale (NS2B-NS3). (C) Illustration de la polyprotéine enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Adapté de (Alvarez, Lodeiro, et al., 2005; Howley et al., 2021).

La traduction de cette ORF conduit à la synthèse d'une polyprotéine constituée des protéines structurales (Enveloppe – E, Membrane – prM et Capside – C) ainsi que des protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A-2K-NS4B et NS5) (Rice et al., 1985). Cette polyprotéine subit par la suite des modifications post-traductionnelles, consistant en un clivage des différentes sous-unités la composant. Ainsi, la *signal peptidase* de l'hôte catalyse les clivages C/prM, prM/E, E/NS1 et 2K/NS4B alors que la *serine protease* virale NS2B-NS3 catalyse les clivages NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K et NS4B/NS5 (Howley et al., 2021). À noter, l'enzyme permettant la libération de NS1 et NS2A est encore inconnue pour

le moment, même si les preuves d'une interaction avec une protéase du réticulum endoplasmique ont été évoquées (Falgout & Markoff, 1995). Les protéines structurales participent majoritairement à l'organisation de la particule virale et aux premières étapes du cycle viral, comme nous le verrons plus loin. Les protéines non-structurales, quant à elles, interviennent lors du cycle viral en formant notamment le complexe répliatif, qui permet l'amplification du génome viral. Dans cette tâche, la protéine NS5 a un rôle tout particulier, puisqu'elle porte en N-terminal l'activité méthyltransférase (MTase) essentielle au capping de l'ARN viral et en C-terminal l'activité ARN polymérase ARN dépendante (*RNA dependent RNA polymerase*, RdRp). À noter, les protéines non-structurales, ainsi que la protéine de capsid participent aux interactions avec l'hôte, particulièrement en ce qui concerne le détournement des voies de réponses cellulaires ou encore des voies métaboliques. L'efficacité de la traduction du génome et donc l'efficacité répliatif du virus déterminent sa virulence, les régions non-codantes 5' et 3' jouent pour cela un rôle essentiel. La région 5'UTR, située en amont du génome codant, est très conservée parmi les *Flavivirus*. En effet, une seule modification dans sa séquence nucléotidique peut conduire à une atténuation (C. Y.-H. Huang et al., 2013). Cette région non codante est relativement courte, mais joue un rôle capital dans la traduction, ainsi que la répliatif du génome viral. En effet, la traduction est favorisée par la coiffe portée par le génome viral en 5', les *Flavivirus* n'en possédant pas peuvent avoir un taux d'infection réduit de 1000 fois (Rice et al., 1989). Dans une moindre mesure, la présence de sites d'entrée interne pour les ribosomes (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) pourrait participer à l'initiation de la traduction de la polyprotéine virale (Song et al., 2019). Concernant, la répliatif de l'ARN viral, la synthèse des brins antisens nécessite la cyclisation du génome. Or, la région 5'UTR est critique dans ce phénomène, celui-ci est médié par des interactions ARN – ARN, possibles grâce à des régions d'ARN complémentaires dont une en 5' et 3' UTR, respectivement les éléments 5' – 3' CS (*Cyclization Sequence*) et l'élément 5' – 3' UAR (*Upstream AUG Region*) (Figure 7) (Alvarez,

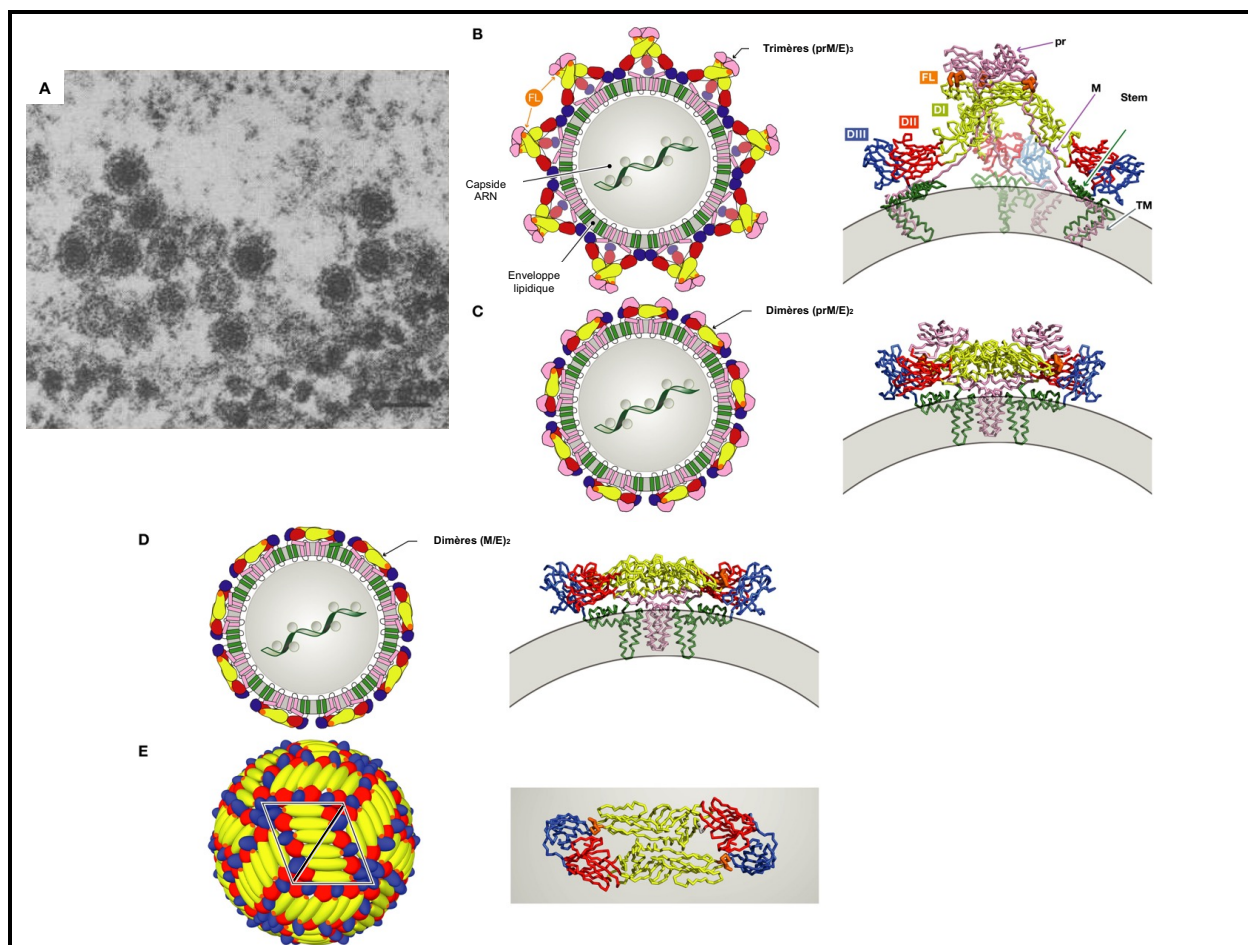
De Lella Ezcurra, et al., 2005; Alvarez, Lodeiro, et al., 2005). Les interactions entre ces régions complémentaires aboutissent à la formation d'une structure semblable à celle montrée en **Figure 7**. Par ailleurs, on peut distinguer plusieurs structures caractéristiques, composant la région 5'UTR chez les *Flavivirus*. Tout d'abord, la tige-boucle A (*Stem Loop A*, SLA), longue de 70 nucléotides, qui via un promoteur sur son bord 5' va recruter la NS5 et permettre l'initiation de la production d'ARN complémentaire de polarité négative (Filomatori et al., 2006). À partir de ce site, la NS5 peut alors polymériser en 3' du génome préalablement cyclisé. La tige-boucle B (*Stem Loop B*, SLB) longue de 30 nucléotides, quant à elle, porte la séquence 5'UAR qui comme nous l'avons vu intervient dans la cyclisation du génome (Alvarez, Lodeiro, et al., 2005). Ces deux structures (SLA et SLB) sont séparées par une séquence poly(U) permettant leur bon fonctionnement, notamment par l'abolition d'éventuelles interactions. La région 3'UTR est conservée au sein des *Flavivirus*, même si sa longueur varie entre 400 et 700 nucléotides. Elle regroupe trois domaines distincts, constitués de structures tige-boucle (*Stem Loop*, SL) et *dumbbell* (DB). Le premier, juste après le codon stop, réunit une région hypervariable et une région semi-variable, contenant toutes deux des structures secondaires de type SL (Villordo et al., 2016). Le deuxième domaine, modérément conservé, est composé de deux *dumbbell* (DB1 et 2) (Villordo et al., 2016). Enfin, le dernier domaine, hautement conservé, contient une *small hairpin* (sHP) et une 3'SL (Villordo et al., 2016). Chacun de ces domaines est séparé du suivant par un *spacer* permettant, à l'instar des séquences poly(U) en 5'UTR, le bon fonctionnement des domaines. Abordons maintenant le rôle de certaines de ces structures. La 3'SL du domaine 3 interagit avec les protéines hôtes et virales pour réguler la synthèse d'ARN viral et la traduction (Blackwell & Brinton, 1997; Paranjape & Harris, 2007). La sHP, pour sa part, intervient plutôt dans la réplication virale chez le moustique vecteur (Villordo & Gamarnik, 2013). D'autre part, même si le domaine 1 est composé de régions variables, certaines de ses structures sont très conservées, et ont un rôle surtout lors de la réplication chez

l'hôte mammifère. En effet, certaines SL le composant (SLI et SLII) ont une résistance avérée à l'exoribonucléase hôte (Xrn1), on leur a donc donné le nom de xrRNA (Akiyama et al., 2016; E. G. Chapman et al., 2014). Le génome viral possède donc dans sa région 3'UTR des structures propres favorisant tantôt l'infection chez les moustiques (sHP), et tantôt l'infection de mammifères (xrRNA). Par ailleurs, la région 3'UTR intervient dans la formation des ARN flaviviraux subgénomiques (*subgenomic flavivirus RNAs*, sFRNA), par le biais des DB1 et 2 mais aussi des xrRNA (Akiyama et al., 2016; E. G. Chapman et al., 2014). La région 3'UTR a régulièrement fait l'objet d'explorations pour tenter d'identifier quelle région pouvait être critique pour la réplication virale. Les avancées faites dans ce domaine tendent à montrer que ce n'est pas la séquence qui importe mais bel et bien la forme prise par les structures secondaires de la région 3'UTR. Une forte pression évolutive semble peser sur ces structures, puisqu'elles sont très conservées chez les *Flavivirus*.

#### I.1.vi.b. Organisation de la particule virale

Les *Flavivirus* se présentent sous la forme d'une particule virale sphérique d'une taille moyenne de 50 nm (Kiermayr et al., 2004). Ce sont des virus dits enveloppés composés d'une membrane lipidique où sont enchâssées des protéines virales et d'une nucléocapside englobant l'ARN viral. Leur nucléocapside est une structure dense aux électrons de 30 nm ayant une densité d'environ  $1,30 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , et présentant une structure icosaédrale (Kiermayr et al., 2004). Elle est composée de dimères de protéines C possédant une face hydrophobe permettant l'interaction avec la membrane virale et une face polaire qui interagit avec l'ARN viral (Ma et al., 2004). Cette interaction étant de nature électrostatique. La nucléocapside est entourée d'une enveloppe lipidique dont la composition en lipides varie selon l'hôte, les virions enveloppés sédimentent entre 170S et 210S avec une densité comprise entre  $1,19$  et  $1,23 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Récemment, des études par cryomicroscopie électronique et cristallographie par rayons X ont montré que la surface externe des *Flavivirus* était relativement lisse, et par ailleurs constituée majoritairement de deux

protéines E et M (Hasan et al., 2018; Kuhn et al., 2002). La glycoprotéine E d'une part, l'antigène majeur des *Flavivirus*, retrouvé sous la forme de 90 dimères antiparallèles s'associant en trimères parallèles de dimères recouvrant complètement la bicouche lipidique (X. Zhang et al., 2017). La protéine E contient quatre domaines, dont un domaine transmembranaire et trois ectodomaines EDI, EDII et EDIII (Hasan et al., 2018). Parmi ces domaines, EDII est impliqué dans la fusion des particules virales avec les cellules cibles lors de l'entrée du virus, alors qu'EDIII est le site privilégié de liaison aux récepteurs cellulaires (Y. Chen et al., 1997; Modis et al., 2004; Thullier et al., 2001). De plus, EDIII contient les principaux épitopes reconnus par les anticorps (Modis et al., 2004; Thullier et al., 2001). Enfin, la protéine M, dérivé protéolytique de la protéine prM, est en lien étroit avec la protéine d'enveloppe. Cependant, ces deux protéines sont amenées à s'organiser différemment selon la situation (**Figure 8**).



**Figure 8 – Structure de la particule virale de *Flavivirus*.** (A) Particules virales de JEV (*Japanese Encephalitis Virus*) au microscope électronique. (B, C, D, E) Schéma de la maturation de la particule virale avec la conformation des protéines d'enveloppe à chaque stade de la maturation. DI, DII et DIII représentent les 3 domaines de la



protéine E. pr et M représentent la protéine prM clivée par la suite en protéine M. FL correspond à la boucle de fusion exposée en condition acide et permettant l'association la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire Adapté de (Okuno et al., 1984; Rey et al., 2018).

Ainsi, un virion mature aura à sa surface externe plusieurs dimères de protéine E en position tête-bêche, et en lien étroit avec deux protéines M (Hasan et al., 2018). Alors qu'une organisation trimérique des protéines E, confère au complexe sa capacité fusogénique dans les endosomes (Hasan et al., 2018; Modis et al., 2004). Ce changement de conformation est possible grâce à un réarrangement rotatif des protéines E autour d'axes de symétrie, et ce à bas pH (Modis et al., 2004). On retrouve également cette conformation trimérique chez le virion immature, mais pour inhiber la capacité fusogénique du complexe, qui pourrait alors fusionner de manière précoce dans la voie de sécrétion, la protéine prM vient masquer le peptide de fusion (Guirakhoo et al., 1992; Y. Zhang, 2003). Lors de la maturation virale, ce peptide pr est clivé par les furines cellulaires, conférant sa structure finale aux virions sécrétés (Stadler et al., 1997). La surface externe du virion est donc une structure dynamique qui connaît des variations essentielles à l'infection virale, ce phénomène a été qualifié de respiration virale (Medits et al., 2020). Participant à ce dynamisme, le clivage de prM n'est pas toujours complet aboutissant à des virions partiellement matures, ce qui pourrait avoir une implication importante dans la capacité de neutralisation par les anticorps et l'entrée virale (Rey et al., 2017).

### *I.1.vii. Cycle viral*

#### *I.1.vii.a. Attachement et entrée*

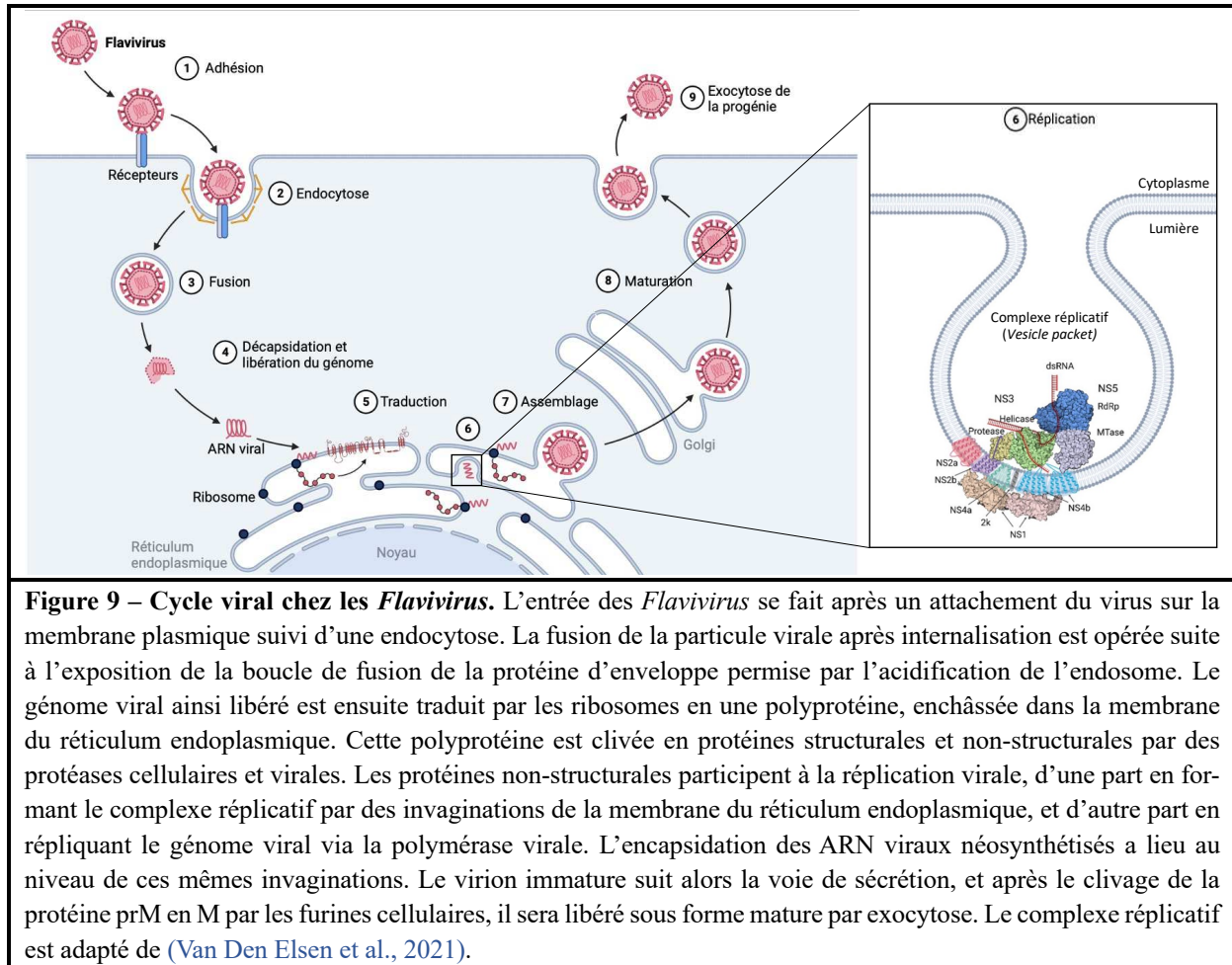
Les *Flavivirus* sont déposés au sein de l'épiderme de l'hôte par un moustique vecteur lors d'un repas sanguin, où ils rencontrent des cellules permissives telles que les kératinocytes ou les cellules dendritiques résidentes de la peau, les cellules de Langerhans (Briant et al., 2014). L'infection fait intervenir une étape initiale d'attachement et d'entrée dans la cellule hôte. Cette étape est supposée être médiée pour les *Flavivirus* par une endocytose récepteur-dépendante, suivie par une fusion intracellulaire, même si aucun récepteur spécifiquement dévolu à l'entrée

de tel ou tel *Flavivirus* n'a pu être pleinement identifié pour le moment (**Figure 9.1**) (Laureti et al., 2018). Cependant, au fil du temps, plusieurs facteurs cellulaires ou extracellulaires participant à l'adhésion ont pu être caractérisés (Laureti et al., 2018). La reconnaissance et l'adhésion à la cellule hôte font majoritairement intervenir la protéine E. Ainsi, la protéine E est capable de lier les glycosaminoglycanes membranaires, notamment les plus sulfatés, tels que l'héparane sulfate permettent l'attachement de la particule virale et facilitant sa reconnaissance par les facteurs d'entrée cellulaire (Hilgard, 2000). Parmi eux, les récepteurs de type C-lectines qui lient les glycanes riches en mannose auraient un rôle prépondérant. En effet, DC-SIGN ou CD209, bien connu dans l'infection par le HIV, interviendrait également dans l'adhésion de DENV sur les cellules dendritiques (Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneetrithep et al., 2003). De plus, le récepteur au mannose ou CD206 serait le récepteur d'entrée primaire du virus au sein des macrophages (Lo et al., 2016). Ces récepteurs seraient importants dans l'infection par les particules virales produites chez le vecteur qui arborent une quantité plus grande de glycanes fortement mannosés et en regard, moins de glycanes complexes. Par ailleurs, les récepteurs de la phosphatidylsérine (PtdSer) impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques, feraient partie intégrante des facteurs d'entrée sur lesquels peuvent s'appuyer les *Flavivirus*. La PtdSer est un phospholipide normalement retrouvé à la face interne de la membrane cellulaire et dans la voie de sécrétion, dont l'exposition à la face externe sert de signal « mange-moi ». Lors de sa formation dans la cellule hôte, le bourgeonnement de la particule virale au sein du réticulum endoplasmique (RE) lui confère une composition riche en PtdSer. Ces néovirus pourront alors être reconnus directement par le récepteur TIM, notamment exprimés par une variété de cellules immunitaires (Meertens et al., 2012). Les PtdSer retrouvés en surface virale peuvent également être reconnus par le biais de récepteurs de la famille TAM, tels que AXL, TYRO3 ou MER, via l'interaction de protéines de liaisons Gas6 et ProS (Meertens et al., 2012). Toutefois, ces récepteurs participent à l'entrée mais ne sont pas

essentiels à l'infection, puisque l'infection reste possible chez des souris déficientes pour les récepteurs TAM (Hastings et al., 2017). Il faut noter la possibilité pour DENV d'entrer de manière facilitée grâce au phénomène d'ADE. L'opsonisation de la particule virale par des anticorps subneutralisants, lors d'une infection secondaire, conduit alors à sa reconnaissance par le récepteur Fc (S. Halstead & O'Rourke, 1977). De manière alternative, la claudine-1 a été rapportée comme récepteur potentiel de DENV, mais cette fois en interagissant avec la forme immature de la protéine de membrane prM (Che et al., 2013). Cette dernière donnée illustre l'importance de la dynamique structurale des virions sécrétés sur les mécanismes d'entrée, puisque comme nous l'avons vu précédemment, un nombre non-négligeable de particules virales sont retrouvées partiellement mature et pourraient se servir de ce moyen d'entrée. Pour abonder sur cet aspect, il est possible d'évoquer la flexibilité de la particule virale selon la température, ceci influant sur la capacité d'entrée du virus. Ainsi, la particule virale présente une surface davantage lisse à température relativement basse, correspondant à l'infection de l'hôte invertébré, alors qu'à 37°C chez l'hôte mammifère, la surface pourtant relativement lisse présente plus de reliefs améliorant l'exposition de la protéine d'enveloppe et facilitant l'accès aux lipides constituant l'enveloppe, dont la PtdSer (Fibriansah et al., 2013). L'expression des déterminants permettant l'entrée des *Flavivirus* chez les mammifères conditionne le tropisme cellulaire de l'infection. La recherche de ces déterminants est encore à approfondir pour déterminer les éléments essentiels à l'entrée virale, permettant d'expliquer le tropisme cellulaire lié à chaque *Flavivirus*.

Après liaison à ces récepteurs, la particule virale est internalisée par endocytose dépendantes ou non de la clathrine et rejoint des endosomes précoces ou intermédiaires qui mûrissent en endosomes tardifs (**Figure 9.2**) (M. Li et al., 2020; Van Der Schaar et al., 2008). La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale intervient lors du trafic endosomal, où à la faveur d'un pH acide optimal, le changement de conformation des dimères de protéine E en trimères de protéine E confère sa capacité fusogénique au virus, en exposant la boucle de

fusion (**Figure 9.3**) (Hasan et al., 2018; Modis et al., 2004). Suite à cette fusion, la capsid virale est libérée dans le cytoplasme cellulaire, rendant le génome accessible après décapsidation (**Figure 9.4**).



**Figure 9 – Cycle viral chez les *Flavivirus*.** L'entrée des *Flavivirus* se fait après un attachement du virus sur la membrane plasmique suivi d'une endocytose. La fusion de la particule virale après internalisation est opérée suite à l'exposition de la boucle de fusion de la protéine d'enveloppe permise par l'acidification de l'endosome. Le génome viral ainsi libéré est ensuite traduit par les ribosomes en une polyprotéine, enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Cette polyprotéine est clivée en protéines structurales et non-structurales par des protéases cellulaires et virales. Les protéines non-structurales participent à la réplication virale, d'une part en formant le complexe répliatif par des invaginations de la membrane du réticulum endoplasmique, et d'autre part en répliquant le génome viral via la polymérase virale. L'encapsidation des ARN viraux néosynthétisés a lieu au niveau de ces mêmes invaginations. Le virion immature suit alors la voie de sécrétion, et après le clivage de la protéine prM en M par les furines cellulaires, il sera libéré sous forme mature par exocytose. Le complexe répliatif est adapté de (Van Den Elsen et al., 2021).

#### I.1.vii.b. Réplication et progénie

Comme nous l'avons vu, l'ARN viral, de polarité positive, est directement traduit en une polyprotéine précurseur enchâssée dans la membrane du RE et par la suite clivée (**Figure 9.5**). Après la traduction de l'ARN génomique, les protéines non-structurales recruteront le génome dans un complexe de réplication où NS5 permettra la production de complémentaires négatifs. La vésicule répliatrice (*Vesicles Packets*, VPs) des *Flavivirus* est un organeite spécifique dérivé d'invaginations de la membrane du RE en direction de la lumière de celui-ci, donnant naissance à des vésicules contenant plusieurs complexes répliatifs (**Figure 9.6**) (Cortese et al., 2017; Welsch et al., 2009). Le rôle de NS4A et NS4B est évoqué dans la formation de ces

invaginations, même si pour NS4B un rôle direct n'a pas été démontré clairement. Ainsi, selon leur mode d'association ou de clivage, ces protéines pourraient induire une courbure plus ou moins importante des membranes (Kaufusi et al., 2014; Miller et al., 2007). À ces protéines, vient s'ajouter une activité de la protéine NS1 essentielle à la formation du complexe réplcatif, probablement par le biais d'interactions avec NS4A, NS4B et les dérivés protéolytiques de NS4A-2K-NS4B (Lindenbach & Rice, 1999; Płaszczycza et al., 2019; Youn et al., 2012). Par ailleurs, la formation de VPs nécessite des ajustements dans la composition lipidique de la membrane du RE, expliquant l'importance du contrôle du métabolisme lipidique lors de l'infection par un *Flavivirus*, notamment DENV (Heaton et al., 2010). Les VPs sont liées au cytosol par une ouverture d'environ 11 nm, limitant l'accès à l'ARN viral par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptor*, PRR) et protégeant les composants du complexe de la dégradation (Uchida et al., 2014).

Une fois l'ARN viral recruté au site de réplication celui-ci se circularise, en faveur de l'activité de réplication (Z.-Y. Liu et al., 2016). NS5 est alors recruté via la région 5'UTR du génome viral et orchestre la néosynthèse de brins antisens complémentaires au génome viral, conduisant à la formation transitoire d'ARN double-brin (Filomatori et al., 2006). Ces brins de polarité négative serviront alors de matrice pour la production massive d'ARN viral de sens positif, la synthèse virale est dite asymétrique puisqu'on note une quantité dix fois plus importante d'ARN sens qu'antisens (Lindenbach & Rice, 1997). Les brins sens servent alors à la fois d'ARN messenger et de matériel génétique à emballer pour la formation de nouveaux virions. Il faut aussi noter que durant la réplication, en sus de génomes complets, s'accumulent des ARN viraux subgénomiques (sfRNAs) ayant une variété d'activités provirales (Bidet et al., 2014; K.-C. Lin et al., 2004; Manokaran et al., 2015; Moon et al., 2012). Lorsque les protéines virales C, prM et E sont retrouvées en quantité plus importante dans la membrane du RE, il est supposé que celles-ci entrent « en compétition » avec les ribosomes pour l'association avec les ARN

viraux néosynthétisés, notamment la protéine C (Howley et al., 2021; Tan et al., 2020). Ces interactions grandissantes conduisent donc à l'agencement des protéines virale avec l'ARN et au bourgeonnement de la particule virale néoformée à proximité du pore des VPs, dans la lumière du RE (Figure 9.7) (Welsch et al., 2009). Ces données suggérant que le transfert direct de l'ARN de la vésicule vers le virion qui bourgeonne contribuerait à la sélectivité de l'encapsulation (Welsch et al., 2009). Par ailleurs, il faut rappeler que la capacité à former des particules virales, alors vides et désignées comme *sub-viral particles*, est permise par la surexpression conjointe des protéines virales prM et E (P.-G. Wang et al., 2009). Les particules virales immatures empruntent alors la voie de sécrétion en passant par l'appareil de Golgi, où en présence d'un pH réduit et sous l'action des furines cellulaires elles subiront leur maturation (Figure 9.8), puis transitent via des vésicules de sécrétion jusqu'à leur exocytose dans le milieu extracellulaire où elles formeront la progénie virale (Figure 9.9) (Stadler et al., 1997).

#### I.1.vii.c. Tropisme cellulaire

Le tropisme cellulaire lors d'une infection virale détermine la physiopathologie et la clinique associées. Une large variété de lignées cellulaires se sont montrées permissives à l'infection par ZIKV et DENV, incluant des cellules épithéliales pulmonaires, des cellules hépatiques, des cellules rénales, des cellules endothéliales ou des cellules du système nerveux central ; suggérant que le facteur d'entrée associé à ces *Flavivirus* est conservé et exprimé par différents types cellulaires. Ces virus répliquent initialement au niveau de la peau, où les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules dendritiques (*Dendritic Cells*, DCs) se sont toutes montrées permissives (Hamel et al., 2015). De ce site d'infection primaire, le virus est disséminé dans un premier temps aux nœuds lymphatiques, soit par le biais de DCs infectées, soit libre dans la circulation lymphatique (Howley et al., 2021). Les macrophages résidents des nœuds lymphatiques initient alors, au même titre que les DCs, la réponse immunitaire innée et adaptative, mais tout en servant de support à l'amplification virale, puisqu'ils sont eux aussi permissifs

(Kangwanpong et al., 1995). Les virions produits au niveau des nœuds lymphatiques rejoignent alors le compartiment vasculaire en suivant le drainage lymphatique efférent (Howley et al., 2021). À ce stade, les *Flavivirus* peuvent cibler les cellules sanguines (monocytes) ou les tissus viscéraux, participant à la dissémination virale. Malgré la grande variété de cellules permissives *in vitro*, et de surcroît malgré le fait que ces cellules soient communes à ZIKV et à DENV, le tropisme cellulaire de ces virus varie *in vivo*. Ainsi, pour DENV c'est plutôt le compartiment hépatique (hépatocytes) qui supporte l'infection, même si le virus peut être retrouvé au niveau du système nerveux central, des poumons, de la moelle osseuse, des reins ou du cœur expliquant les manifestations cliniques rares associées à ces organes pouvant être retrouvées en cas d'infection par DENV (Begum et al., 2019). Toutefois, une telle dissémination est de manière générale reliée à l'infection de cellules immunes (macrophages et DCs) ou, dans une moindre mesure, endothéliales, faisant de ces cellules les cibles soutenant la réplication de DENV dans ces tissus (Begum et al., 2019). De son côté, ZIKV a notamment pour tropisme les organes reproducteurs pouvant conduire à la persistance virale dans les fluides corporels (semence, mucus cervical et sécrétions vaginales) et la transmission par voie sexuelle du virus, en ce qui concerne l'organe reproducteur masculin (Miner & Diamond, 2017). Le virus est également capable d'infecter les cellules placentaires pouvant expliquer la transmission materno-fœtale conduisant aux conséquences dramatiques que nous avons vu précédemment (Miner & Diamond, 2017). Une fois passée la barrière placentaire, le virus peut notamment infecter les cellules neurales progénitrices et les astrocytes du fœtus, aboutissant entre autres à des défauts de développement cérébral (Miner & Diamond, 2017). ZIKV est aussi retrouvé dans le rein associé à une virurie importante et au niveau hépatique, mais dans des proportions ne permettant probablement pas de soutenir l'infection (Alcendor, 2018; Miner & Diamond, 2017). Finalement, le tropisme cellulaire commun à DENV et à ZIKV reflète le mode d'infection des *Flavivirus*, avec comme évoqué des sites de réplication initiaux retrouvés au niveau de la peau, des

nœuds lymphatiques et de la circulation sanguine. De plus, il faut ajouter que l'infection secondaire des macrophages et des DCs au niveau de la rate, peut représenter un support relatif à l'infection (Begum et al., 2019; Miner & Diamond, 2017).

#### I.1.vii.d. Persistance virale

La détection du virus Zika au long cours dans le liquide séminal ou le liquide céphal rachidien, suggère la possibilité d'une persistance virale au sein des tissus immuno-privilegiés adjacents à ces sécrétions corporelles. La persistance tissulaire virale est régulièrement associée à des cas de réactivation infectieuse (Suzich & Cliffe, 2018) ou de maladie chronique (Hawman et al., 2013; C. Yang et al., 2023), intervenant à distance de l'évènement infectieux initial. Dans le cas de ZIKV, des études de cas menées sur des enfants exposés *in utero* et des études chez le macaque ont décrit le développement de pathologies post-natales intervenant plusieurs mois après la naissance et donc l'infection (Aragao et al., 2017; Mavigner et al., 2018; Van Der Linden et al., 2016). Ces données corroborent l'hypothèse d'une persistance virale, notamment dans le système nerveux (Hirsch et al., 2017). La persistance virale des *Flavivirus* semble plutôt associée aux virus neurotropes. Ainsi, dans le cas de DENV, la persistance virale n'a seulement été démontrée qu'en de rares occasions, mais semble tout de même possible comme le suppose des études menées *in vitro* sur des cellules eucaryotes (Kurane et al., 1990). Le phénomène de persistance pourrait également être une réalité *in vivo*, le maintien du virus chez des patients immunodéprimés en cas de transplantation rénale ou de moelle osseuse a, en effet, déjà été rapporté (De Souza Pereira et al., 2017; K.-H. Ng et al., 2019). D'ailleurs, dans un cas clinique décrit chez une adolescente de 16 ans, le greffon pourrait être à l'origine d'une infection post-transplantation rénale, en effet, un historique d'infection par DENV a été retrouvé chez le donneur un mois avant la transplantation (Tangnararatchakit et al., 2012).

#### I.1.viii. Les particularités associées aux *Flavivirus*

##### I.1.viii.a. La protéine NS1

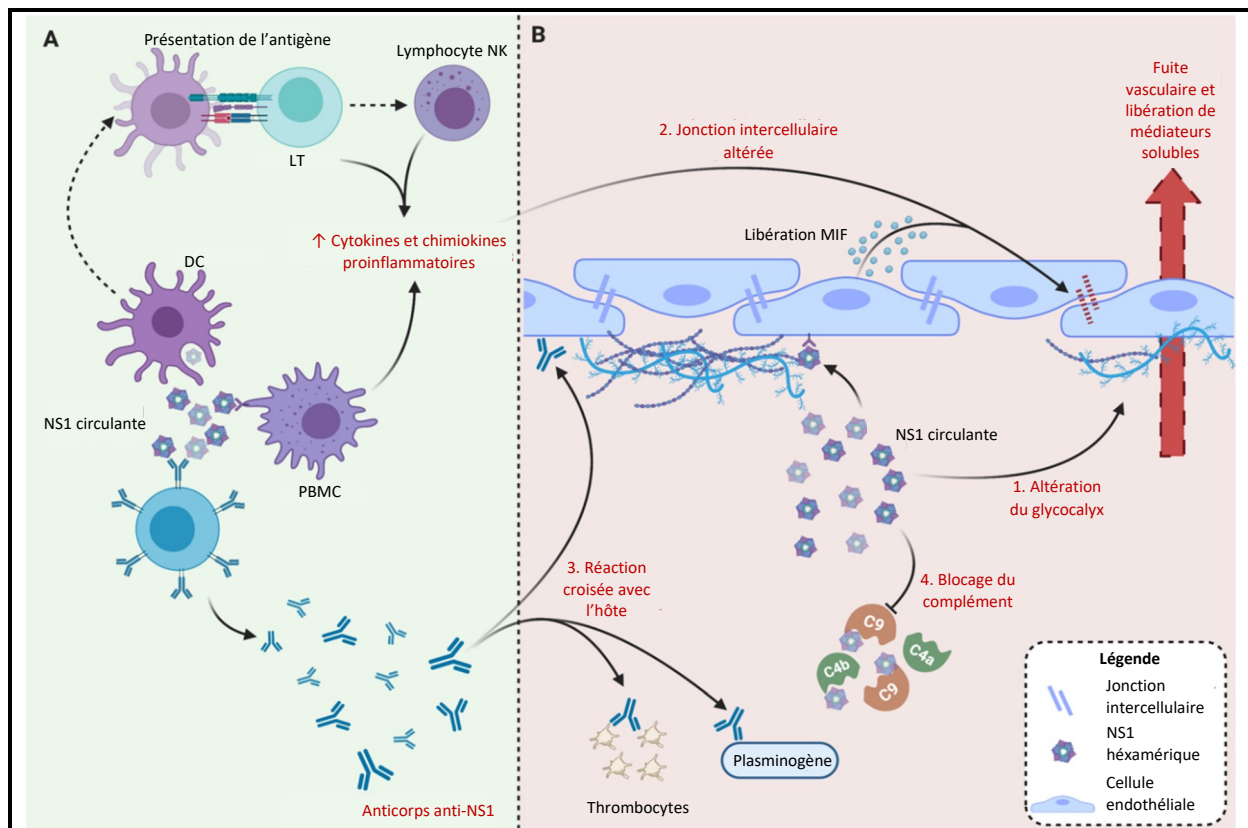


La protéine non-structurale 1 des *Flavivirus* est remarquable sur plusieurs aspects. Cette protéine d'environ 46 kDa est hautement conservée et est retrouvée sous forme homodimérique dans la voie de sécrétion de la cellule hôte et sous forme hexamérique pour la forme sécrétée, permettant l'élaboration de tests diagnostiques d'infection par les *Flavivirus*, basé sur la détection de cette protéine dans la circulation (Muller et al., 2017). Au-delà de sa participation à la formation du complexe de réplication comme nous l'avons vu, la protéine NS1 a une importance sur la physiopathologie induite lors de l'infection par les *Flavivirus*. Ces aspects ont surtout été mis en avant pour la NS1 de DENV et ce sont donc eux que nous allons à présent développer.

La NS1 de DENV, à l'image des autres *Flavivirus*, est divisée en trois régions fonctionnelles, à savoir, le domaine  $\beta$ -roll, le domaine *wing* et le domaine  $\beta$ -ladder (Akey et al., 2014). Après la synthèse et la protéolyse de la polyprotéine virale, la NS1 est glycosylée sur les résidus N130 et N207. Le processus de maturation post-traductionnelle aboutit à la formation de l'homodimère NS1 et une partie de ces glycoprotéines matures est transportée à travers le compartiment de Golgi pour atteindre soit la membrane plasmique associée à la membrane, soit le compartiment extracellulaire sous forme de particules lipoprotéiques hexamériques (Gutsche et al., 2011; M. G. Jacobs et al., 2000). La NS1 soluble sécrétée (sNS1) présente une grande similitude structurale avec les lipoprotéines de haute densité transportant des triglycérides, des esters de cholestérol et des phospholipides (Gutsche et al., 2011). Plus récemment, la protéine NS1 a été retrouvée dans l'espace extracellulaire, à la surface des lipoprotéines de haute et de basse densité (HDL et LDL), ainsi qu'en association avec des vésicules extracellulaires pouvant correspondre aux exosomes. Aussi, la forme hexamérique historiquement rapportée comme majoritaire parmi les formes sécrétées pourraient en réalité être supplantée par une forme tétramérique lors de l'infection, comme le montre des études cryo-microscopie électronique (Shu et al., 2022). Pendant la phase aiguë de l'infection par DENV, des niveaux élevés de sNS1 circulent dans le sang,

jusqu'à  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Alcon et al., 2002). Ces dernières années, des avancées ont été réalisées dans la compréhension du rôle de sNS1 dans la pathogenèse des formes sévères de DENV (**Figure 10**). Il est désormais admis que la sNS1 contribue à la fuite vasculaire retrouvée dans les formes hémorragiques. En effet, la sNS1 a la capacité d'induire une hyperperméabilité au niveau de la barrière endothéliale. Après sécrétion, la sNS1 circulant librement se fixe à la surface des cellules endothéliales, entraînant la surexpression des sialidases (Neu1, Neu2, Neu3) et de l'héparanase par les cellules endothéliales (Puerta-Guardo et al., 2016). Il en résulte une détérioration du glycocalyx endothélial, participant au dysfonctionnement de la barrière et à la fuite de plasma (D. R. Glasner et al., 2017; Puerta-Guardo et al., 2016). Ce mécanisme a été confirmé dans plusieurs lignées de cellules endothéliales où une diminution de la résistance électrique trans-endothéliale est observée en réponse à la NS1 des quatre sérotypes de DENV (D. R. Glasner et al., 2017; Puerta-Guardo et al., 2016). Parallèlement à la perturbation du glycocalyx, il convient de discuter du réarrangement des jonctions intercellulaires. La forme soluble de NS1 perturbe les jonctions serrées et les jonctions adhérentes indépendamment des cytokines. Plusieurs protéines de jonction intercellulaire seraient concernées, notamment la VE-cadhérine ou la zonula occludens-1, probablement par le biais d'une internalisation médiée par la clathrine et/ou d'une phosphorylation (D. R. Glasner et al., 2018). Outre les mécanismes indépendants des cytokines, sNS1 a également la capacité d'induire l'expression de cytokines vasoactives, notamment l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , qui peuvent être associées au développement de troubles vasculaires dans les cas graves de dengue (Beatty et al., 2015). Il est d'ailleurs intéressant de noter que la sécrétion de ces cytokines est, entre autres, induite par un complexe formé entre NS1 et les lipoprotéines de haute densité (Benfrid et al., 2022). L'expression du facteur inhibiteur de la migration des macrophages (*macrophage migration inhibitory factor*, MIF), dans le cadre de la réponse des cellules endothéliales à sNS1, pourrait jouer un rôle clé dans l'altération des jonctions intercellulaires et la fuite vasculaire qui s'ensuit (H.-R. Chen et al., 2016). Enfin, la sNS1

serait impliquée dans les stratégies d'évasion immunitaire virale, principalement par le blocage du complément (Avirutnan et al., 2010, 2011). En conséquence, ces interactions ont un impact sur l'activité du complément et la neutralisation médiée par le complément (Conde et al., 2016; Thiemmecca et al., 2016). Tous ces éléments ont permis de qualifier sNS1 de toxine virale et d'en faire une cible d'intérêt dans la stratégie vaccinale contre la DENV (Lebeau et al., 2021).

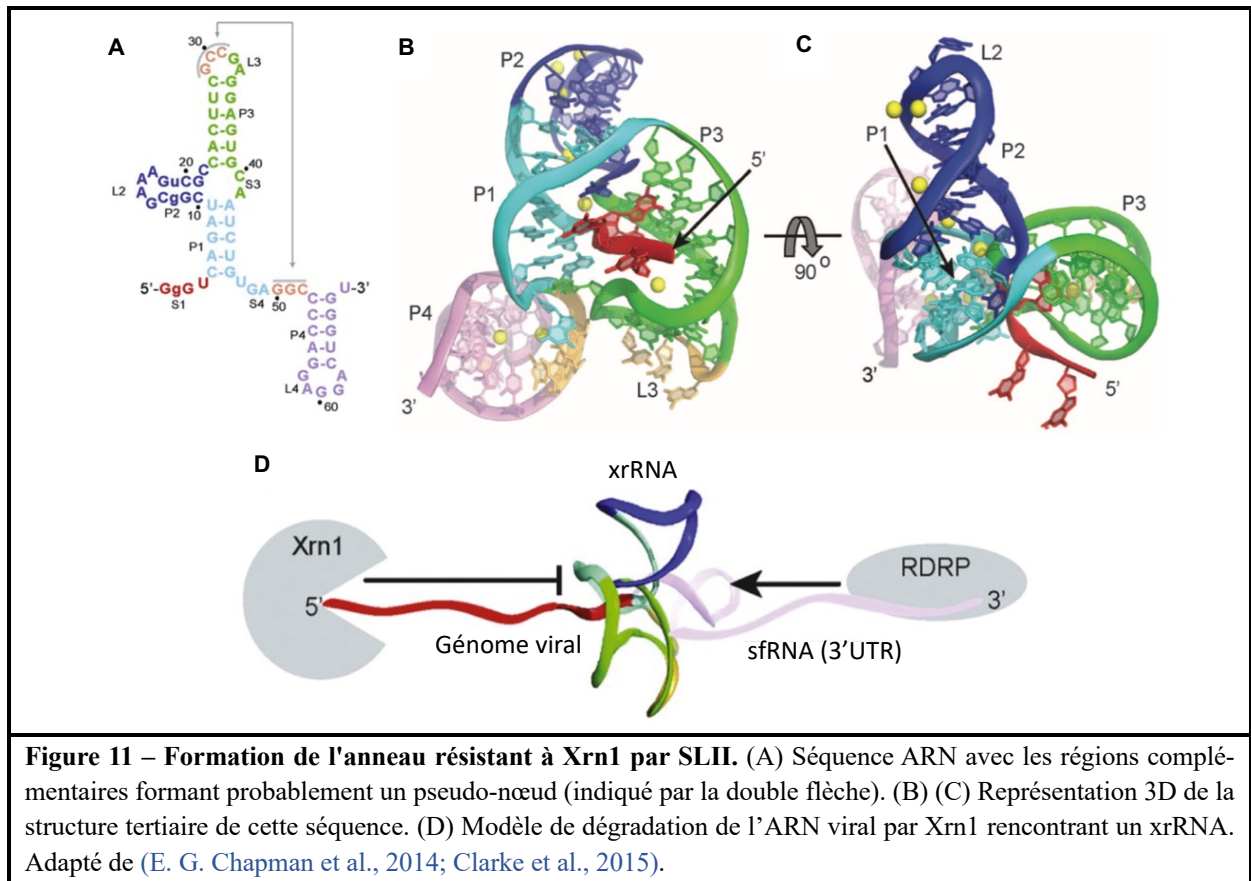


**Figure 10 – Implications de la NS1 sécrétée sur la pathogenèse chez DENV.** (A) La réponse immunitaire dirigée contre la NS1 de DENV. La forme hexamérique de NS1 induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale. Les lymphocytes B produisant des anticorps permettant la clairance de la protéine virale alors que les lymphocytes T et NK produisent des cytokines pro-inflammatoires et chimiokines permettant l'établissement de la réponse immunitaire. (B) La pathogenèse liée à NS1. La NS1 circulante est liée à l'altération du glycocalyx (1) et de la sécrétion du facteur inhibiteur de migration des macrophages (MIF) par les cellules endothéliales. La sécrétion de cytokines et de médiateurs vasoactifs par les cellules immunitaires, associée à MIF, aboutit à l'altération des jonctions serrées liant les cellules endothéliales (2). La forme hexamérique de NS1 est également associée à la production d'anticorps cross-réactifs ciblant les cellules endothéliales, les plaquettes et le plasminogène (3). Enfin, NS1 est liée à l'évasion immunitaire du virus de la Dengue en inhibant les facteurs C4b et C9 du complément (4). Adapté de (Lebeau et al., 2021).

### I.1.viii.b. Les sRNA

Les sRNA sont des fragments courts d'ARN viral d'environ 0,5 kb, dérivés de la région 3'UTR du génome des *Flavivirus*. Ils s'accumulent dans les cellules au cours de l'infection, tant

chez le vecteur arthropode que chez l'hôte mammifère. Ils sont obtenus suite à une dégradation incomplète de l'ARN génomique viral par l'exonucléase cellulaire Xrn1. L'activité 5'-3' exoribonucléasique de cette enzyme est en effet interrompue à cause de structures tertiaires formées dans la région 3'UTR (**Figure 11**) (Funk et al., 2010). Plusieurs séquences de la région 3'UTR peuvent aboutir à la formation de sfRNA (SLI, SLII, DB1 et DB2) (Clarke et al., 2015; Funk et al., 2010). Des mutations perturbant la structure tertiaire de xrRNA1, permettront la dégradation de l'ARN viral jusqu'à xrRNA2, conduisant à la formation de sfRNA2 en lieu et place de sfRNA1 (Kieft et al., 2015). Il en va de même pour les autres types de sfRNA. Cependant, seule l'accumulation de sfRNA1 entiers a un rôle dans l'efficacité de la réplication virale, l'effet cytopathique et la virulence des *Flavivirus* chez l'hôte mammifère (Kieft et al., 2015; Pijlman et al., 2008). Alors que chez les arthropodes, les sfRNA de longueur plus modeste (sfRNA2, 3 et 4) pourraient être associés à l'inhibition de la réponse ARN interférents (RNAi) observée (Göertz et al., 2018; Moon et al., 2015). Effectivement, lors de l'infection d'arthropodes, on observe une modulation de la production de sfRNA1 consécutive à l'apparition de mutations, qui empêchent la structure tertiaire de xrRNA1 de se mettre en place. Lors du retour dans un hôte mammifère, ces mutations sont révertées aboutissant de nouveau à l'accumulation des sfRNA1 (Kieft et al., 2015). Nous avons donc encore un exemple de l'adaptabilité dont font preuves les *Flavivirus*, selon l'hôte qu'ils infectent. Parmi les fonctions de ces ARN, on retrouve la capacité d'antagoniser l'immunité innée, en limitant la mise en place de la réponse IFN et l'expression des gènes stimulés par l'interféron (*Interferon Stimulated Genes*, ISGs) (Bidet et al., 2014; Manokaran et al., 2015; Schuessler et al., 2012). Enfin, les sfRNA participent à régulation de l'homéostasie des ARNm hôtes, en inhibant Xrn1 (Moon et al., 2012).



## I.2. La réponse immune dirigée contre ZIKV et DENV : implications de l'immunométabolisme

Le système immunitaire est un réseau complexe de cellules et de molécules qui protègent l'organisme contre les agressions. Relativement récemment, un intérêt grandissant a été porté à la régulation de ce réseau par le métabolisme, donnant naissance à la notion d'immunométabolisme. L'étude de l'immunométabolisme pourrait permettre d'appréhender comment l'obésité favorise l'inflammation dans des maladies telles que l'arthrite (Alivernini et al., 2019). Et également de comprendre comment des drogues agissant sur le métabolisme ou des métabolites, comme le méthotrexate ou le 25-hydroxycholestérol, peuvent se trouver utiles dans le cadre du traitement de pathologies d'origine infectieuse (Beck et al., 2019; S.-Y. Liu et al., 2013).

### I.2.i. Immunométabolisme et cancer

Une bonne introduction à l'immunométabolisme est son apport dans la compréhension et le traitement des pathologies d'origine cancéreuse. En effet, l'étude moléculaire de la pathologie

du cancer a été majeure dans la compréhension des voies de signalisation cellulaire et récemment de l'immunométabolisme. Sous l'appellation de cancer sont regroupées les pathologies qui ont pour point commun la présence d'une néoplasie due à la division anarchique des cellules et ceci potentiellement dans tous les tissus et organes du corps. Certes, le métabolisme des cellules cancéreuses est d'une importance capitale pour le développement de ces pathologies car il est modifié afin de supporter leur développement. Mais l'environnement métabolique des cellules influe également fortement sur le système immunitaire en participant à l'immunosuppression et aux défaillances du système immunitaire dans la clairance des cellules tumorales (Leone & Powell, 2020). En effet, les tumeurs sont capables de moduler la concentration des nutriments essentiels à la fonction des cellules immunitaires réduisant leur infiltration dans le tissu tumoral, ce qui est généralement associé à un meilleur pronostic (Pagès et al., 2010).

Le microenvironnement tumoral est particulier et découle du métabolisme des cellules tumorales. Celui-ci repose principalement sur la glycolyse pour permettre la production importante de biomasse, représentée par les acides aminés, les nucléotides et les lipides, nécessaire à leur division effrénée. Ceci conduit inexorablement à un appauvrissement du pool de glucose disponible intra-tumeur (Voelxen et al., 2018). Or, la diminution de la concentration en glucose a été associée à une baisse de l'infiltration et de la réactivité du système immunitaire, notamment des lymphocytes T (Ottensmeier et al., 2016). Ainsi, les lymphocytes T cytotoxiques suite à une déprivation en glucose présentent un déficit de la production d'IFN- $\gamma$ , un effecteur clé sécrété par ces cellules infiltrant les tumeurs, (C.-H. Chang et al., 2015). Cette diminution est induite par la liaison de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) avec la région 3'UTR de l'ARNm de l'IFN- $\gamma$ , lorsque l'enzyme glycolytique n'est pas dévolue à son rôle métabolique, à savoir en cas de faible quantité de glucose (C.-H. Chang et al., 2013). Le phosphoenolpyruvate (PEP) est un métabolite intermédiaire de la glycolyse essentiel aux réponses anti-tumeur des lymphocytes T, dont la diminution par manque de glucose pourrait altérer les

fonctions effectrices des lymphocytes T (P.-C. Ho et al., 2015). Le PEP soutient la signalisation induite par le récepteur des lymphocytes T (*T Cell receptor*, TCR) et le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT) (P.-C. Ho et al., 2015).

*I.2.ii. Au niveau systémique : interconnexions entre le statut métabolique de l'hôte et les maladies infectieuses*

Les maladies métaboliques (dont le diabète de type 2 et l'obésité) représentent un risque croissant pour la population mondiale, notamment par leurs complications cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral) et neurologiques (neuropathie diabétique). Selon l'OMS, plutôt réservées, auparavant, aux pays développés et au mode de vie occidental, ces maladies tendent aujourd'hui à se développer dans les pays en développement. Comme dépeint dans cette partie, ces désordres métaboliques peuvent présenter un risque d'infection associé. Il a été également démontré récemment lors de l'épidémie de COVID-19 qu'une des complications de l'infection par SARS-CoV-2 consiste en un développement d'un diabète post-infection.

*I.2.ii.a. Le diabète*

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une hyperglycémie et une inflammation chronique de bas grade. Il est possible de distinguer deux types principaux de diabète. Le diabète de type 1, ou insulino-dépendant, est une maladie auto-immune ciblant les îlots  $\beta$  de Langerhans du pancréas, qui sécrètent l'insuline, hormone clé dans la régulation du glucose circulant. Au contraire, la physiopathologie du diabète de type 2 ou insulino-résistant (*Type 2 Diabetes*, T2D), résulte d'une hyperinsulinémie provoquée par la résistance progressive des cellules à l'insuline, concomitante à l'installation d'une inflammation de bas grade (Berbudi et al., 2020). Le diabète affecte au total plus de 425 millions de personnes en 2016 avec une projection à 630 millions de cas en 2045, la majorité des cas répertoriés étant des cas de diabète insulino-résistant (Berbudi et al., 2020). Au-delà de ses complications cardiovasculaires et

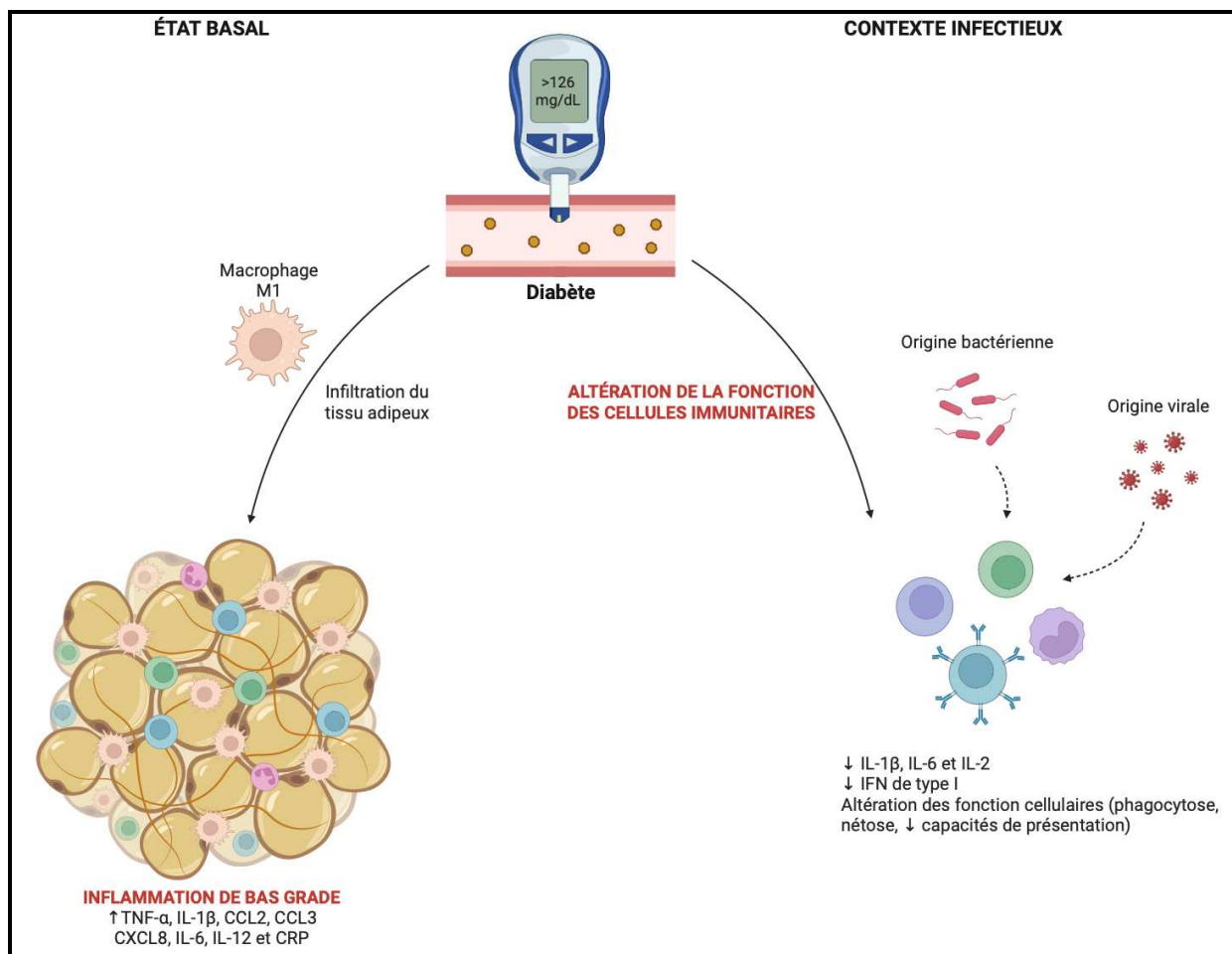
neurologiques, le diabète pourrait conduire à une altération des défenses de l'hôte et à un risque d'infection accru (Berbudi et al., 2020).

En effet, il a été établi que le diabète engendre des déficiences immunitaires sur plusieurs compartiments essentiels à la mise en place d'une réponse immunitaire adéquate. L'hyperglycémie chronique s'accompagne de la production exacerbée de produits avancés de glycation et d'espèces réactives de l'oxygène. Ce statut pro-oxydant favorise l'inflammation chronique de bas grade, délétère pour la réponse immunitaire (**Figure 12**). Notamment, le T2D s'accompagne du recrutement de macrophages polarisés M1 (phénotype pro-inflammatoire) au sein du tissu adipeux où ils vont sécréter des quantités importantes de médiateurs pro-inflammatoires (*Tumor necrosis factor  $\alpha$*  – TNF- $\alpha$ , protéine C-réactive, interleukine-1 $\beta$  – IL-1 $\beta$ , CCL2, CCL3, CXCL8, IL-6 et IL-12) (Hodgson et al., 2015; H. Xu et al., 2003).

Cependant, en cas de stimulation (d'origine bactérienne), il a été constaté que les cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMCs) de patients diabétiques ont une diminution de leurs capacités fonctionnelles en comparaison avec des individus sains. Ainsi, on observe une diminution de l'expression de cytokines telles que l'IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-2 (Mooradian et al., 1991; Ohno et al., 1993; Reinhold & Ansorge, 1996). À noter, l'IL-6 joue un rôle important dans la protection contre les agents pathogènes et dans la réponse immunitaire adaptative en induisant la production d'anticorps et le développement de lymphocyte T effecteurs (Okada et al., 1988). Ces études révèlent donc que l'inhibition de l'expression de ces cytokines en cas d'hyperglycémie peut altérer la mise en place de la réponse immunitaire contre les agents pathogènes. Aussi, une suppression de la production des interférons de type I est rapportée dans des PBMCs cultivés en conditions élevées de glucose et stimulés avec un mimétique d'ARN viral, l'acide polyinosinique:polycytidylique (poly:IC, PIC) (Hu et al., 2018). Globalement, il a aussi été démontré une inhibition du recrutement des leucocytes en contexte diabétique, notamment dû à une altération de l'expression des molécules d'adhésion (M. Kumar et al., 2014). De plus, on



relève pour les macrophages une diminution des capacités antimicrobiennes et ainsi que de la phagocytose (Lecube et al., 2011; Restrepo et al., 2014). Alors que pour les neutrophiles une réduction des capacités antimicrobiennes a été relevée, ceci étant dû à une altération des capacités pro-oxydantes et de dégranulation (Chao et al., 2015; Perner et al., 2003; Stegenga et al., 2008). Aussi, la production de pièges extracellulaires (NETs) ou NETose est diminuée en condition hyperglycémique, conduisant à une susceptibilité accrue aux infections (Joshi et al., 2013). Des déficiences de dégranulation ont également été démontrées chez les lymphocytes *natural killer* (NK) de sujets diabétiques, découlant d'un défaut des récepteurs NKG2D et NKp46 (Berrou et al., 2013). À noter que l'activation du complément est impactée en cas d'hyperglycémie, avec une dysfonction de l'opsonisation par les fragments C4 du complément (Mauriello et al., 2014). De plus, le T2D s'accompagne d'une altération de la présentation des cellules effectrices et donc de la détection des pathogènes. Ainsi, des souris diabétiques ont montré une réduction de l'expression du récepteur *Toll-like 2* (TLR2) et de *Toll/IL-1R domain-containing adaptor protein* (TIRAP) (Martinez et al., 2016), participant à la détection des pathogènes. Cependant des données contradictoires existent, puisqu'il a été démontré que l'expression des TLR par les monocytes et neutrophiles de sujets diabétiques était augmentée (Gupta et al., 2017). En réalité, on sait aujourd'hui que la qualité du contrôle de la glycémie a un impact sur l'expression des TLR. Un sujet avec une glycémie élevée et un mauvais contrôle de sa glycémie présentera une diminution de l'expression des TLR (Gupta et al., 2017). Alors qu'un sujet ayant une hyperglycémie contrôlée présentera une expression plus importante des TLR (Gupta et al., 2017). Les cellules dendritiques, qui sont les principales présentatrices d'antigène (CPA), présentent probablement un retard de recrutement au site d'infection chez des souris diabétiques dans le cadre d'infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Vallerskog et al., 2010). Toujours dans le cadre d'infection par des bactéries intracellulaires, ce délai dans le recrutement s'accompagne d'une phagocytose altérée (Williams et al., 2011).



**Figure 12 – Impact du diabète de type 2 sur l'immunité.** Le développement d'un diabète de type 2 se caractérise par une insulino-résistance et l'installation d'une inflammation de bas grade causée par l'infiltration du tissu adipeux par des macrophages au profil pro-inflammatoire (M1). En contexte infectieux, et malgré l'inflammation de bas grade, les cellules immunitaires des patients diabétiques présentent une déficience de leurs fonctions effectrices pouvant être la source d'un défaut du système immunitaire.

Le diabète a régulièrement été discuté comme un facteur de risque de développer des infections bactériennes et fongiques (Carey et al., 2018; Critchley et al., 2018). Cependant, son implication lors d'infections virales est moins rapportée. Pour autant, une étude incluant près de 190 000 personnes en Chine a montré que les individus diabétiques ont un risque relatif 1,5 fois plus élevée de développer une infection par le virus de l'hépatite B que des individus non diabétiques (X. Zhang et al., 2019). En corrélation avec les désordres immunologiques évoqués précédemment, l'infection par le *Middle East Respiratory Syndrome coronavirus* (MERS-CoV) chez des souris diabétiques s'accompagne d'une inflammation pulmonaire non résolue, à l'origine d'une pathologie exacerbée (Kulcsar et al., 2019). En ce qui concerne le SARS-CoV-2,

l'inflammation chronique retrouvée en cas de TD2 est discutée comme facteur de risque de développer des formes graves de COVID-19 (Norouzi et al., 2021). Par ailleurs, renforçant le lien entre TD2 et infection virale, on sait à présent que le SARS-CoV-2 peut infecter les adipocytes en conduisant à une diminution de la sécrétion d'adiponectine. Ceci participe à la mise en place d'un statut inflammatoire favorable au développement d'une insulino-résistance (Reiterer et al., 2021), expliquant le risque accru de passer de l'état prédiabétique à diabétique chez les patients atteints de COVID-19. Enfin, les complications du diabète incluent notamment des atteintes cardiovasculaires (athérombose, accident vasculaire cérébral, infarctus du myocarde). Ces complications cardiovasculaires sont pour bon nombre rattachées à une atteinte endothéliale, or les formes graves de DENV reposent sur une altération de la barrière endothéliale, c'est pourquoi l'hypothèse est faite dans la littérature que les formes graves d'infection par DENV sont plus susceptibles d'intervenir chez des individus diabétiques du fait de l'atteinte endothéliale préexistante (Htun et al., 2015; Sekaran et al., 2022).

#### I.2.ii.b. L'obésité

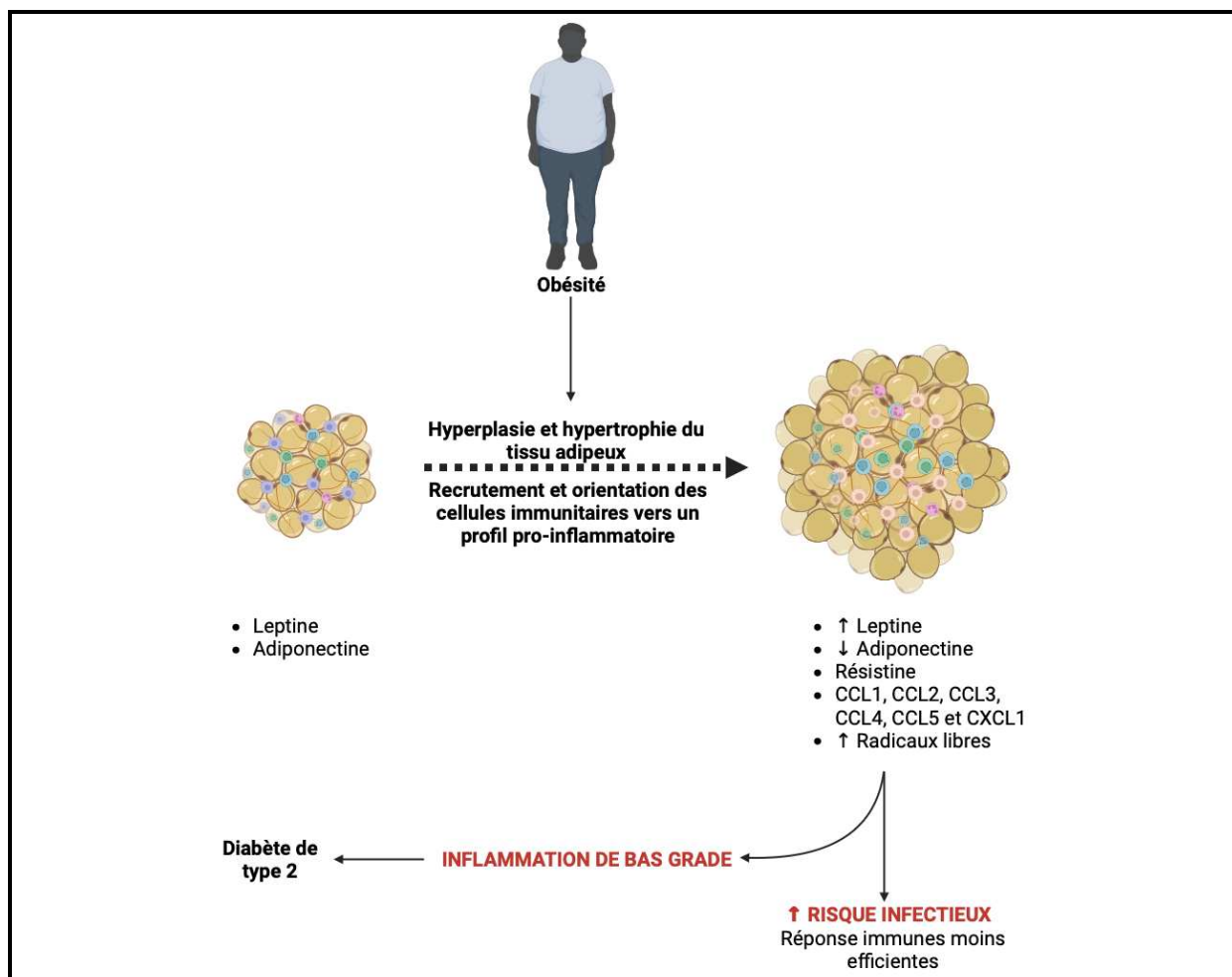
La surcharge pondérale et l'obésité se définissent comme une accumulation excessive de gras chez un individu. L'accumulation anormale de tissu adipeux au niveau viscéral est d'ailleurs un facteur de risque de développer des incidents cardiovasculaires plus important et est souvent associé à l'apparition d'une insulino-résistance (Després, 2012). Auparavant réservée aux pays à revenus élevés, le surpoids et l'obésité connaissent maintenant également une progression fulgurante dans les pays dont les revenus sont plus faibles. Selon l'OMS, aujourd'hui, il y a plus de personnes souffrant d'obésité que de personnes sous-alimentées (World Health Organisation, 2021). En 2016, on recensait 1,9 milliards de personnes présentant un surpoids dont plus de 650 millions étaient obèses (World Health Organisation, 2021).

L'obésité est un désordre métabolique d'origine multifactorielle associant facteurs génétiques, environnementaux et développementaux (Schwartz et al., 2017), la cause la plus simple

correspondant à un apport calorique qui n'est pas en adéquation avec la dépense énergétique de l'individu. Cependant, des mécanismes plus complexes peuvent être soulignés, comme une atteinte des neurones du noyau arqué de l'hypothalamus participant au contrôle de l'apport alimentaire via l'expression de facteurs orexigènes (neuropeptide Y, *agouti-related protein*) ou anorexigènes (pro-opiomélanocortine, *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript* – CART) sous le contrôle hormonal de la leptine et de l'insuline sécrétée respectivement par les adipocytes et les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (Schwartz et al., 2017). Plus récemment, l'impact d'une dysbiose du microbiote intestinal sur le risque d'obésité a été évoqué. En effet, l'abondance des bactéries firmicutes semble être liée au développement de l'obésité, de par la capacité de ces bactéries à extraire l'énergie de manière plus efficace promouvant ainsi l'absorption de calories et la prise de poids (Krajmalnik-Brown et al., 2012).

Au-delà des complications majoritairement cardiovasculaires et endocriniennes associées à l'obésité, des troubles immunitaires sont retrouvés chez les sujets obèses. En effet, le tissu adipeux blanc est un tissu, qui en plus de son rôle important de stockage, est fortement lié à l'immunité. Notamment via la sécrétion d'adipokines (leptine, adiponectine), de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) et de chimiokines (CCL2) présentant une activité sur le statut inflammatoire mais également le système immunitaire (Kershaw & Flier, 2004). Ainsi, l'hyperplasie et l'hypertrophie en cas d'obésité s'accompagnent d'une dérégulation du système immunitaire que nous allons décrire ici (**Figure 13**). Le tissu adipeux contient différents types cellulaires incluant, au-delà des adipocytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes, des pré-adipocytes, mais surtout des leucocytes (Kanneganti & Dixit, 2012). Chez le sujet obèse, on retrouve une altération du recrutement, de la prolifération et de la polarisation des macrophages au sein du tissu adipeux (Weisberg et al., 2003). Il a été démontré que l'augmentation de la taille des adipocytes déclenche une réponse au stress et le relargage de chimiokines (CCL2 et CCL5) (Skurk et al., 2007), conduisant au recrutement et à l'accumulation de monocytes et de macrophages dans le

tissu adipeux (Weisberg et al., 2003). D'autre part, la quantité accrue d'acides gras libres et d'acides gras non-estérifiés, en cas d'obésité, entraîne l'activation de TLR4 et TLR2 conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-6) et à la réduction de l'expression de cytokine anti-inflammatoire (comme l'IL-10) (Nguyen et al., 2007; H. Shi et al., 2006). Cet état pro-inflammatoire peut, ultimement, être à l'origine du développement d'une insulino-résistance et d'un TD2, comme explicité précédemment (H. Shi et al., 2006). Enfin, alors qu'une majorité de macrophages polarisés M2 (phénotype anti-inflammatoire) est retrouvée au sein du tissu adipeux de sujets sains, la polarisation des macrophages chez les individus obèses est orientée vers le phénotype M1 (et donc pro-inflammatoire) (Kanneganti & Dixit, 2012). Cette accumulation est d'une part due au recrutement de monocytes sanguins, mais aussi à la prolifération et au changement de polarisation des macrophages résidents du tissu adipeux (C. Zheng et al., 2016). La leucocytose dans le tissu adipeux en cas d'obésité concerne également les neutrophiles. De manière similaire aux monocytes, les neutrophiles de sujets obèses présentent une migration au sein du tissu adipeux, ainsi qu'une production basale de radicaux libres plus importantes participant à l'inflammation de bas-grade (Brotfain et al., 2015). Enfin, les lymphocytes NK suivent cette tendance, avec une augmentation de leur activation, de leur prolifération et de leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Lee et al., 2016). Les cellules participant à l'immunité adaptative ne sont, elles non plus, pas épargnées en cas d'obésité. En effet, le tissu adipeux de sujets obèses a montré une présence plus importante de lymphocytes cytotoxiques, et une population de lymphocyte T régulateur diminuée (Nishimura et al., 2009). Même si ce statut pro-inflammatoire est celui retrouvé en cas d'infection, sa chronicité s'accompagne au final d'une susceptibilité accrue aux infections chez les sujets obèses par une faible réactivité en présence des pathogènes.



**Figure 13 – Influence de l’obésité sur l’immunité.** Le tissu adipeux, qui est un tissu riche en cellules immunitaires, participe à l’immunité par la sécrétion d’adipokines, des cytokines d’origine adipeuse. En cas d’obésité, l’hyperplasie et l’hypertrophie du tissu adipeux est concomitante à l’augmentation du recrutement de cellules immunitaires au sein du tissu et à l’orientation de ces cellules vers un profil pro-inflammatoire. Ces phénomènes sont à l’origine d’une altération des sécrétions cytokiniques, responsable d’une part d’une inflammation de bas grade pouvant mener au développement d’un diabète de type 2. Et d’autre part, à un défaut d’activation des réponses immunes pouvant augmenter le risque infectieux.

Les altérations immunitaires en cas d’obésité sont à l’origine d’un risque plus important de développer des infections. Ces infections auront souvent lieu de manière opportunistes ou nosocomiales dans des tissus porteurs d’une flore microbienne commensale et qui sont à l’interface entre le milieu interne et externe. Ainsi, des souris obèses ont montré une activité antimicrobienne insuffisante pour lutter contre *Staphylococcus aureus* lors d’une infection cutanée (L. Zhang et al., 2021). Les infections fongiques à *Candida albicans* sont également plus prévalentes chez les individus obèses (Shipman & Millington, 2011). Au niveau du tractus urinaire, on note aussi un risque plus important de développer des infections à *Escherichia coli* (Pugliese

et al., 2022). Cependant, c'est au niveau respiratoire que le plus de données ont été rapportées. En effet, les sujets obèses présentent un risque plus important de contracter des infections hautes ou basses du système respiratoire (Kaspersen et al., 2015). Alors que des souris<sup>ob/ob</sup> ont montré des altérations de leur réponse immunitaire quand elles étaient exposées à des pathogènes d'origine bactérienne, incluant *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* et *Klebsiella pneumoniae* (Las Heras et al., 2019; Mancuso et al., 2002; Wieland et al., 2005). À cause d'un mauvais contrôle de ces infections par le système immunitaire, celles-ci sont d'ailleurs plus susceptibles de passer la barrière endothéliale, aboutissant à des septicémies (Las Heras et al., 2019). L'incapacité à contrôler l'infection dans ces conditions a été en partie imputée à des défauts dans les réponses immunes T antigène-spécifiques (Wieland et al., 2005), ainsi qu'à des défauts de l'activité phagocytaire des neutrophiles et des macrophages (Mancuso et al., 2002). La sévérité des infections chez les sujets obèses est également accrue en cas d'infection virale. Ainsi, les épidémies successives de grippe H1N1 et de SARS-CoV-2, ont été corrélées à un risque accru de mortalité et de morbidité chez les patients obèses (Louie et al., 2011; Popkin et al., 2020). Dans le cas de l'infection par le virus de l'Influenza, il a été démontré sur modèle murin que la plus grande susceptibilité des individus obèses était liée à un défaut de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T par les cellules dendritiques, ceci conduisant à des réponses cytotoxique et mémoire déficientes (Karlsson et al., 2010; Smith et al., 2009). À noter, l'obésité a récemment été associée à une sévérité plus importante de l'infection par le virus West Nile (WNV) dans un modèle murin (Geerling et al., 2021). Cette augmentation de la sévérité a été retrouvée chez les femelles, et serait liée à des dysfonctions de l'immunité adaptative en phase aiguë, mais aussi tardive avec une diminution de la production d'anticorps neutralisants chez ces individus (Geerling et al., 2021). En lien, avec cette incapacité à produire une réponse humorale, on sait que l'obésité a un impact négatif sur la réponse immunitaire en cas de vaccination. Ainsi, l'immunogénicité induite par les vaccins dirigés contre les virus de

l'hépatite B et de la grippe H1N1 est réduite chez les individus obèses (Kim et al., 2012; Weber et al., 1986).

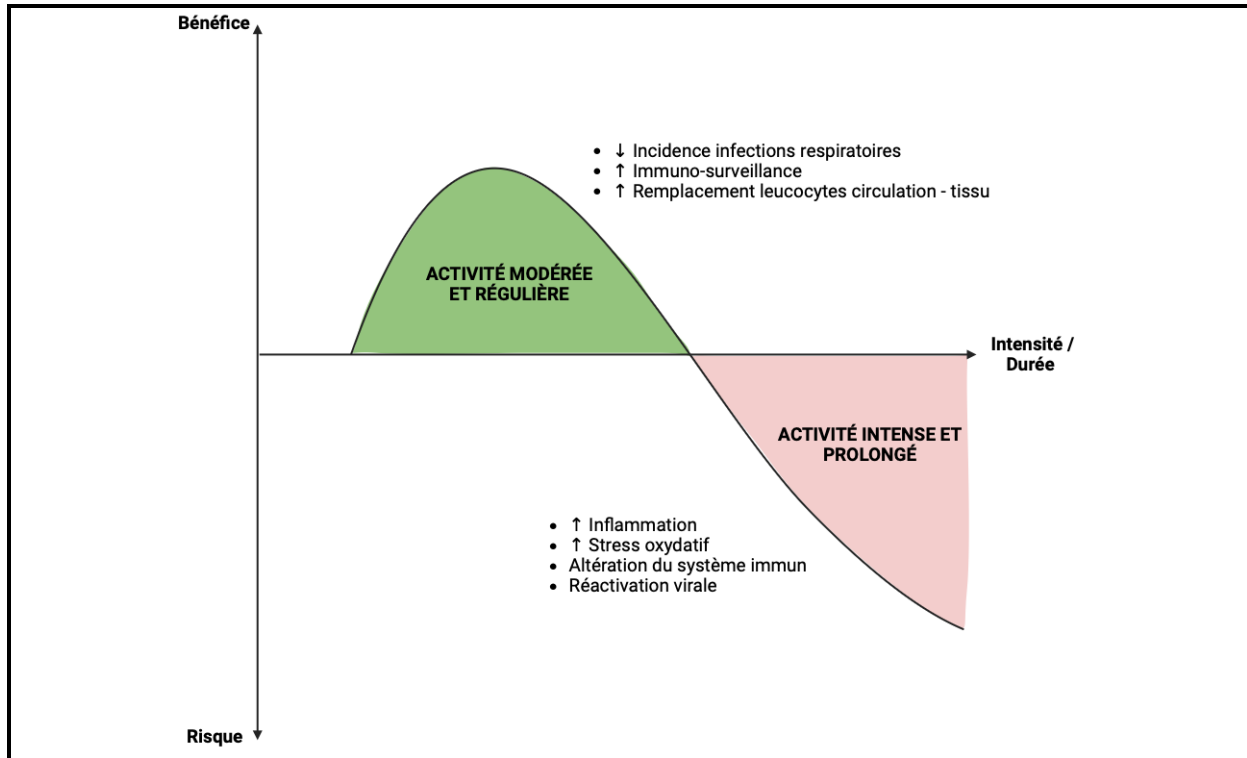
#### I.2.ii.c. L'activité physique

À l'instar de la nutrition, l'activité physique influe sur le statut métabolique de l'individu, mais à ce jour, son impact sur la fonction immunitaire reste controversé (**Figure 14**). Des preuves épidémiologiques indiquent que l'activité physique régulière réduit l'incidence des maladies chroniques, mais également le risque de développer des infections virales et bactériennes (Pape et al., 2016). En fait, l'exercice physique fréquent serait capable d'améliorer la compétence immunitaire, puisqu'une étude de cohorte prospective portant sur 1 509 hommes et femmes suédois âgés de 20 à 60 ans a démontré que des niveaux d'activité physique plus élevés étaient assortis d'une incidence plus faible d'infections des voies respiratoires supérieures auto-déclarées (Fondell et al., 2011). Il a été démontré que des séances d'exercice aiguës de moins de 60 minutes, s'accompagnaient d'une modification transitoire du compte de leucocytes et des capacités de prolifération lymphocytaire (Nieman et al., 2005). Même si ces modifications restaient modestes, elles pourraient être évoquées comme une amélioration de l'immunosurveillance en cas d'activité physique modérée. Ce type d'exercice représente un adjuvant important du système immunitaire, stimulant le remplacement continu des leucocytes entre la circulation et les tissus (Adams et al., 2011). D'ailleurs, l'exercice physique a été suggéré comme un outil utile pour la prévention du COVID-19 en améliorant la fonction immunitaire, en particulier l'immunité innée et adaptative, et en modulant l'état anti-inflammatoire (Fernández-Lázaro et al., 2020).

Cependant, l'exercice prolongé et intensif des athlètes est lié à un dysfonctionnement immunitaire, à l'inflammation et au stress oxydatif (Nieman, 1997; Northoff & Berg, 1991). L'exercice pourrait altérer transitoirement la protection immunitaire, augmentant ainsi le risque d'infection (Nieman & Wentz, 2019). De ce fait, les athlètes sont susceptibles de subir une



réactivation temporaire ou soutenue de virus, tel que le virus d'Epstein-Barr, en raison de la suppression des paramètres immunitaires au cours des années d'entraînement intenses (Clancy, 2006; Gleeson et al., 2002; Reid, 2004).



**Figure 14 – Bénéfice et risque de l'activité physique en contexte infectieux.** Le rôle de l'activité physique sur l'immunité en cas d'infection virale reste un sujet de débat dans la littérature. Les données disponibles jusqu'à présent semblent tendre vers la description d'un phénomène d'hormésis. L'activité physique ayant un effet bénéfique, illustré par une diminution de l'incidence des infections et une augmentation de l'immunosurveillance, dans le cas d'une activité régulière et modérée. En revanche, lorsque la « dose » d'activité sportive devient intense et prolongée, ce sont des effets délétères et un contexte propice à l'infection qui sont retrouvés, à savoir une augmentation de l'inflammation, du stress oxydatif et une altération du système immunitaire.

Dans l'ensemble, ces études indiquent que l'exercice physique serait bénéfique pour le maintien d'une immunité fonctionnelle. Néanmoins, lorsqu'il est pratiqué à une intensité très élevée, il est suggéré qu'il altère la fonction immunitaire et augmente la susceptibilité aux infections. Il est également crucial de garder à l'esprit que le lien entre l'exercice et la fonction immunitaire constitue certainement un concept multifactoriel qui implique d'autres aspects tels que la nutrition et les changements dans le microbiome par exemple (Barton et al., 2017). Dans cette mesure, d'autres études incluant une approche multifactorielle seront nécessaires pour améliorer nos connaissances sur les changements immunitaires induits par l'exercice et leur mécanisme.

### I.2.iii. L'immunité à médiation cellulaire

La résolution de l'infection virale dépend d'un ensemble de réponses cellulaires et moléculaires, mises en place précocement que ce soit par des cellules spécialisées ou non spécialisées. Ces mesures ont pour objectif de limiter l'intrusion et de se débarrasser le plus rapidement du virus pathogène. Toutefois, les virus font preuve de capacités surprenantes quand il s'agit de se frayer un chemin à travers les systèmes de défense de l'hôte. Les interactions hôtes-pathogènes sont similaires à un véritable conflit armé, où toutes les méthodes sont bonnes pour déstabiliser l'adversaire, de la manipulation insidieuse à la blitzkrieg. Ce champ de bataille est en plus le théâtre d'une escalade de la violence, des évolutions permanentes de l'hôte et du pathogène permettent de maintenir un semblant de « *statu quo* », ce concept métaphorique a été développé sous le nom de '*red queen effect*' (Van Valen, 1973). Certaines des réponses déployées par l'hôte pour juguler l'infection par DENV et ZIKV ainsi que les contre-mesures adoptées par ces virus seront abordées dans les prochains paragraphes.

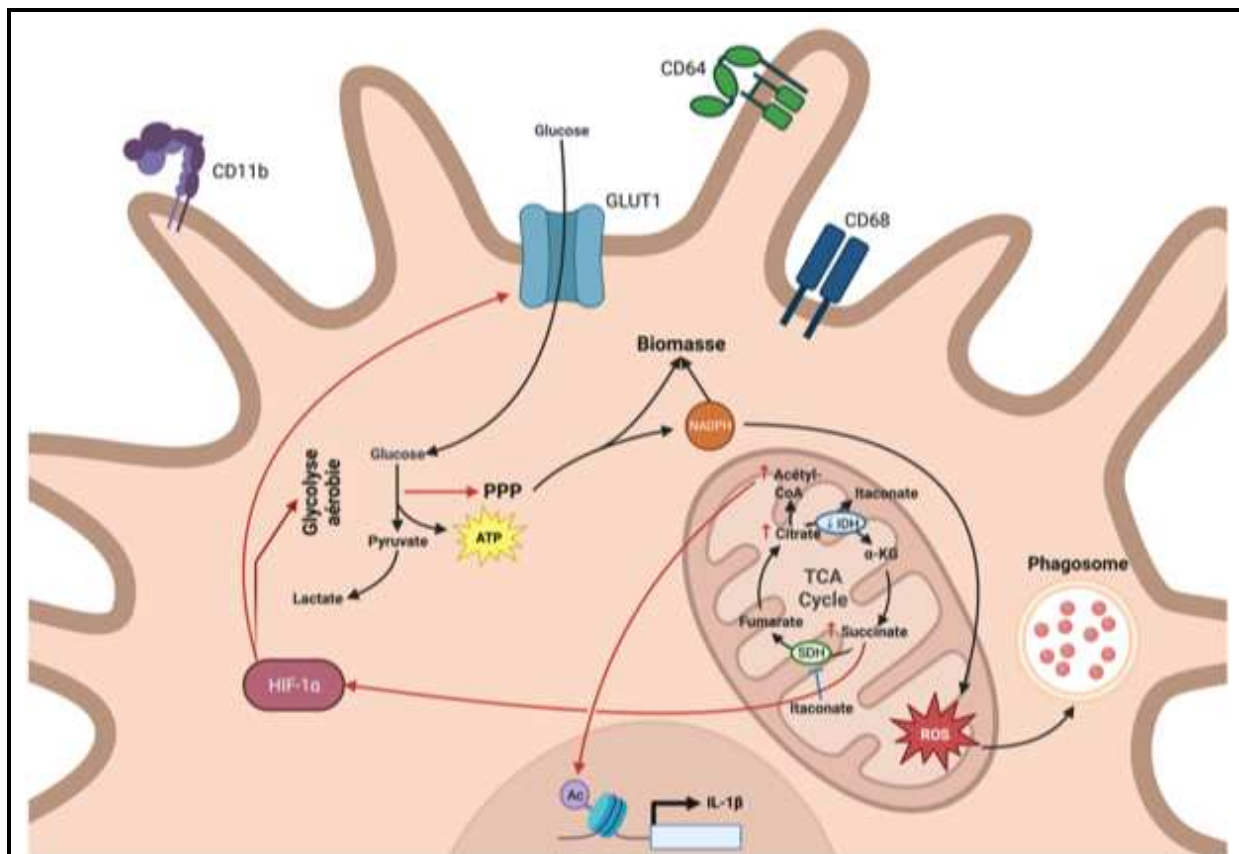
#### I.2.iii.a. Les monocytes et macrophages

Les macrophages sont des leucocytes CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> qui rentrent normalement dans l'arsenal proposé par le système immunitaire pour lutter contre les infections, en effet, historiquement ils ont été décrits pour leurs activités antimicrobiennes et de phagocytes (Murray & Wynn, 2011). Cependant, bien d'autres fonctions leur ont été associées depuis. Ainsi, leur participation à l'homéostasie tissulaire, ainsi que la réparation tissulaire en cas de dommage ne sont plus à prouver (Murray & Wynn, 2011). Pour remplir ces fonctions essentielles, mais variées, les macrophages pourront adopter des phénotypes variés. Devant la complexité des phénotypes que peuvent adopter les macrophages, il est de coutume de classer ces cellules selon qu'elles ont une activité plutôt pro-inflammatoire (M1) ou plutôt anti-inflammatoire (M2) (Murray & Wynn, 2011). Mais il reste tout de même important de garder à l'esprit que cette classification simplifie énormément les capacités de repolarisation des macrophages, qui s'appuient sur une

transcription dynamique pour adopter le phénotype et les fonctions les plus adaptés à leur microenvironnement tissulaire. Par ailleurs, les macrophages sont parmi les seules cellules à avoir autant d'homologues spécifiques de tissus avec pour ne citer qu'elles : les cellules de Kupffer dans le foie, les microglies dans le cerveau, les macrophages alvéolaires dans le poumon (Murray & Wynn, 2011). Tous ces macrophages spécifiques de tissu ont une origine embryonnaire à la différence des macrophages de la lignée monocyttaire, qui dérivent de la différenciation des monocytes suite à leur infiltration tissulaire. Aussi, par la suite nous évoquerons de manière générale le métabolisme des macrophages selon qu'ils soient polarisés M1 ou M2 *in vitro* et *in vivo*. Quelques différences pourraient intervenir selon leur tissu de résidence et le métabolisme spécifique de ces macrophages a fait l'objet d'une revue très récemment par Wculek et al. (Wculek et al., 2022).

Les macrophages M1 (CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>) sont ceux ayant une activité plutôt pro-inflammatoire dont l'activation *in vitro* intervient soit par une stimulation de leur TLR par un lipopolysaccharide (LPS), soit par une stimulation cytokinique par le TNF ou l'IFN- $\gamma$ . Cette activation aboutit à la mise en place d'un métabolisme soutenant le *burst* oxydatif permis par la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, ainsi que la production d'effecteurs anti-microbiens (**Figure 15**). Les macrophages M1 sont caractérisés par un métabolisme glycolytique prépondérant comme en témoigne leur consommation accrue de glucose, grâce notamment à la surexpression du transporteur du glucose de type 1 (GLUT1) (Freemerman et al., 2014; Rodríguez-Prados et al., 2010). Dans cette reprogrammation métabolique, l'implication du facteur inductible par l'hypoxie (*hypoxia inducible factor 1 $\alpha$* , HIF-1 $\alpha$ ) s'est montrée importante (Palsson-McDermott et al., 2015; Tannahill et al., 2013), sa stabilisation étant dans les macrophages M1 liée au blocage du TCA, à deux niveaux distincts. D'abord, l'inhibition de l'isocitrate déshydrogénase (IDH-1) conduit à l'accumulation de citrate, ainsi qu'à la synthèse d'itaconate (Meiser et al., 2016). D'une part, le citrate ainsi accumulé est converti en acétyl-

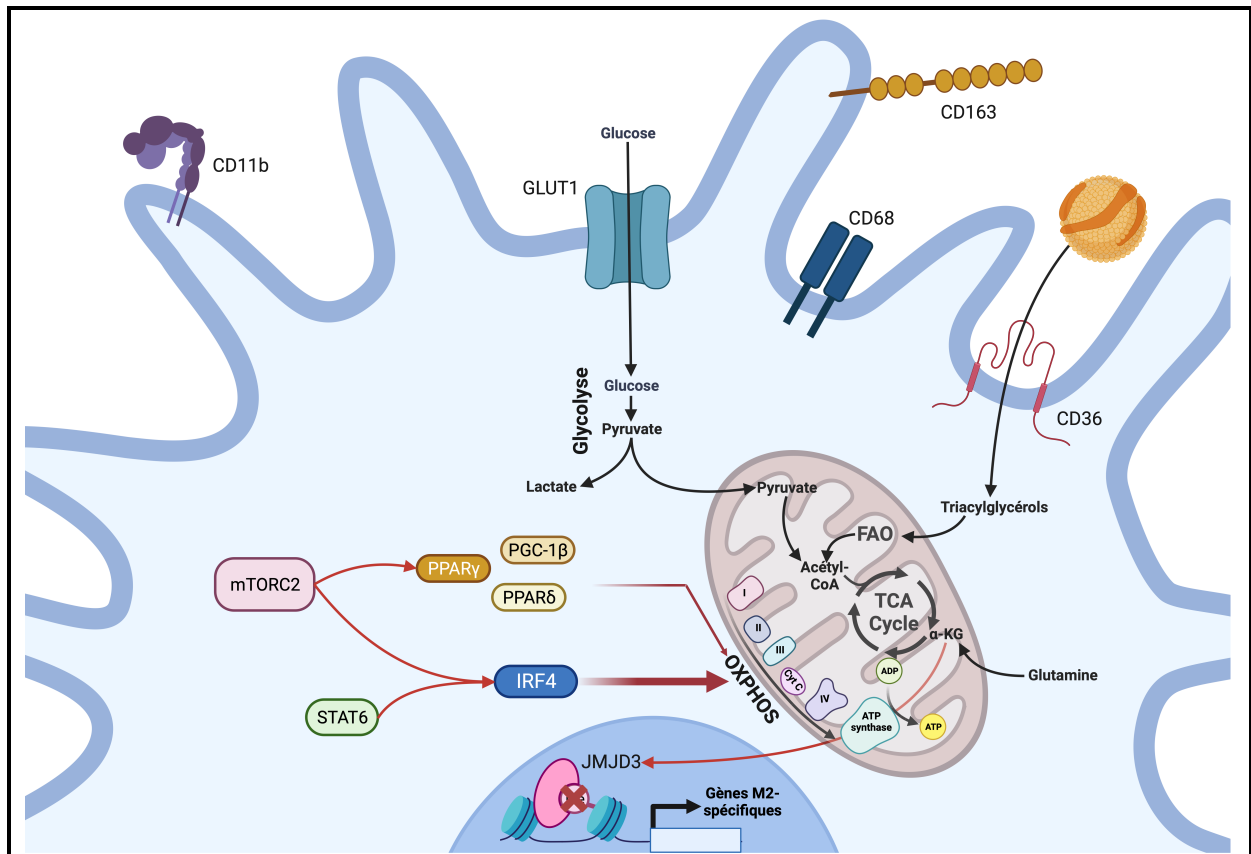
CoA qui sert à l'acétylation des histones et à la transcription des gènes inflammatoires (Lauterbach et al., 2019). D'autre part, l'itaconate pourrait inhiber l'activité du complexe succinate déshydrogénase (SDH) aboutissant donc à l'accumulation de succinate (Cordes et al., 2016). C'est finalement le succinate ainsi produit qui vient stabiliser HIF-1 $\alpha$  (Tannahill et al., 2013). Cette reprogrammation métabolique s'est notamment montrée indispensable pour la production d'IL-1 $\beta$  en réponse à une stimulation par du LPS (Tannahill et al., 2013). De plus, l'activité mitochondriale des macrophages M1 se retrouve détournée, de la production d'ATP au profit de la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) mitochondriales, qui serviront d'ailleurs au sein des phagosomes (Mills et al., 2016). Ce phénomène se produit par un recrutement des mitochondries au niveau des phagosomes et une augmentation de l'oxydation mitochondriale du succinate en faveur de la production de ROS (Mills et al., 2016; West et al., 2011). À ce stade, la production d'ATP repose donc principalement sur une glycolyse aérobie, à l'image de l'effet décrit par Warburg pour les cellules cancéreuses (Tannahill et al., 2013; Warburg, 1956). Celle-ci fournit aussi les intermédiaires nécessaires à la voie des pentoses phosphate (*Pentose Phosphate Pathway*, PPP) conduisant *in fine* à l'augmentation du pool de NADPH, à la production de biomasse (ici sous la forme de nucléotides) et de ROS (Baardman et al., 2018).



**Figure 15 – Le rôle du métabolisme dans l’activation et la fonction des macrophages M1.** Les macrophages M1 développent un métabolisme glycolytique dont le facteur HIF-1 $\alpha$  est partie prenante, notamment permis par la surexpression du transporteur du glucose GLUT1. La stabilisation de ce facteur est d’une part liée à l’inhibition de l’isocitrate déshydrogénase (IDH-1) conduisant à l’accumulation de citrate, ainsi qu’à la synthèse d’itaconate. Le citrate accumulé est converti en acétyl-CoA qui sert à l’acétylation des histones et donc favorise la transcription des gènes inflammatoires. D’autre part, l’itaconate inhibe l’activité du complexe succinate déshydrogénase (SDH) aboutissant donc à l’accumulation de succinate. Le succinate ainsi produit vient stabiliser HIF-1 $\alpha$ . L’activité mitochondriale des macrophages M1 n’est dévolue qu’à la production d’espèces réactives de l’oxygène mitochondriales, qui serviront au sein des phagosomes. La production d’ATP repose donc principalement sur la glycolyse aérobie.

Contrairement aux macrophages M1, les macrophages M2 (CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>) sont obtenus *in vitro* en réponse à de l’IL-4 ou de l’IL-13, ils ont des propriétés anti-inflammatoires et interviennent dans la réparation tissulaire (Murray & Wynn, 2011). À l’opposé des M1, les macrophages M2 ont un métabolisme cellulaire basé sur un accroissement de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et de la respiration mitochondriale, comme le prouve l’élévation du taux de consommation d’O<sub>2</sub> dans les macrophages polarisés M2 (Figure 16) (S. C.-C. Huang et al., 2014). Les modifications transcriptionnelles aboutissant à ce métabolisme sont contrôlées dans les macrophages M2 par l’activation de plusieurs facteurs dont PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\beta$

et IRF4. Ces facteurs dépendant à la fois de l'activation de STAT6 et du complexe mTORC2 (S. C.-C. Huang et al., 2016; Vats et al., 2006). Certains de ces facteurs sont associés au métabolisme lipidique et conduisent, notamment ici, à la surexpression du *scavenger* CD36, permettant l'internalisation dans ces cellules des lipides utilisés pour l'oxydation des acides gras (S. C.-C. Huang et al., 2014; Vats et al., 2006). Si CD36 s'est montré critique pour la polarisation en M2 (S. C.-C. Huang et al., 2014), le rôle de l'oxydation des acides gras (*Fatty acid oxidation*, FAO) demeure ambigu. En effet, l'utilisation d'etoxomir comme inhibiteur de la FAO ou des modèles génétiques qui la préviennent ne semblent pas avoir d'effet sur la polarisation M2 (Namgaladze & Brüne, 2014; Nomura et al., 2016), mais plutôt sur la capacité des macrophages M2 à produire de l'ATP. Ainsi, on pourrait donc conclure que la FAO ne semble pas indispensable aux M2 pour assurer leurs fonctions anti-inflammatoires, les acides gras servant plutôt de substrat à la production d'énergie via l'OXPPOS (Namgaladze & Brüne, 2014). En revanche, le métabolisme glutaminergique semble, quant à lui, d'une importance capitale. La glutamine fournit un tiers des dérivés carbonés du TCA et conduit à l'accumulation d' $\alpha$ -cétoglutarate, qui orchestre la polarisation en M2 en activant les déméthylases *Jumonji domain-containing protein* D3 (JMJD3) (P.-S. Liu et al., 2017). En effet, celles-ci médient la déméthylation des histones de promoteurs de gènes spécifiques aux M2. Ces modifications épigénétiques étant responsables de la polarisation des macrophages en M2 (P.-S. Liu et al., 2017).



**Figure 16 – Le rôle du métabolisme dans l’activation et la fonction des macrophages M2.** Chez les macrophages M2, l’activation des facteurs PPAR $\delta$ , PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\beta$  et IRF4 permet des modifications transcriptionnelles orientant le métabolisme cellulaire vers l’OXPHOS. L’activation de ces facteurs est dépendante à la fois de STAT6 et de mTORC2. Notamment, la surexpression du scavenger CD36, fournit les substrats lipidiques nécessaires à l’oxydation des acides gras, essentielle à la production d’ATP via l’OXPHOS, plutôt qu’aux fonctions des macrophages M2. En revanche, la glutamine qui alimente le cycle de Krebs est utile aux fonctions des macrophages M2, puisqu’elle orchestre, via l’accumulation d’ $\alpha$ -cétoglutarate, la polarisation en M2 en activant les déméthylases JMJD3.

En tant que cellules de l’immunité innée, les macrophages participent à la détection initiale des *Flavivirus*. Cependant, le fait que ces cellules soient une des cibles de l’infection diminue grandement leur capacité antivirale. En effet, plusieurs études ont plutôt montré leur rôle de cheval de Troie, participant plutôt à la dissémination du virus dans les tissus, sous la forme de monocytes initialement infectés dans la circulation sanguine (Michlmayr et al., 2017). Pour autant, on a répertorié quelques implications bénéfiques des macrophages dans les infections à DENV et ZIKV. Ainsi, lors d’une infection par le virus de la Dengue, les macrophages infectés sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et antivirales (Marianneau et al., 1999). Concernant ZIKV, les macrophages ont été associés à une restriction de la réplication virale liée à un défaut

d'antagonisation de la réponse IFN STAT2-dépendante, contrairement à ce qui est observé chez les cellules dendritiques qui n'échappent pas au phénomène d'antagonisation (D. Yang et al., 2021).

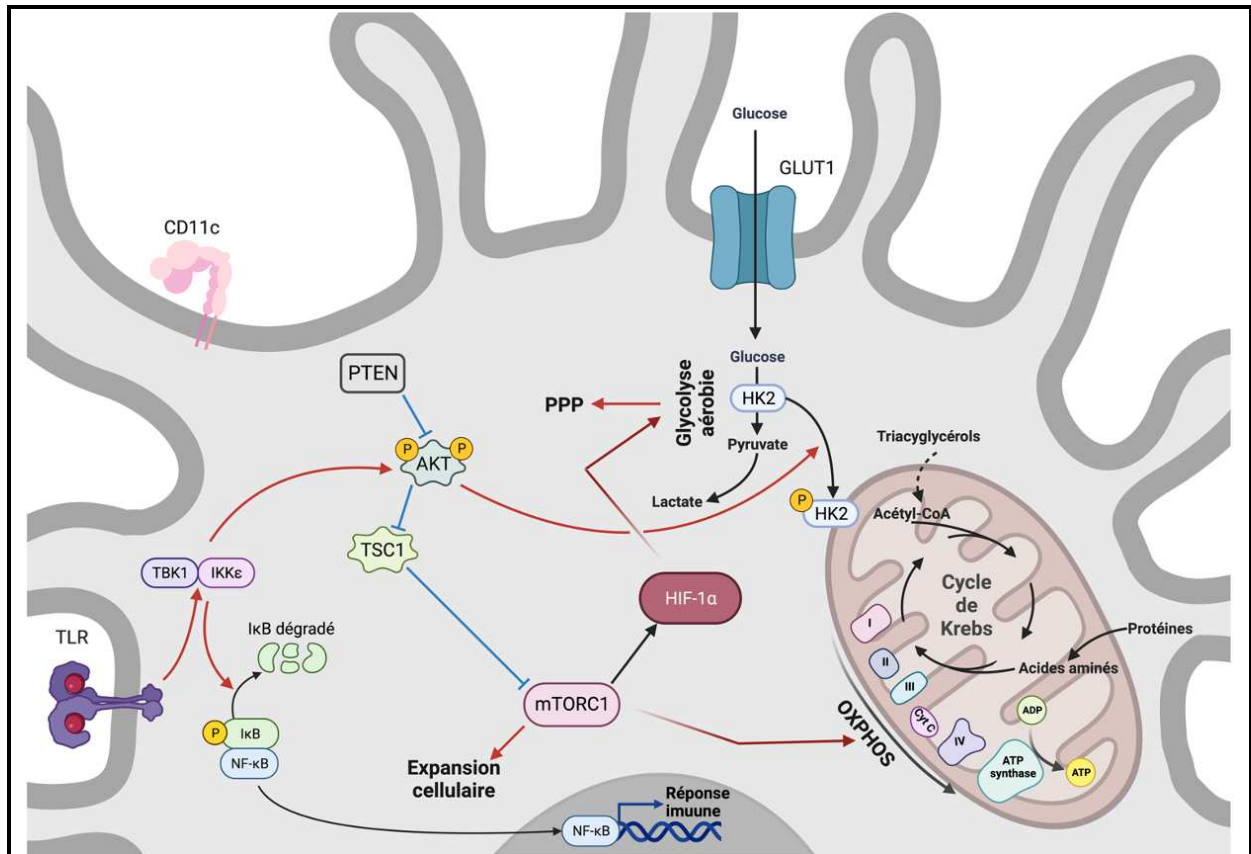
#### I.2.iii.b. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD11c<sup>+</sup>) sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA), qui comme les macrophages, ont des origines variables (Cabeza-Cabrerizo et al., 2021). En effet, on distingue plusieurs sous-types de DCs selon leur provenance. D'une part, les DCs conventionnelles (cDC1 et cDC2) et les DCs plasmacytoïdes (pDCs) dérivées de progéniteurs spécifiques, d'autre part les DCs dérivées des monocytes (mo-DCs) (Cabeza-Cabrerizo et al., 2021). En tant que CPA, les DCs sont retrouvées à l'état quiescent dans de nombreux tissus, c'est le cas des cellules de Langerhans dans le derme, où leur rôle va être de « senser » leur environnement, de s'activer en cas de stimulus et d'initier la réponse immunitaire par la sécrétion de cytokines, ainsi que par la présentation d'antigène au niveau des tissus lymphoïdes (Cabeza-Cabrerizo et al., 2021).

L'activité du métabolisme dans le maintien de la quiescence des cellules dendritiques a déjà fait l'objet d'études que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, et on sait que le complexe mTORC1 (*mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1*) a pour cela une activité prépondérante (Figure 17). Chez la souris l'utilisation de la rapamycine, pour inhiber le domaine RAPTOR de mTORC1, conduit à l'inhibition de la croissance *ex vivo* des pDCs et des cDCs issus de la moelle osseuse, alors qu'*in vivo* le pool de DCs se retrouve considérablement réduit (Sathaliyawala et al., 2010). Confirmant ces résultats obtenus dans des modèles murins, l'utilisation de la rapamycine sur des mo-DCs humains entraîne une altération de leur survie (Woltman et al., 2003). Des modèles d'expression conditionnelle ont servi à explorer plus en détail l'importance de mTORC1 dans la survie des DCs. La délétion du gène *phosphatase and TENsin homolog (PTEN)* conduit à une expansion des DCs *in vivo*, ce résultat est cohérent avec le précédent, PTEN étant un



régulateur négatif de mTOR (Sathaliyawala et al., 2010). Parallèlement, la délétion de *TSC1*, un autre régulateur négatif de mTOR, a également conduit à une augmentation de la croissance des DCs dérivées de la moelle osseuse (Pan et al., 2013). Étant l'un des facteurs principaux de la régulation du métabolisme cellulaire, mTORC1 dirige les DCs quiescentes vers une utilisation de l'OXPHOS pour satisfaire leur faible besoin énergétique (Pearce & Everts, 2015).



**Figure 17 – Le rôle du métabolisme dans l'activation et la fonction des cellules dendritiques.** Le maintien de la quiescence des cellules dendritiques est dépendant d'une activité prépondérante de mTORC1. PTEN et TSC1 des régulateurs négatifs de mTOR limitent la croissance des cellules dendritiques. mTORC1 dirige les cellules quiescentes vers une utilisation de l'OXPHOS, le catabolisme des protéines et des triacylglycérols fournissant les acides aminés et les acides gras permettant d'alimenter la production d'ATP via le cycle de Krebs. Les cellules dendritiques activées prennent le glucose comme carburant principal d'un métabolisme orienté vers la glycolyse aérobique. L'activation de mTORC1 et d'HIF-1 $\alpha$  dans ce cas est permise par l'activité de TBK1 et IKK $\epsilon$  sur AKT en aval des PRRs des cellules dendritiques.

En revanche, l'activation des DCs suite à la stimulation de l'un de leurs PRRs conduit à une modification de leur métabolisme, le glucose devenant le carburant principal du métabolisme cellulaire (Figure 17). Ce processus s'effectue en deux temps. Effectivement, peu de temps après l'activation des DCs de manière dépendante à leurs TLRs, une augmentation rapide de

l'activité glycolytique et de l'entrée d'intermédiaires glycolytiques dans la PPP ont été constatées (Everts et al., 2014). Ces changements sont initiés par l'activation d'AKT via les kinases TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) et IKK $\epsilon$  (*I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$* ) (Everts et al., 2014). Notamment, AKT phosphoryle et active l'hexokinase 2 (HK2), enzyme limitatrice de la glycolyse, dont l'activité se retrouve augmentée après association avec la surface mitochondriale (Everts et al., 2014). Plus tardivement, le maintien de la glycolyse au sein des DCs repose sur l'activation du facteur HIF-1 $\alpha$  probablement par mTOR (Jantsch et al., 2008). De manière intéressante, aucun impact sur l'activation des DCs n'est relevé si une inhibition précoce d'HIF-1 $\alpha$  ou de mTOR intervient après la stimulation des TLRs ; au contraire de l'inhibition précoce d'AKT, ce qui illustre l'importance de la temporalité des différentes voies de signalisation dans l'activation des DCs (Everts et al., 2014). À l'opposé, l'activation de la voie dépendante de la kinase AMPK (*AMP-activated protein kinase*) semble juguler l'activation des DCs, en promouvant l'OXPLOS notamment par l'activation de PGC1 $\alpha$ , favorisant la biogenèse mitochondriale. En effet, le *knock-down* d'AMPK a été associé à une potentialisation de l'activation des DCs (Carroll et al., 2013).

Lors d'une infection virale, les cellules dendritiques, au même titre que les macrophages jouent le rôle de CPA professionnelles, et vont permettre par leur sécrétion de molécules pro-inflammatoires d'orchestrer l'immunité adaptative (Steinbrink et al., 2009). Cependant, quand on en vient aux infections par les *Flavivirus*, une tendance se dégage. Les pDCs répliquent peu le virus, c'est le cas pour DENV, mais produisent rapidement de hauts niveaux de cytokines pro-inflammatoires dont l'IFN- $\alpha$ , et ce dépendamment de la détection de l'ARN viral par TLR7 concernant DENV (J. P. Wang et al., 2006). Au contraire, les mo-DCs, sont plutôt rapportés pour transporter l'antigène de la périphérie vers les tissus lymphoïdes où elles vont le présenter aux lymphocytes T et B (Steinbrink et al., 2009). Au-delà de ces activités essentielles, la contribution des cellules dendritiques à la réponse immune dirigée contre ZIKV et DENV n'a pour l'instant fait l'objet d'aucune découverte marquante, et peu de données sont de ce fait

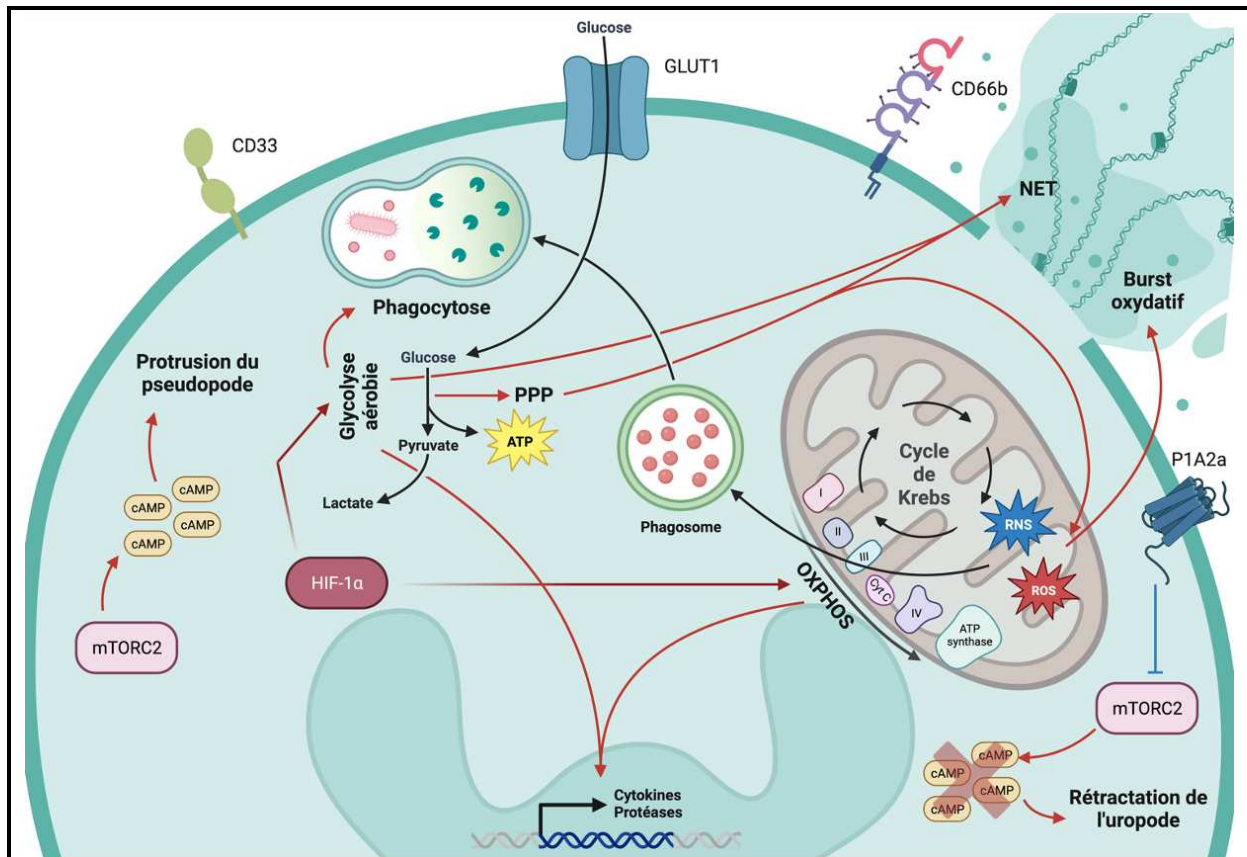
disponibles. Mais ces cellules faisant également partie des cibles principales des *Flavivirus*, elles contribuent avec les macrophages et par leur mobilité, à la dissémination virale notamment dans des sites immuno-privilegiés.

#### I.2.iii.c. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les leucocytes (CD33<sup>+</sup>CD66b<sup>+</sup>) les plus abondants chez l'Homme. Cependant leur rôle reste incertain dans l'infection par les *Flavivirus* et des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer leur rôle bénéfique ou délétère lors de l'infection. Ce sont des effecteurs de l'immunité innée avec plusieurs fonctions essentielles, parmi lesquelles, leur activité de phagocyte, le *burst* oxydatif (production de ROS et d'espèces réactives de l'azote – RNS) et la libération de protéases ainsi que de pièges extracellulaires des neutrophiles (*Neutrophil Extracellular Traps*, NETs) (Brinkmann et al., 2004; Nathan, 2006). De plus, comme souvent pour les cellules de l'immunité innée, ils participent à la mise en place de l'immunité adaptative par leur sécrétion de cytokines (Nathan, 2006). Cette grande variété d'activité sont permises par une adaptation importante de leur cytosquelette et de leur métabolisme énergétique (Figure 18). De manière similaire aux macrophages M1, on a longtemps pensé que les neutrophiles avaient un métabolisme basé uniquement sur la glycolyse. D'ailleurs, chez les neutrophiles également HIF-1 $\alpha$  a montré son importance, puisque des neutrophiles HIF-1 $\alpha$ -null présentent une faible expression des protéases granulaires, dont notamment l'élastase et la cathepsine G, ainsi qu'une activité antimicrobienne réduite (Peyssonnaud et al., 2005). Au contraire la stabilisation d'HIF-1 $\alpha$  conduit à une expression de protéases accrue, accompagnée d'une activité antimicrobienne plus importante (Peyssonnaud et al., 2005). Les neutrophiles expriment également HIF-2 $\alpha$ , un facteur possédant des fonctions similaires à HIF-1 $\alpha$ , dont la surexpression en cas d'inflammation a été associée à une apoptose diminuée des neutrophiles (Thompson et al., 2014). La stabilisation des HIF s'accompagne chez les neutrophiles d'une augmentation de la production d'ATP dépendante de la glycolyse aérobie, alimentant aussi la

PPP (Sadiku et al., 2017). Renforçant le rôle du métabolisme dans les fonctions des neutrophiles, leur activité chimiotactique repose sur l'activation du complexe mTORC2 qui permet la protrusion du pseudopode, via l'accumulation d'adénosine-monophosphate cyclique (AMPc) du côté frontal du neutrophile. Alors qu'à l'opposé, la signalisation prurinergique via le récepteur A2a atténue les effets du complexe mTORC2, causant la rétractation de l'uropode (Bao et al., 2015).

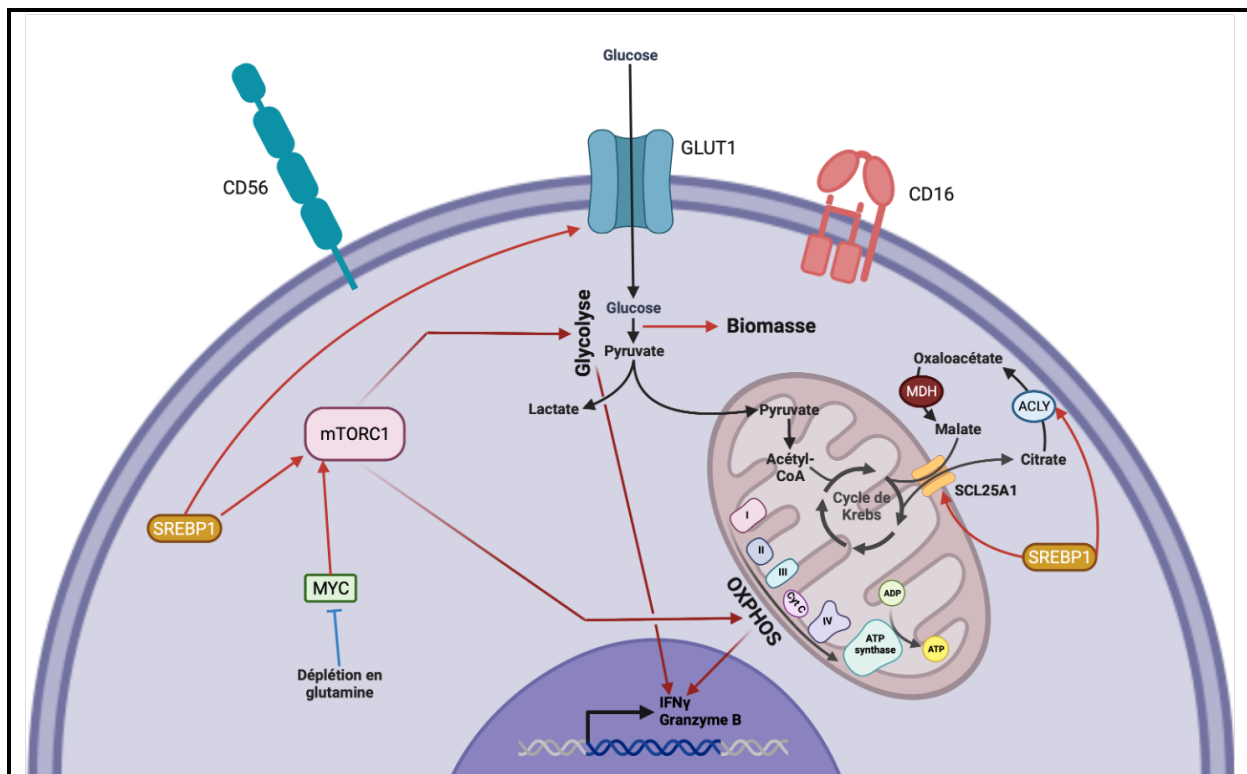
Ainsi, l'activité des neutrophiles est dépendante de plusieurs facteurs qui ont en charge le métabolisme cellulaire. Les HIF orientent le métabolisme cellulaire vers la glycolyse aérobie, celle-ci s'étant révélée essentielle pour la réalisation de la phagocytose par les neutrophiles (Fossati et al., 2003). Aussi, la glycolyse et l'alimentation de la PPP par les intermédiaires de la glycolyse sont partie prenante dans la capacité des neutrophiles à former des pièges extracellulaires (Azevedo et al., 2015). En effet, l'inhibition de ces voies métaboliques, avec respectivement le 2-déoxyglucose (2-DG) et le 6-aminonicotinamide, conduit à une atténuation de la formation de NETs (Azevedo et al., 2015). Toutefois, l'entièreté des fonctions dévolues aux neutrophiles ne reposent pas que sur la glycolyse et la PPP. Ainsi, la formation de ROS et de RNS est dépendante de la PPP, mais également de l'OXPPOS (Fossati et al., 2003). L'activité mitochondriale est promue chez les neutrophiles par le complexe mTORC2 (Bao et al., 2015), et son inhibition par l'oligomycine est associée à une diminution du *burst* oxydatif ainsi que du chimiotactisme (Fossati et al., 2003).



**Figure 18 – Le rôle du métabolisme dans l’activation et la fonction des neutrophiles.** La grande variété d’activité portée par les neutrophiles est permise par une adaptation importante de leur cytosquelette et de leur métabolisme énergétique. Le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  a montré son importance dans l’expression des protéases granulaires. La stabilisation d’HIF-1 $\alpha$  s’accompagne d’une augmentation de la production d’ATP dépendante de la glycolyse aérobie. L’activité chimiotactique repose quant à elle sur l’activation du complexe mTORC2 qui favorise la protrusion du pseudopode, via l’accumulation d’AMPc du côté frontal du neutrophile. La rétractation de l’uropode est soumise à l’inhibition de mTORC2 par la signalisation purinergique via le récepteur A2a. La glycolyse aérobie s’est révélée essentielle pour la réalisation de la phagocytose par les neutrophiles et l’alimentation de la voie des pentoses phosphates. Ces deux voies sont partie prenante dans la capacité des neutrophiles à former des pièges extracellulaires. Le burst oxydatif, nécessitant la formation de ROS et d’espèces réactives de l’azote (RNS) dépend à la fois de la PPP et de l’OXPHOS. Cette dernière étant promue par mTORC2.

#### I.2.iii.d. Les lymphocytes NK

Les lymphocytes incluent 3 grands types de cellules. D’une part, les lymphocytes T (LT) et B (LB) plutôt impliqués dans la mise en place de la réponse adaptative. Alors que les lymphocytes *natural killer* (LNK) sont plutôt associés à une réponse innée.



**Figure 19 – Le rôle du métabolisme dans l’activation et la fonction des lymphocytes NK.** Les lymphocytes NK en quiescence présentent une activité de la voie mTORC1 réduite, traduite par de faibles taux de glycolyse et de phosphorylation oxydative. Mais lors de leur activation, ces cellules voient l’activité de mTORC1 augmenter de manière drastique via l’activation des facteurs de transcription SREBP1 et MYC. Ceci a pour conséquence une surexpression des protéines responsables du transport des nutriments dans ces cellules. La surexpression des enzymes glycolytiques, ainsi que du transporteur au glucose GLUT1, aboutit à la mise en place d’une glycolyse aérobie participant à la synthèse de biomasse. Dans le même temps ces cellules présentent dans le cas d’une activation prolongée, une augmentation de l’OXPHOS soutenue par la mitogenèse et l’utilisation de la navette mitochondriale citrate-malate. Or, l’expression de deux facteurs cruciaux pour la réalisation de cette navette est dépendante de SREBP1, à savoir SCL25A1 et ACLY. La glutamine intracellulaire a un rôle activateur sur MYC, dont l’activité est essentielle pour maintenir les flux glycolytiques et d’OXPHOS.

Les LNK sont des lymphocytes CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, qui à la différence de leurs homologues, ont historiquement été classé parmi les cellules participant à la mise en place de la réponse immunitaire innée (Campbell & Hasegawa, 2013), même si récemment des travaux ont permis de montrer leur importance dans les réponses adaptatives et mémoires (Cerwenka & Lanier, 2016). En effet, leurs activités cytotoxiques, associées à une capacité de détection des cellules anormales, en font des effecteurs essentiels du système immunitaire pour lutter de manière aigüe contre les infections virales (Campbell & Hasegawa, 2013). Comme pour les autres sous-types de lymphocytes, l’étude de l’impact du métabolisme cellulaire sur la fonction et l’activité des cellules NK a été étudié (Figure 19). On rapporte ainsi, que ce soit dans un modèle

murin ou sur des cellules issues d'échantillons humain, de faibles taux de glycolyse et d'OXPHOS, ces taux restant tout de même suffisant pour assurer une réponse aigue. En effet, une stimulation courte par le biais de cytokines (4h) ou d'un ligand (6h) n'aboutit pas une augmentation des taux de glycolyse ou d'OXPHOS (Keppel et al., 2015). Malgré la faible amplitude de ces voies métaboliques initialement, celles-ci restent primordiales pour les activités aiguës des LNK puisque l'inhibition que ce soit de la glycolyse ou de l'OXPHOS peut avoir pour conséquence une réduction de l'expression d'IFN- $\gamma$  (Keppel et al., 2015). L'activation prolongée, par contre, nécessite une adaptation du métabolisme cellulaire pour supporter les fonctions sécrétrices et cytotoxiques des lymphocytes NK (Donnelly et al., 2014; Keating et al., 2016).

La régulation du métabolisme chez les lymphocytes NK est dépendante du complexe mTORC1, son rôle important dans le développement et la différenciation des cellules pré-NK a été démontré par l'effet délétère que peut avoir la délétion spécifique de la sous-unité kinase du complexe chez la souris (C. Yang et al., 2018). Passés ces étapes précoces, les LNK en quiescence présentent une activité de la voie mTORC1 réduite, c'est cette activité faible qui dicte d'ailleurs le métabolisme cellulaire vers de faibles taux de glycolyse et d'OXPHOS (Keating et al., 2016; Keppel et al., 2015). Mais lors de leur activation, ces cellules voient l'activité de mTORC1 augmenter de manière drastique, ceci via l'activation des facteurs de transcription SREBP1 (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins 1*) et MYC (Assmann et al., 2017; Loftus et al., 2018), ce qui s'accompagne d'une expression accrue des protéines responsables du transport des nutriments dans ces cellules (Loftus et al., 2018). Ces modifications du métabolisme interviennent en concomitance avec l'expression de molécules effectrices telles que l'IFN- $\gamma$  et la granzyme B, même si l'augmentation des flux glycolytiques, ne servant pas à augmenter l'OXPHOS, alimente la synthèse de biomasse nécessaire à l'activité des LNK (Keating et al., 2016; Keppel et al., 2015). Parallèlement, une augmentation de l'OXPHOS est

retrouvée lors de leur activation prolongée, soutenue par la capacité mitochondriale plus importante (Keating et al., 2016; Keppel et al., 2015). Puisque le pyruvate issu de la glycolyse sert moins de substrat au TCA, l'utilisation de la navette mitochondriale citrate-malate, fournit une méthode alternative de genèse de NADPH (Assmann et al., 2017). Or, l'expression de deux facteurs cruciaux pour la réalisation de cette navette est dépendante de SREBP, à savoir SCL25A1 et ACLY, expliquant pourquoi l'inhibition de ce facteur de transcription conduit à une réduction dramatique de l'OXPHOS et de l'activité des LNK (Assmann et al., 2017). Le taux de glutamine intracellulaire est lui aussi important, puisqu'un déficit de cet acide aminé conduit à une inhibition de la traduction du facteur MYC, dont l'activité est essentielle pour maintenir des flux glycolytiques et de phosphorylation oxydative cohérents avec les fonctions de LNK activées (Loftus et al., 2018).

L'importance du métabolisme dans les fonctions des LNK est encore un enjeu de recherche, notamment en ce qui concerne la mise en place de populations de cellules qui ont des fonctions à long-terme, comme les *memory-like* NK ou les NK adaptatifs (Cichocki et al., 2018; L. L. Liu et al., 2016; Pahl et al., 2018). Comprendre les tenants et les aboutissants concernant les prérequis métaboliques nécessaires à l'activation des LNK ouvre aussi la voie au développement d'immunothérapies impliquant ces cellules dans des environnements métaboliques restrictifs, tel que le microenvironnement tumoral (Cheng et al., 2013; Cichocki et al., 2017; Terrén et al., 2019).

Si on s'intéresse à la fonction des LNK dans l'infection par les *Flavivirus* et plus spécifiquement DENV et ZIKV, on s'aperçoit que celle-ci reste majoritairement indéterminée. La reconnaissance du domaine III de la protéine E de DENV et WNV par le récepteur d'activation des LNK NKp44 a été rapportée, mais l'induction de la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  et la lyse des cellules infectées se limite aux cellules infectées par WNV (Hershkovitz et al., 2009). Ceci pourrait s'expliquer par la capacité des *Flavivirus*, via leurs protéines non-structurales, à



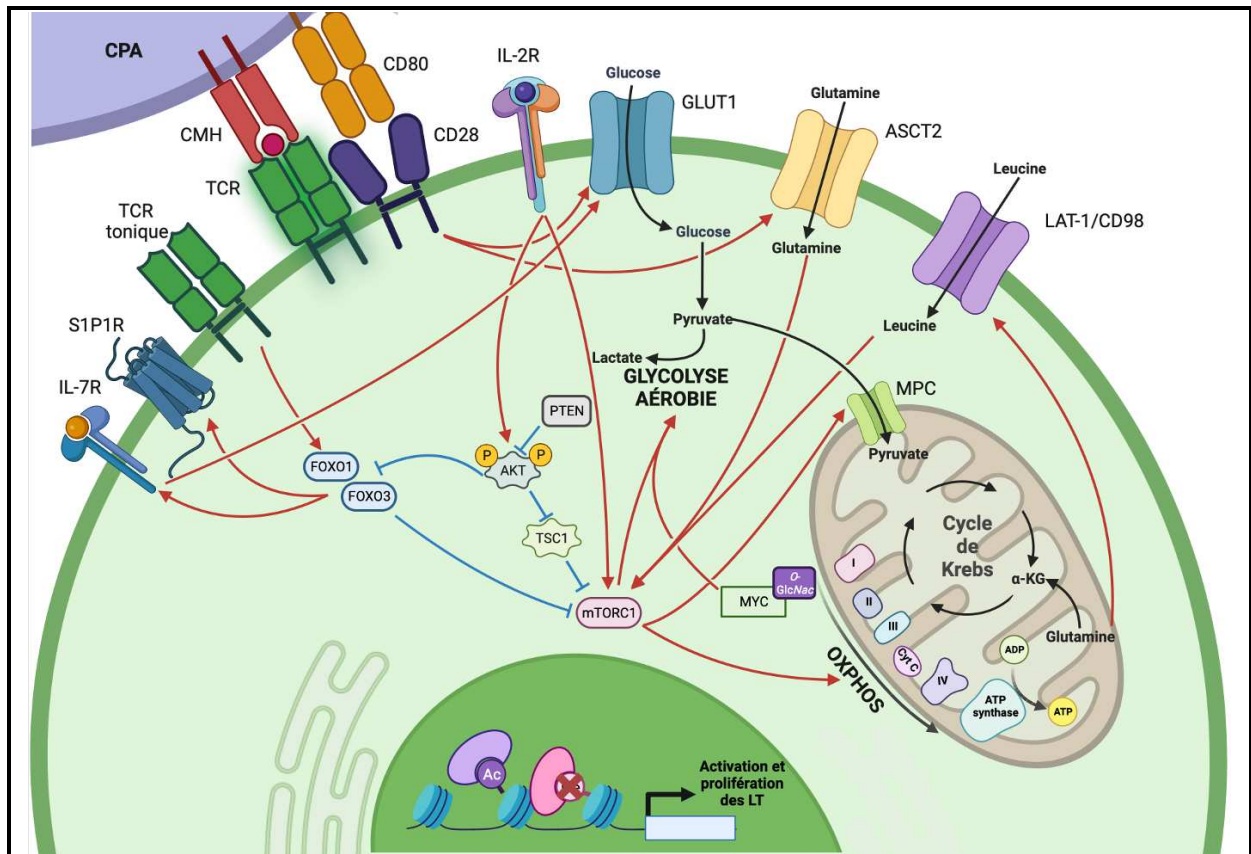
augmenter l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I envoyant des signaux inhibiteurs aux NK (Hershkovitz et al., 2008). Dans le cas de ZIKV, la régulation à la hausse de ce facteur de l'hôte est aussi retrouvée, avec les mêmes conséquences (A. Glasner et al., 2017). Toutefois, contrairement à DENV, ZIKV induit la production abondante d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les LNK *in vitro* en réponse à une stimulation par des cellules dendritiques au préalable infectées. Par ailleurs, l'infection par ZIKV induit de manière notoire un stress du réticulum endoplasmique. Une conséquence de ce stress est la relocalisation de la calréticuline du réticulum endoplasmique à la membrane cellulaire (Sen Santara et al., 2023). Récemment, Sen Santara et al. ont dépeint une fonction particulière des LNK lors de l'infection par ZIKV (Sen Santara et al., 2023). En effet, la reconnaissance de la calréticuline à la membrane des cellules infectées par le récepteur NKp46 des LNK, aboutit à la mort des cellules infectées (Sen Santara et al., 2023).

#### I.2.iii.e. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans la réponse immunitaire en cas d'infection virale. Ils sont définis par l'expression en surface du TCR qui a la capacité de reconnaître et de lier les antigènes présentés par les CPA (Murphy & Weaver, 2016). La reconnaissance de l'antigène permet l'établissement de réponses immunes spécifiques caractérisant le système immunitaire adaptatif. Il existe deux types principaux de lymphocytes T selon qu'ils soient des effecteurs (ou cytotoxiques), exprimant alors CD8, ou des coordonnateurs (ou auxiliaires), exprimant alors CD4 (Murphy & Weaver, 2016). Les LT CD4<sup>+</sup> participent à la coordination de la réponse immunitaire par la production de cytokines qui contribuent à activer et à différencier d'autres cellules immunitaires, notamment les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes B (Murphy & Weaver, 2016). Ainsi, ces lymphocytes peuvent être classés en fonction des cytokines qu'ils produisent. Les lymphocytes T<sub>H1</sub> produisent de l'IFN- $\gamma$  et favorisent l'immunité à médiation cellulaire, alors que les lymphocytes T<sub>H2</sub> produisent de l'IL-4 et de l'IL-13 ce qui

favorise l'immunité humorale (Murphy & Weaver, 2016). Les lymphocytes  $T_H17$ , quant à eux, favorisent l'inflammation par leur production d'IL-17 (Murphy & Weaver, 2016). Enfin, les lymphocytes  $T_{reg}$ , produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  ayant plutôt pour objectif de réduire l'inflammation et de contrôler les effets délétères de la réponse immune (Murphy & Weaver, 2016). Les lymphocytes T  $CD8^+$  sont impliquées dans la destruction directe des cellules infectées ou cancéreuses (Murphy & Weaver, 2016). Lors de leur activation, les LT  $CD8^+$  prolifèrent tout en maintenant l'expression de leur TCR à leur surface, ce qui leur permet de reconnaître et de se lier à des antigènes spécifiques présentés par des cellules infectées ou cancéreuses (Murphy & Weaver, 2016). Une fois liés, les lymphocytes T  $CD8^+$  libèrent des molécules cytotoxiques telles que la perforine et les granzymes, qui provoquent la mort des cellules ciblées (Murphy & Weaver, 2016).

Si nous nous intéressons maintenant plus spécifiquement au rôle du métabolisme dans la fonction des LT, il a été démontré que certaines voies métaboliques et certains nutriments sont essentiels à leur activité. En effet, trois des six "signes" caractérisant la sortie des LT de la quiescence sont liés au métabolisme, à savoir : l'absorption des nutriments, l'augmentation du métabolisme anabolique et la reprogrammation du métabolisme mitochondrial (N. M. Chapman et al., 2020). Les trois autres signes distinctifs sont l'entrée dans le cycle cellulaire de G0 dans les phases G2 – S – M, la croissance cellulaire et la signalisation autocrine ou paracrine de l'IL-2 (N. M. Chapman et al., 2020). Le métabolisme des lymphocytes T a été étudié mais aucun distinguo important n'a, à ce jour, été mis en avant entre les sous-types de lymphocytes T, excepté pour les lymphocytes T régulateurs (**Figure 20**) (Klein Geltink et al., 2018).



**Figure 20 – Le rôle du métabolisme dans l’activation et la fonction des lymphocytes T.** Chez les lymphocytes T en quiescence, l’activation des signaux inhibiteurs FOXO1 et FOXO3 par un signal TCR tonique induit l’expression et la signalisation par IL7R $\alpha$ . Ces signaux permettent le maintien de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative à un niveau basal. La signalisation par FOXO1 et FOXO3 est garantie par la régulation d’AKT grâce à des niveaux élevés de PTEN dans les cellules en quiescence. Les lymphocytes T activés voient l’activité du complexe mTORC1 se montrer essentielle pour proliférer. La costimulation via CD28 a un impact positif sur l’expression de GLUT1 ainsi que d’ASCT2, et donc sur l’internalisation respectivement du glucose et de la glutamine. Ensemble, la glutamine et la leucine ont alors un rôle prépondérant sur mTORC1. mTORC1 favorise chez les lymphocytes T activés à la fois l’OXPHOS et la glycolyse aérobie dont les niveaux atteindront des niveaux supérieurs à ceux retrouvés à l’état de quiescence. L’OXPHOS se retrouve également particulièrement promue suite à la fusion de la membrane interne et externe de la mitochondrie, aboutissant à une amélioration de l’efficacité de la chaîne de transport des électrons, à laquelle vient s’ajouter une augmentation de la mitogenèse. Les intermédiaires métaboliques, tels que l’ $\alpha$ -cétoglutarate et l’acétyl-CoA, présents dans les lymphocytes T activés ont également un rôle dans le devenir des lymphocytes en participant à la régulation de l’expression de certains gènes. Des changements métaboliques au sein des lymphocytes T activés aboutissent à une régulation de la transcription et de la traduction de certains gènes. Enfin, il faut noter l’activité des complexes TSC dans le retour au métabolisme basal et donc la formation des cellules mémoires, puisqu’ils participent à l’inhibition de mTOR et au maintien actif de la quiescence.

Ainsi, les lymphocytes T naïfs, ont un métabolisme permettant leur survie mais limitant leur prolifération et leur activation (S. Zhang et al., 2018). À noter, après activation, le retour à un tel métabolisme est essentiel pour la formation d’un pool de LT mémoires (Shrestha et al., 2014). Ce métabolisme repose sur des signaux inhibiteurs pour un maintien actif de la quiescence. Parmi ces signaux, on relève l’activation de FOXO1 et FOXO3 (*forkhead box protein*

*O1 et O3*) par un signal TCR tonique, qui induit dans les tissus lymphoïdes l'expression et la signalisation du récepteur  $\alpha$  à l'IL7 (IL7R $\alpha$ ) et dans la circulation l'expression de S1PR1 (S1P receptor 1) (Kerdiles et al., 2009; Mendoza et al., 2017; Ouyang et al., 2009). Le maintien de ces signalisations semble permis par des niveaux élevés de PTEN, qui régule l'activité d'AKT, connue pour inhiber les membres de la famille FOXO (A. Suzuki et al., 2001). Le métabolisme dans ces cellules naïves s'appuie sur une activité mitochondriale et une OXPHOS basales pour lesquelles le catabolisme du glucose et le catabolisme des acides aminés représentent la principale source de carbone. Associé à cette OXPHOS maintenue à un niveau faible, un flux glycolytique basal est entretenu par l'assimilation de glucose via GLUT1, dont l'expression est permise par la signalisation d'IL7R, à des niveaux certes plus faibles que pour des LT activés (Wofford et al., 2008). Enfin, il faut noter l'activité des complexes TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*) dans le retour au métabolisme basal et donc la formation des LT mémoires, puisqu'ils participent à l'inhibition de mTOR et au maintien actif de la quiescence (Shrestha et al., 2014).

En effet, les complexes mTOR sont essentiels à l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Si un peptide de haute affinité est suffisant pour induire une augmentation de la glycolyse, grâce à un flux de calcium plus important (Rabinowitz et al., 1996), la prolifération des lymphocytes T nécessite que l'activité de mTORC1 dépasse un certain seuil (K. Yang et al., 2013). Ainsi, la déficience de la sous-unité RAPTOR de mTORC1 conduit à des défauts d'activation (K. Yang et al., 2013). L'activité de mTORC1 se traduit par une augmentation de l'expression du facteur de transcription MYC (Man et al., 2013; R. Wang et al., 2011). Le catabolisme induit par le TCR est appuyé par la costimulation de CD28, celle-ci augmente l'expression de GLUT1 ainsi que d'ASCT2, et en conséquence l'internalisation respectivement du glucose et de la glutamine dans les LT (S. R. Jacobs et al., 2008; Nakaya et al., 2014). Le taux de glutamine intracellulaire influence alors sur l'entrée de leucine via LAT1/CD98 (Nakaya et al., 2014). Ensemble, la glutamine et la leucine ont alors un rôle prépondérant sur mTORC1 et donc

pour l'activation et la prolifération des lymphocytes T (Nakaya et al., 2014; Sinclair et al., 2013). mTORC1, ainsi sollicité, va favoriser directement et indirectement, via MYC, l'OXPPOS mais également la glycolyse aérobie (Man et al., 2013; R. Wang et al., 2011). Ces deux flux métaboliques atteindront alors des niveaux supérieurs à ceux retrouvés à l'état de quiescence et seront alimentés par le glucose et la glutamine, dont le catabolisme corrèle avec une expression plus importante des enzymes impliquées dans ces voies métaboliques, notamment HK2 et la glutaminase (R. Wang et al., 2011). De manière importante, la stabilisation de MYC par une O-N-acétylglucosaminylation, rendue possible par l'élévation de la glycolyse et de la glutaminyolyse, favorise encore plus l'OXPPOS et la glycolyse aérobie (Swamy et al., 2016). On note également l'importance de l'expression de MPC (*Mitochondrial Pyruvate Carrier*) permettant l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, sans lequel le métabolisme mitochondrial des LT ne reposerait que sur la glutamine (C. Yang et al., 2014). Au niveau mitochondrial le pyruvate sera transformé en acétyl-CoA qui participera, lui aussi, au TCA et fournira les cofacteurs nécessaires à alimenter la chaîne de transport des électrons (*Electron Transport Chain*, ETC). Enfin, les changements métaboliques au sein des lymphocytes T activés aboutissent à une régulation de la transcription et de la traduction de certains gènes. En effet, au niveau génomique, on retrouve des modifications épigénétiques au niveau des gènes dictant le devenir des lymphocytes. De tels changements sont médiés par l'activation des déméthylases, permise par l'accumulation d' $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG) liée à la glutaminyolyse, et par une acétylation des histones grâce à la présence importante d'acétyl-CoA (Tyraakis et al., 2016; Wellen et al., 2009). Toutes ces reprogrammations métaboliques sont à la base de l'activation, de la différenciation et de la prolifération des T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 et des CD8<sup>+</sup>.

L'activité des lymphocytes au cours de l'infection par les *Flavivirus* est à la fois bénéfique et nocive pour l'hôte. Que ce soit *in vitro* ou sur modèle animal, les lymphocytes T cytotoxiques sont partie prenante de la protection contre DENV et ZIKV. Lors d'une primo-infection par

DENV, la prolifération de LT CD8<sup>+</sup> DENV-spécifique induit une baisse significative de la progénie virale, ces cellules produisant de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et exhibant leur capacité cytotoxique (Yauch et al., 2009). Cependant, en cas d'infection secondaire par un autre sérotype, un effet pathogénique des LT CD8<sup>+</sup> a longtemps été rapporté. En effet, l'activation préférentielle des LT CD8<sup>+</sup> spécifique du sérotype ayant infecté en premier lieu, au détriment de cellules spécifiques du sérotype secondairement infectant, conduit à une réponse T cytotoxique altérée pouvant participer à la sévérité de la maladie (Bashyam et al., 2006; Mongkolsapaya et al., 2003). Cette théorie dite du « péché originel », qui a longuement été rapportée au fil des années dans la littérature, a été remise en question lors de l'étude du profil des réponses T CD8<sup>+</sup> chez des sujets srilankais (Weiskopf et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs démontrent que les réponses T CD8<sup>+</sup> altérées en cas d'infections par DENV seraient moins dues à la réinfection qu'à l'expression d'allèles spécifiques de CMH prédisposant à ce type de réponse (Weiskopf et al., 2013). En effet, les LT CD8<sup>+</sup> cross-réactifs ont démontré une activation qualitativement et quantitativement similaires à ceux de LT CD8<sup>+</sup> séro-spécifiques (Elong Ngonu et al., 2016; Weiskopf et al., 2013). Concernant ZIKV, l'intensité des efforts dévolus à la recherche sur la pathogenèse de ce virus mis en place au cours des différentes épidémies, ont pu conclure à un effet majoritairement positif des LT CD8<sup>+</sup> lors de l'infection. Chez la souris, lors de l'infection l'activation de ces cellules réduit les effets néfastes de l'infection (Elong Ngonu et al., 2017). Par ailleurs, si l'immunité préexistante est décriée peut-être à tort lors d'une infection secondaire par DENV, l'existence de LT CD8<sup>+</sup> DENV-spécifique a montré une cross-protection bénéfique lors de l'infection par ZIKV (Regla-Nava et al., 2018; Wen et al., 2017). En revanche, le rôle pathologique des lymphocytes auxiliaires dans l'infection par DENV a déjà été discuté dans la littérature. En effet, la déplétion des LT CD4<sup>+</sup> en amont d'une infection par DENV n'a aucun impact sur la charge virale, ni les titres en anticorps neutralisants, pas moins que sur les réponses pour CD8<sup>+</sup> (Yauch et al., 2010). Au contraire, lors d'une infection secondaire les LT CD4<sup>+</sup> cross-réactifs

seraient impliqués dans l'expression excessive de cytokines pro-inflammatoires, participant au risque de développement de formes sévères (Beaumier & Rothman, 2009). La réponse anticorps neutralisante dirigée contre ZIKV semble par contre dépendre de l'activation de LT CD4<sup>+</sup>, établissant le rôle protecteur de ces cellules lors de l'infection (Lucas et al., 2018).

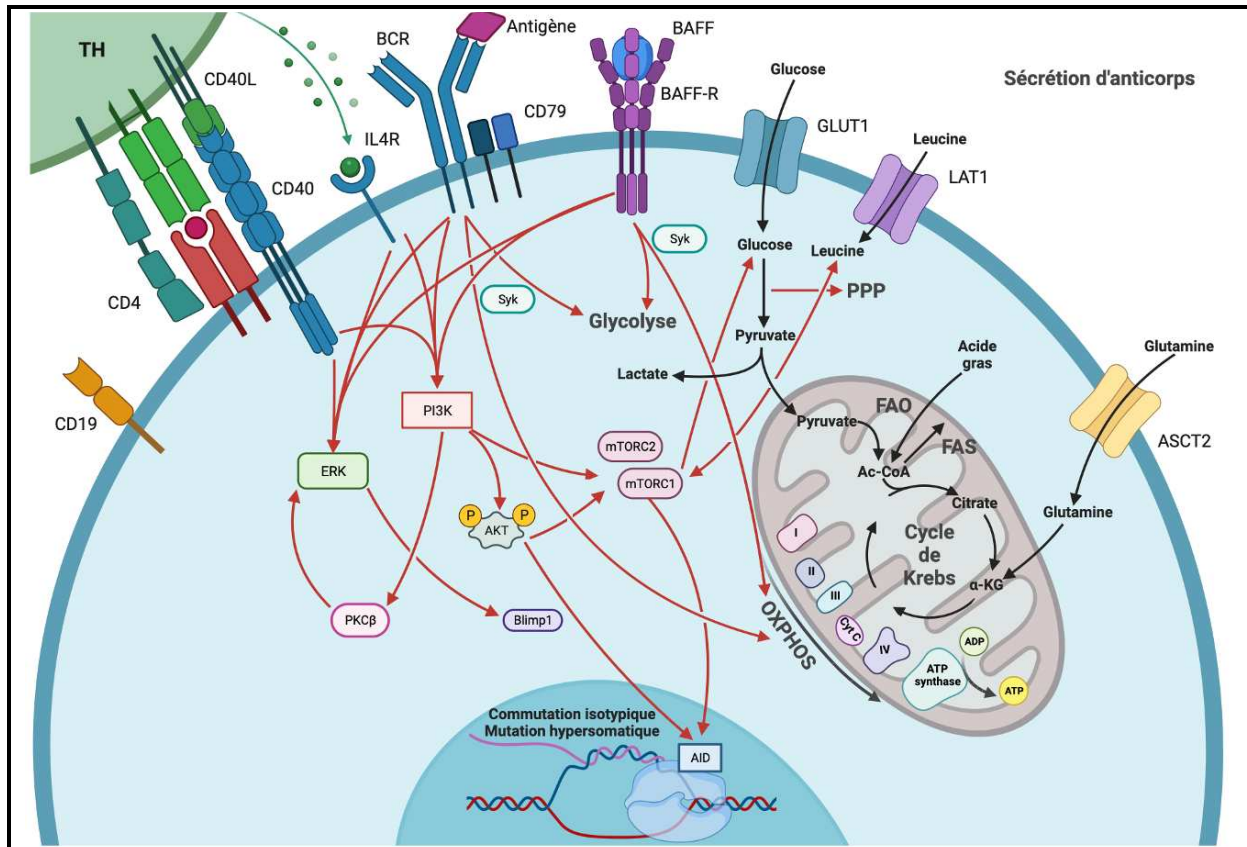
#### *I.2.iv. L'immunité à médiation humorale*

##### *I.2.iv.a. Les lymphocytes B*

Les lymphocytes B (CD19<sup>+</sup>) participent à la réponse adaptative, étant la pierre angulaire de l'établissement de la réponse humorale. Le passage de l'état quiescent à l'état mature et actif dépend d'une stimulation externe au niveau de leur récepteur des cellules B (*B cell receptor*, BCR), de leurs corécepteurs et/ou de leurs TLR, conjointement pour la majorité de leur population à des signaux de soutien provenant des lymphocytes T<sub>H</sub> (Murphy & Weaver, 2016). Comme nous l'avons vu précédemment pour les lymphocytes T, différents programmes métaboliques ont été rapportés et leur exécution participe au destin des lymphocytes B. Le métabolisme des LB peut orienter ces cellules soit vers la formation de plasmocytes soit vers la formation de LB germinaux centraux qui à terme pourront soutenir la formation de LB mémoire ou d'une deuxième vague de plasmocytes (Murphy & Weaver, 2016). Ces derniers devront avoir la capacité de supporter une synthèse protéique importante, cohérente avec des taux élevés de sécrétion d'anticorps (**Figure 21**).

À l'état naïf et de manière similaire aux LT, les LB arborent l'activation de voies métaboliques basales maintenue par leur BCR et BAFF-R (*B-cell activating factor receptor*) dont les signaux sont intégrés par la tyrosine kinase cytoplasmique SYK (*spleen tyrosine kinase*) (Schweighoffer et al., 2013, 2017). Cette signalisation aboutit, à l'état quiescent à de faibles taux de flux métaboliques, comme en témoigne les mesures d'oxymétrie et de sécrétion de lactate, évalués par l'acidification du milieu extracellulaire (*Extracellular Acidification Rate*, ECAR) sur les LB non stimulés (Akkaya et al., 2018). Si le glucose et la glycolyse représentent

une source importante de substrat pour la formation d'ATP via le TCA, les LB favorisent l'oxydation des acides gras pour alimenter le TCA et de manière subséquente la formation d'ATP par l'ETC. En effet, l'utilisation d'etoxomir, pour inhiber la FAO mitochondriale, conduit à une diminution de la respiration d'environ 60% chez les LB naïfs (Weisel et al., 2020).



**Figure 21 – Le rôle du métabolisme dans l'activation et la fonction des lymphocytes B.** Les lymphocytes B en quiescence arborent un métabolisme basal maintenu par leur BCR et BAFF-R dépendamment de SYK, aboutissant à de faibles taux de flux métaboliques. Ces cellules favorisent l'oxydation des acides gras pour alimenter le cycle de Krebs et la formation d'ATP. Lors de l'activation des lymphocytes B, les voies ERK et PI3K œuvrent à l'activation des complexes mTORC1, mTORC2 et à l'activation de la protéine kinase PKCβ. L'activation de ces voies favorise l'import de glucose et d'acides aminés. Le glucose sert à alimenter la lipogenèse fournissant les substrats nécessaires à l'OXPPOS. La glutamine dont l'import est aussi augmenté, participe également à l'alimentation de l'OXPPOS dans les lymphocytes B activés. Le métabolisme a également un rôle régulateur dans les mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique essentiels pour la génération d'immunoglobulines diverses, puisque mTORC1 et AKT sont impliqués dans l'expression de la désaminase AID responsable de ces phénomènes.

L'activation des LB conduit, par l'intermédiaire d'une stimulation dépendante du BCR et de BAFF-R, à la mise en place d'une signalisation ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) d'une part et phosphoinositide 3-kinase (PI3K) d'autre part. La voie de signalisation ERK est cruciale pour la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, mais aussi pour le destin



des lymphocytes B (Jacque et al., 2015; Otipoby et al., 2008). En effet, ERK favorise l'expression de BLIMP-1, qui est essentiel pour la maturation des LB naïfs (Yasuda et al., 2011). Mais de concert avec la voie PI3K, la voie ERK permet également l'établissement d'un métabolisme cellulaire compatible avec le destin des lymphocytes B, par l'activation des complexes mTORC1/mTORC2 et de la protéine kinase C $\beta$  (PKC $\beta$ ) (Blair et al., 2012; Doughty et al., 2006; Otipoby et al., 2008; Patke et al., 2006). Ainsi, on note une augmentation de l'import du glucose qui alimente alors préférentiellement la PPP plutôt que la glycolyse (Doughty et al., 2006). D'ailleurs confirmant cela, les carbones dérivés du glucose dans des études de traçage ont majoritairement été retrouvés dans les nucléotides ainsi que dans des intermédiaires lipogéniques, ces derniers servant par la suite de substrats à la synthèse des acides gras (*Fatty Acid Synthesis*, FAS), augmentant le pool d'acides gras disponible pour alimenter la respiration cellulaire (Waters et al., 2018). L'activité de mTORC1 est également en lien avec le métabolisme des acides aminés. En effet, suite à leur activation les LB internalisent plus de leucine et de glutamine, respectivement via LAT1 et ASCT2, qui sont connus pour activer mTORC1 (Cho et al., 2016). L'appauvrissement de ces acides aminés dans le milieu est d'ailleurs associé aux mêmes effets qu'une déficience de l'unité RAPTOR de mTORC1, à savoir, une différenciation altérée que ce soit en cellules plasmiques ou en cellules germinales (Raybuck et al., 2019). Il est important de noter que les capacités d'oxydation des LB sont plus importantes que celles des LT. Ainsi à l'activation, l'augmentation du flux glycolytique est supérieure à la sécrétion de lactate concomitante (Waters et al., 2018). Simplement, le glucose est plus utilisé pour fournir de l'acétyl-CoA (pour le TCA et la lipogénèse) que du lactate (Waters et al., 2018). Cependant, cet acétyl-CoA n'est pas le seul substrat disponible pour alimenter le TCA et donc l'OXPPOS qui a lieu dans les LB activés. En effet, suite à un stress glycolytique induit avec un milieu ne contenant que de la glutamine, sans glucose ni acides gras, la respiration mitochondriale n'est pas altérée (Boothby et al., 2022). Toutefois, l'acétyl-CoA fourni par la FAO, et donc ne

dépendant pas forcément d'un pool d'acide gras exogène, est utilisé par le TCA et la respiration cellulaire comme le montre l'utilisation d'etoxomir, et son effet sur l'OXPPOS dans les LB activés (Weisel et al., 2020). Enfin, mTORC1 et AKT s'illustrent dans la mise en place des mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique essentiels dans la génération d'immunoglobulines diverses, puisque la désaminase AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*) responsable de ces phénomènes est plus exprimée lorsque l'activité mTORC1 est accrue (Chiu et al., 2019).

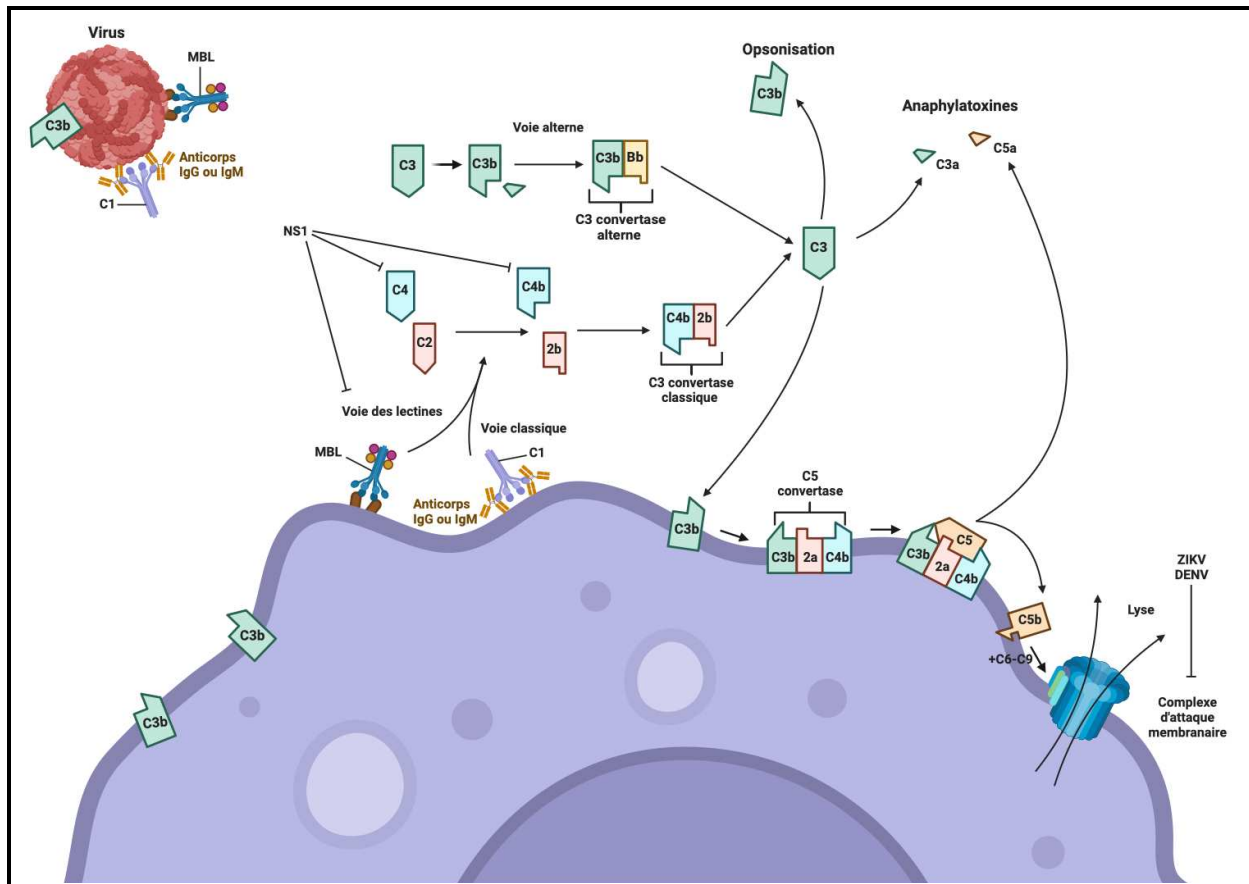
L'activation des lymphocytes B spécifiques d'antigène, avec le support en général de signaux de costimulation (CD40L / CD40), doit aboutir à la genèse d'une réponse humorale adaptative permettant l'élimination des virions circulants, ceci par le biais d'anticorps neutralisants. Cette réponse s'avère importante contre les *Flavivirus* puisque l'administration d'anticorps monoclonaux ou encore de sérums immuns confère une protection dans des modèles animaux (Elsterova et al., 2017; Keeffe et al., 2018). La neutralisation se caractérise par une diminution de la capacité des virus à infecter les cellules et résulte directement de l'encombrement de la particule virale par des anticorps. Les anticorps neutralisants dirigés contre les *Flavivirus* sont connus pour bloquer les étapes d'attachement et de fusion de la particule virale (L. Dai et al., 2016; Fibriansah, Ibarra, et al., 2015; He et al., 1995; Teoh et al., 2012). En effet, on sait qu'une variété d'anticorps sont produits avec la capacité de reconnaître une structure quaternaire participant à la fusion (L. Dai et al., 2016; Fibriansah, Tan, et al., 2015; Teoh et al., 2012). Parmi ces anticorps, une part importante de ceux retrouvés dans la circulation est représentée par des anticorps dirigés contre la boucle de fusion retrouvée dans le domaine II de la protéine E virale (Crill et al., 2009; L. Dai et al., 2016; Lai et al., 2013). Les cellules sécrétrices de ces anticorps font d'ailleurs partie des lymphocytes retrouvés à l'état de cellules B mémoires (Dejnirattisai et al., 2010, 2016).

#### I.2.iv.b. La facilitation de l'infection par les anticorps

Cependant, dans le cas spécifique de DENV la facilitation de l'infection par des anticorps préexistants contre un autre sérotype ternit le tableau que nous venons de dresser sur l'efficacité de l'immunité humorale basée sur les anticorps. En effet, alors que le phénomène d'ADE a été démontré pour plusieurs familles de virus *in vitro*, la preuve d'un rôle de ce phénomène dans la pathogenèse associée à une infection *in vivo* en revanche est restée limitée. Parmi les cas où un tel phénomène a démontré sa réalité pathologique on peut compter les infections secondaires par DENV (Brandt et al., 1989; Nimmanitya et al., 1988). Ainsi, la transmission passive d'anticorps réactifs contre DENV à des primates augmente la virémie et les conséquences de l'infection en cas d'inoculation du virus (S. B. Halstead, 1979). Chez l'Homme, l'étude d'une cohorte longitudinale a évoqué l'existence d'une gamme de concentration en anticorps cross-réactifs prédisposant aux formes graves en cas de réinfection (Katzelnick et al., 2017). Le phénomène d'ADE dans le cas du virus de la Dengue a d'ailleurs soulevé des questionnements dans le cadre de la stratégie vaccinale, comme nous l'avons vu avec le vaccin tétravalent Dengvaxia®. Le mécanisme d'ADE repose sur la présence d'anticorps dirigés contre un sérotype de DENV alors qu'une infection par un autre sérotype est en cours, les anticorps préexistants sont alors retrouvés avec des titres circulants trop faibles pour être neutralisants, mais également plus élevés que nécessaire pour l'attachement durable aux récepteurs Fcγ (S. B. Halstead, 2003). Ces anticorps sub-neutralisants forment des complexes immuns avec la particule virale et seront reconnus par les cellules exprimant le récepteur Fcγ (Peiris et al., 1981). Puisque le principe de neutralisation des particules virales consiste majoritairement en la large occupation des épitopes nécessaires à l'entrée virale, la neutralisation permise par les anticorps dans ces circonstances n'est pas optimale, et permet à la particule ainsi internalisée d'accomplir son étape de fusion et d'initier son cycle viral.

#### I.2.iv.c. Le complément

Le complément regroupe un ensemble de facteurs protéiques produits par le foie et retrouvés à l'état soluble dans le sérum qui ont la capacité de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs), et de les lier par opsonisation, mais ils agissent également en « complément » des anticorps en se fixant aux complexes immuns. Les activités du complément permettent l'inhibition de l'infection par différents virus, mais dans le cas des *Flavivirus* il a un rôle ambivalent, comme c'est le cas pour d'autres composantes de l'immunité (Avirutnan et al., 2008; Stoermer & Morrison, 2011). L'activation du complément repose sur la protéolyse des facteurs circulant grâce à trois voies distinctes (**Figure 22**). La voie classique d'activation est initiée lorsque le facteur C1q se lie à un complexe anticorps/pathogène ou anticorps/cellule infectée, alors que la voie des lectines est déclenchée par la reconnaissance de certains glucides retrouvés à la surface des pathogènes ou des cellules apoptotiques par la *Mannose-Binding Lectin* (MBL) (Ricklin et al., 2010). Enfin, il existe un niveau d'activation basal du complément, représenté par la voie alterne et permise par une protéolyse spontanée (Ricklin et al., 2010). Ces différentes voies d'initiation mènent à la protéolyse du facteur C3 en C3a et C3b. C3a est un petit fragment soluble permettant le recrutement des leucocytes, alors que C3b va se lier de manière covalente aux surfaces cellulaires et virales, et initiera la formation de la C5 convertase via deux assemblages différents, C4bC2bC3b et C3bBbC3b, ce qui aboutira au clivage de C5 et au recrutement des facteurs formant le complexe d'attaque membranaire (*Membrane Attack Complex*, MAC) (Ricklin et al., 2010; Serna et al., 2016). La formation de ce complexe à la surface de la cellule infectée permettra alors sa lyse. De manière similaire, la lyse directe du virus (virolyse) peut être induite par la formation du MAC. Par ailleurs, l'opsonisation de la surface du pathogène et de la cellule infectée, par les facteurs du complément, facilite leur phagocytose via les récepteurs du complément CR1, CR3, CR4 et CRIg (Ricklin et al., 2010).



**Figure 22 – Système du complément lors de l'infection par un *Flavivirus*.** Les trois voies d'activation du système du complément (classique, lectines et alterne) conduisent à la formation de la C3 convertase, qu'elle soit classique ou alterne. La C3 convertase intervient dans la formation de la C5 convertase qui va elle-même permettre, avec d'autres composants du complément, la formation de complexes d'attaque membranaire. Les produits de clivages des protéines du complément qui n'interviennent pas dans l'opsonisation, ou dans la composition des convertases, jouent le rôle de chemoattractants/anaphylotoxines.

Dans le cadre de l'infection par les *Flavivirus*, des concentrations croissantes de facteurs du complément ont montré la capacité de neutraliser DENV en culture cellulaire et *in vivo*, et ce même en l'absence d'anticorps, grâce à l'activation de la voie des lectines (Fuchs et al., 2010). Par ailleurs, la présence des facteurs du complément dans la circulation est bénéfique à la réponse humorale adaptative. En effet, l'activité du complément potentialise les capacités de neutralisation des anticorps, réduisant de ce fait le titre en anticorps circulants nécessaire pour que ceux-ci soient neutralisants (Mehlhof et al., 2009). De plus, il semble que la formation du complexe d'attaque membranaire par la voie classique a un effet positif, en diminuant la virémie dans le cas de l'infection par ZIKV (Schiela et al., 2018). Néanmoins, l'activité du complément semble être la cible de contre-mesures inhibitrices limitant ses bienfaits lors de l'infection.

DENV et ZIKV sont ainsi capables d'inhiber la formation du MAC respectivement par leur protéine NS1 et E, mais également de fixer d'autres facteurs du complément (C4, C4b, C9 et MBL) en ce qui concerne DENV (Avirutnan et al., 2007, 2010; Conde et al., 2016; Malekshahi et al., 2020; Thiemmecca et al., 2016). Enfin, venant un peu plus ternir le tableau, il est même supposé depuis longtemps que le complément puisse participer à la pathogenèse des formes sévères d'infection par la Dengue, notamment via une activité inhibitrice de NS1 (voir *I.1.viii.a. La protéine NS1*) (Avirutnan et al., 2006; Bokisch et al., 1973; Cabezas et al., 2018; Churdboonchart et al., 1983).

*I.2.v. L'immunité intrinsèque : implications du métabolisme cellulaire dans la détection des virus et la réponse antivirale associée*

Jusqu'ici, l'immunométabolisme a été défini comme l'impact que peut avoir le métabolisme cellulaire sur la mise en place de la réponse immunitaire, en se concentrant principalement sur les cellules faisant partie du système immunitaire, qu'il soit adaptatif ou inné. En effet, bon nombre de revues de la littérature font la part belle aux cellules immunitaires et aux voies métaboliques impliquées dans leur activation et leur fonctionnalité. Cependant, l'immunométabolisme devrait également intégrer les réponses précoces mises en place par les cellules parenchymateuses et conjonctives lors d'un dommage ou d'une infection tant ces réponses sont essentielles au contrôle immun de pathogènes mais également à la mise en place subséquente des réponses immunitaires à proprement parler. C'est pourquoi nous allons à présent nous intéresser aux cellules en première ligne lors d'une infection et comment leur métabolisme, ainsi que son contrôle inhérent à l'infection, peut participer à une réponse antivirale plus ou moins efficace.

*I.2.v.a. Les voies métaboliques impliquées dans la détection virale et la sécrétion d'interférons*

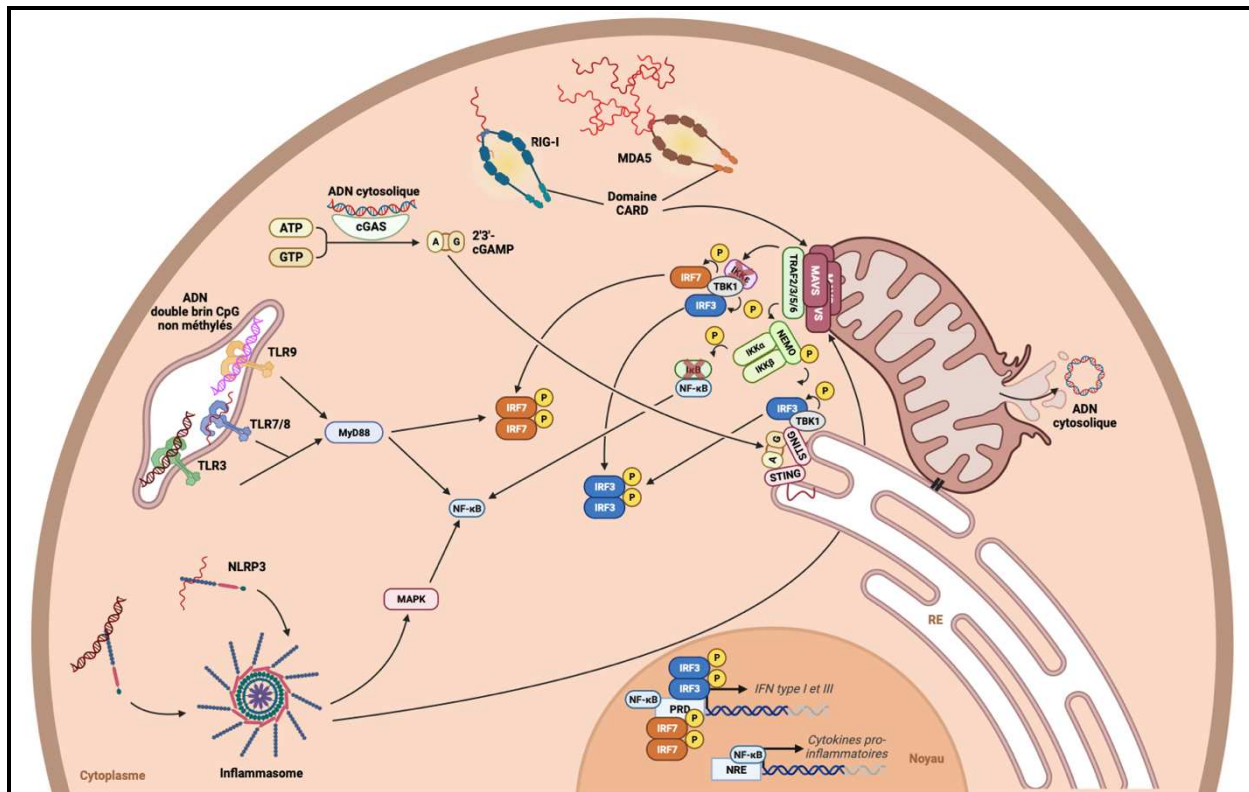
En effet, lors d'une infection virale, les cellules au site d'infection vont mettre en place une réponse antivirale reposant sur la sécrétion d'interférons de type I (comprenant les IFN- $\alpha$  et  $\beta$ )

et de type III (proches structurellement de la famille des IL-10) (Lazear et al., 2019). En ce qui concerne les interférons de type I, les cellules infectées vont sécréter majoritairement de l'IFN- $\beta$ , les sous-types d'IFN- $\alpha$  étant plutôt réservés aux cellules immunes, notamment les monocytes et les cellules dendritiques.

La sécrétion d'IFNs et la réponse antivirale qui en découle est dépendante de la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes PAMPs d'origine virale par les PRRs cellulaires (**Figure 23**). Parmi les PAMPs pouvant alerter la cellule infectée, les acides nucléiques viraux sont les médiateurs les plus puissants. Les PRRs dévolus à la détection de ces acides nucléiques d'origine virale sont variables selon leur type. Ainsi, la reconnaissance de l'ARN viral dans le cytosol des cellules infectées repose sur les récepteurs RIG-I-like (RLR), dont font partie RIG-I et MDA5. RIG-I a montré la capacité à lier les ARN arborant des motifs qui ne sont pas retrouvés chez les mammifères, telles que des coiffes 5'-PPP ou 5'-PP (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006). La détection via MDA5 par contre reste encore à explorer, même si MDA5 s'est montré essentiel comme senseur pour les ARN double brin synthétiques, comme l'acide polyriboinosinique:polyribocytidylique (poly :IC, PIC), et les picornavirus (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006). Dans les deux cas, la reconnaissance de leur ligand est suivie d'un changement conformationnel et à l'oligomérisation des RLR via leur domaine de recrutement et d'activation des caspases (*Caspase Activation and Recruitment Domains*, CARD), qui est aussi disponible pour lier le domaine CARD de MAVS (*mitochondrial antiviral-signalling protein*) ancrée dans la membrane mitochondriale par son domaine transmembranaire (Kowalinski et al., 2011; L.-G. Xu et al., 2005). Cette interaction RLR – MAVS conduit à l'activation des facteurs régulateurs de l'IFN (IRF) IRF3, IRF7 et NF- $\kappa$ B, via une cascade de signalisation impliquant le facteur associé aux récepteurs de TNF 3 (*TNF receptor associated factor*, TRAF3), TBK1 et IKK $\epsilon$ , ce qui aboutit à la sécrétion des IFN de type I et III (Paz et al., 2011). La détection de l'ADN cytosolique repose, quant à elle, sur l'axe cGAS/STING qui

malgré l'introduction d'autres senseurs, reste la voie plus relatée dans la littérature. En détectant l'ADN double brin cytosolique, cGAS (*cyclic GMP-AMP Synthase*) produit du GMP-AMP cyclique (cGAMP) conduisant à l'activation de STING (*Stimulator of Interferon Genes*) (Motwani et al., 2019). En retour, STING forme un complexe de signalisation avec TBK1 induisant IRF3 et l'expression des IFN de type I et III (Motwani et al., 2019). Au niveau endosomal, les TLR 3, 7/8 et 9 détectent respectivement l'ADN double brin, l'ARN simple brin et l'ADN contenant des dinucléotides CpG non méthylés (Chow et al., 2018). La signalisation par les TLR aboutit par des protéines adaptatrices qui leur sont propres (*TIR domain Containing Adaptor Molecule 1* – TICAM1 et *Myeloid Differentiation primary response 88* – MYD88) aux mêmes facteurs transcriptionnels que pour les voies RLR et cGAS/STING, à savoir l'activation et la dimérisation des IRF 3 et 7 (Chow et al., 2018). Enfin, la détection du génome viral peut aussi se faire par le biais de senseurs associés à l'inflammasome, les NLR (*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-Like Receptors*) dont plus particulièrement NLRP3 (*NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3*), induisant une signalisation MAPK-dépendante, associée à la mise en place de signaux inflammatoires aspécifiques (Swanson et al., 2019) ; mais également une signalisation via MAVS, conduisant comme précédemment à une réponse antivirale plus spécifique (Chow et al., 2018). Plus précisément, la détection de ZIKV et de DENV implique en premier lieu la reconnaissance des motifs en 5' du génome viral par RIG-I, la signalisation en aval étant dépendante d'IRF3 (Chazal et al., 2018; Nasirudeen et al., 2011). Lors de l'entrée de DENV, il semble que TLR7 puisse également participer à la détection endosomale du génome viral (J. P. Wang et al., 2006). Enfin, même si les *Flavivirus* sont des virus à ARN, l'axe cGAS / STING est partie prenante de leur détection. En effet, lors de l'infection par DENV, la localisation ectopique de l'ADN mitochondrial dans le cytoplasme promeut la production de cGAMP via le senseur cGAS (Aguirre et al., 2017).

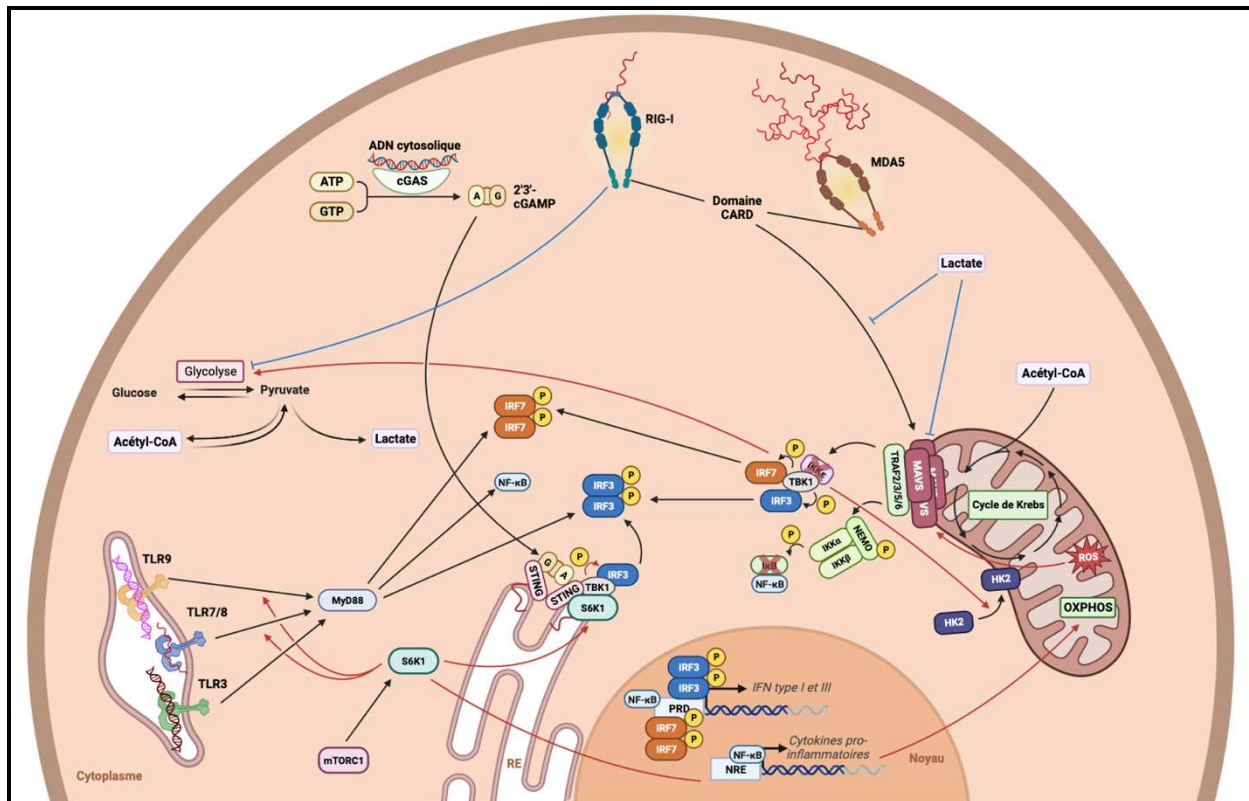




**Figure 23 – Mécanismes moléculaires menant à la détection du génome des *Flavivirus*.** La détection du génome des *Flavivirus* est dépendante de plusieurs voies intervenant de concert afin d'établir une réponse antivirale rapide et efficace. Ainsi, on retrouve l'activation des récepteurs *RIG-I like* (RLR), des récepteurs *Toll-like* (TLR) mais également de l'inflammasome via NLRP3. De plus, la libération d'ADN mitochondrial ou d'ADN cellulaire endommagé par les cellules infectées conduit à une détection par la voie cGAS/STING. Tous ces signaux d'alerte sont intégrés et mènent à l'activation de facteurs de transcription communs à ces voies de détection, à savoir IRF3, IRF7 et NF-κB, qui se chargeront suite à une interaction avec leur promoteur de permettre d'une part l'expression des interférons de type I et III, et d'autre part l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

L'étude de l'intrication du métabolisme dans la signalisation et la détection du génome viral a récemment rapporté des données intéressantes, telles que le rôle de la production de lactate dans la régulation de l'IFN (Figure 24) (W. Zhang et al., 2019). Grâce à une approche métabolomique réalisée dans un modèle de cellules embryonnaires rénales humaines (HEK293) stimulées avec du poly:IC, la régulation à la baisse de la glycolyse a été démontrée lors de la mise en place de la production d'IFN de type I dépendante de la voie RLR (W. Zhang et al., 2019). La diminution de la glycolyse relevée en cas d'activation de la signalisation par les RLR a notamment été associée à une diminution de la localisation mitochondriale d'HK2, essentielle pour pouvoir développer sa pleine fonctionnalité. Ces données semblent suggérer que la relation inverse entre la glycolyse et la signalisation antivirale conduit irrémédiablement à une

augmentation de la signalisation TBK1 – IRF3 et de la production d'IFN- $\beta$  (W. Zhang et al., 2019). Appuyant cette idée, les mêmes travaux ont mis en avant la fonction inhibitrice intrinsèque du lactate sur l'activation des RLR. En effet, la délétion de la sous-unité PDHc de la pyruvate déshydrogénase conduit à la déficience de la phosphorylation oxydative et à l'accumulation de lactate. Or ce métabolite a montré sa capacité à interagir avec MAVS et à limiter sa localisation mitochondriale, son association à RIG-I, ainsi que son agrégation, pourtant essentielles à la signalisation de la voie IFN (W. Zhang et al., 2019). En outre, si le lactate a un effet direct sur MAVS, aucun déficit n'a été rapporté dans ces modèles concernant la voie cGAS/STING (W. Zhang et al., 2019). Parallèlement, et corroborant le fait que la phosphorylation oxydative au contraire de la glycolyse favorise la signalisation par MAVS, la formation de ROS mitochondriaux s'est montrée indispensable à l'oligomérisation de MAVS. Ainsi l'inhibition de la formation des ROS mitochondriaux par un antioxydant ciblant spécifiquement ceux-ci, le MitoQ, aboutit à une diminution de l'oligomérisation de MAVS et donc à une sécrétion plus faible d'IFN- $\beta$  (Buskiewicz et al., 2016). En effet, les ROS mitochondriaux participeraient notamment à la peroxydation des lipides membranaires mitochondriaux, l'état de la membrane mitochondriale influant alors sur l'oligomérisation de MAVS (Nobre et al., 2015).



**Figure 24 – L'implication du métabolisme dans la détection du génome viral.** L'étude de l'influence des voies métaboliques sur la détection des pathogènes d'origine virale révèle l'intrication qui existe entre les acteurs du métabolisme la détection du génome viral. La voie mTORC1, et S6K1 faisant partie de cette voie de signalisation majeure, ont montré leur rôle dans la promotion des voies de détection dépendante à cGAS/STING et aux TLR. D'autre part, la glycolyse aérobie et son métabolite final, le lactate, ont montré une interaction négative avec la voie de détection dépendant des RLR, notamment en inhibant MAVS.

Le lien entre voies métaboliques et détection du génome viral, a aussi été mis en avant du côté de cGAS/STING et des TLR (**Figure 25**). En effet, chez des lymphocytes T, l'inhibition de mTORC1 aboutit à une diminution drastique de la production d'IFN de type I par rapport aux cellules contrôles, malgré une stimulation avec du cGAMP et un signal de costimulation ([Imanishi et al., 2019](#)). L'importance de mTORC1 sur l'activation de la voie cGAS/STING a été démontrée pharmacologiquement en utilisant de la rapamycine mais également chez des LT provenant de souris RAPTOR<sup>-/-</sup> ([Imanishi et al., 2019](#)). La recherche du mécanisme par lequel mTORC1 influe sur cGAS/STING a conduit à prouver que deux facteurs en aval de mTORC1, 4E-BP1 et S6K, auraient un rôle sur l'axe antiviral avec une portée prépondérante de S6K1 ([Imanishi et al., 2019](#)). Malheureusement, le lien entre cet effet et une variation particulière du métabolisme n'a pas été recherchée, alors même que mTORC1 régule finement le métabolisme

des LT, notamment lors de leur activation. Par contre, il a déjà été rapporté que l'inhibition spécifique de S6K1 par du PF-4708671 aboutissait à une glycolyse exacerbée et à une inhibition du complexe I mitochondrial, illustrant la relation intime S6K1 avec la phosphorylation oxydative et le métabolisme mitochondrial (Shum et al., 2016, 2019). Ces données appuient donc une fois de plus l'importance de la phosphorylation oxydative dans la sécrétion d'IFN de type I. En plus de son rôle sur le métabolisme cellulaire, S6K1 interagit directement avec STING via son domaine kinase pour former un complexe tripartite S6K1 – STING – TBK1 nécessaire à l'activation d'IRF3 (F. Wang et al., 2016). De manière similaire, la détection du génome endosomal par les TLR semblent être dépendante de mTORC1. En effet, chez des pDCs issues de souris, la stimulation du TLR9 par son ligand en présence de rapamycine engendre une production d'IFN de type I plus faible, et cette diminution a été corrélée à une réduction de la phosphorylation d'IRF7 chez les cellules traitées par la rapamycine (Cao et al., 2008). Comme précédemment, la voie impliquant S6K en aval de mTORC1 semble être impliquée (Cao et al., 2008). La détection de l'ARN endosomal semble elle aussi être impactée en cas d'inhibition de mTORC1, puisque l'immunisation de souris par la souche vaccinale du Yellow Fever Virus (17D), en présence de rapamycine aboutit à une diminution de la sécrétion d'IFN- $\alpha/\beta$ , cette fois liée à une régulation à la baisse de la signalisation passant par TLR7 (Cao et al., 2008). De manière intéressante, l'effet de mTORC1 semble se limiter aux axes cGAS/STING et TLR/MYD88, puisque l'utilisation de poly:IC comme antagoniste des RLRs en présence de rapamycine, n'entraîne aucune différence de production d'IFN avec la situation contrôle (Cao et al., 2008). Même si ces données ont été obtenues chez des cellules immunes, il est probable qu'un fonctionnement similaire soit retrouvé chez des cellules non-immunes. Ainsi, le contexte métabolique au moment de l'infection influe sur la mise en place d'une sécrétion d'interférons plus ou moins efficace.

### I.2.v.b. Dépendance de la réponse antivirale au métabolisme

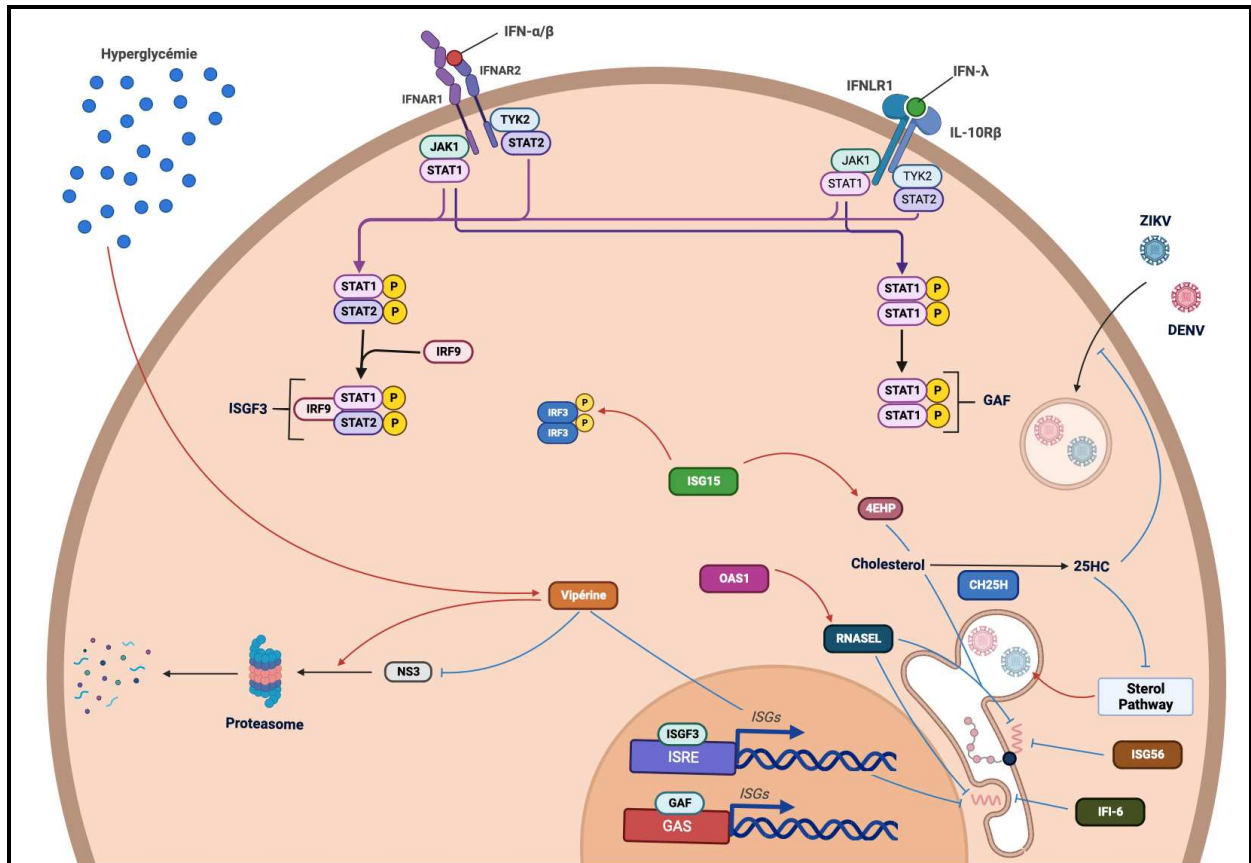
Un métabolisme adapté à la sécrétion d'IFN de type I et III est important puisque les IFN ainsi sécrétés pourront par une boucle d'activation autocrine et une action paracrine entraîner la production d'effecteurs antiviraux (Schoggins, 2019). Ces deux types d'IFN étant sécrétés de manière concomitante, il est difficile de déterminer leur effet intrinsèque sur la production d'ISGs. Ainsi, les IFN de type I et III se fixent sur leur récepteur respectif, à savoir IFNAR1/2 et IFNLR1/IL-10R $\beta$ , aboutissant via la voie JAK-STAT d'une part à la phosphorylation et l'homodimérisation de STAT1 (GAF, *Gamma interferon activation factor*) et d'autre part à la formation du complexe ISGF3 (*Interferon Stimulated Genes Factor 3*) composé d'IRF9, de STAT1 et de STAT2 phosphorylés (Schoggins, 2019). ISGF3 interagit par la suite avec l'élément de réponse sensible à l'interféron (*Interferon-Sensitive Responsive Element*, ISRE) alors que GAF interagit avec le site d'activation à l'interféron gamma (*gamma interferon activation site*, GAS), dans les deux cas conduisant à l'expression d'ISGs (**Figure 25**) (Schoggins, 2019). Les ISGs regroupent plusieurs effecteurs antiviraux aux effets variés. Si l'attachement n'a pour l'heure trouvé que peu de facteurs limitant, hormis l'héparanase (Schoggins et al., 2014), l'entrée est par contre la cible de plusieurs effecteurs antiviraux, incluant les gènes de résistance au Myxovirus (MX1 et MX2) ou les protéines des familles IFITM (*IFN-inducible Transmembrane*) et TRIM (*Tripartite Motif*). Ainsi, MX1 et MX2 semblent limiter l'arrivée des composants viraux à leur compartiment de destination (Kane et al., 2013; Kochs et al., 2002), les membres de la famille IFITM, majoritairement retrouvés dans les endosomes tardifs et les lysosomes, inhiberaient l'entrée des virus se servant de ces voies (Feeley et al., 2011; I.-C. Huang et al., 2011; Wilkins et al., 2013). Toutefois, leur mécanisme d'action n'est à ce jour toujours pas élucidé, d'aucun évoque une altération de l'acidification endosomale essentielle au processus de fusion, d'autres argumentent que les IFITM pourraient influencer directement sur les propriétés physiques des membranes endosomales et lysosomales (Wee et al., 2012). Parmi les ISGs inhibant l'entrée

virale, la cholestrol-25-hydroxylase (CH25H) a été rapportée pour plusieurs virus, dont DENV et ZIKV (C. Li et al., 2017). La CD25H catalyse la conversion du cholestérol en 25-hydroxy-cholestérol (25HC), cet intermédiaire est supposément impliqué dans l'altération des propriétés physicochimiques de la membrane et de ce fait l'inhibition de la fusion des virus enveloppés (S.-Y. Liu et al., 2013). Mais le 25HC jouerait aussi un rôle post-entrée en tant qu'inhibiteur de la voie de synthèse des stérols, celle-ci se révélant essentielle pour la progénie virale (Bordier et al., 2002, 2003; T. Y. Chang & Limanek, 1980; Kandutsch et al., 1978). La traduction des protéines virales est aussi une cible des effecteurs antiviraux, parmi lesquels, les protéines de la famille IFIT (*Interferon Induced Protein with Tetratricopeptide repeats*, ISG56/IFIT1, ISG54/IFIT2), la protéine kinase R (PKR) ou ISG15. PKR et les protéines IFIT régulent l'initiation de la traduction en interagissant avec les facteurs d'initiation eIF2 $\alpha$ , eIF3C ou eIF3E (J. Guo, 2000; Hui et al., 2003, p. 56; Pindel & Sadler, 2011; Terenzi et al., 2006). En sus, certaines protéines de la famille IFIT ont la capacité de reconnaître les coiffes de type 0 (sans 2-*O*-méthylation) ou de type 1 (<sup>m7</sup>GpppA<sub>m</sub>N) conduisant à l'inhibition de la traduction (Fleith et al., 2018; P. Kumar et al., 2014). Notamment, ISG54/IFIT2 semble avoir un effet inhibiteur sur le virus Zika, au contraire d'ISG56/IFIT1 (Wichit et al., 2019). La protéine ISG15, qui est un acteur principal de l'ISGylation intervenant lors des étapes post-traductionnelles de la production des protéines virales et de l'hôte, a montré de multiples fonctions selon la cible ISGylée (Durfee et al., 2010; Okumura et al., 2007; H.-X. Shi et al., 2010). Allant de la stabilisation d'IRF3, maintenant la signalisation en aval, à l'augmentation de l'affinité de 4EHP, un régulateur négatif de la traduction, pour la coiffe 5' des ARN messagers promouvant sa capacité à inhiber la traduction (Okumura et al., 2007; H.-X. Shi et al., 2010). Toutefois, l'implication d'ISG15 dans la réponse antivirale contre les *Flavivirus* reste ambiguë, tantôt facilitant ou réduisant l'infection par ZIKV selon le modèle cellulaire, et améliorant la réponse antivirale contre DENV et WNV d'autre part (J. Dai et al., 2011; P. K. Singh et al., 2019; Y. Wang et al.,

2020). Comme nous l'avons vu précédemment, la mise en place du complexe répliatif par la déformation du réticulum endoplasmique est un élément essentiel à la répliation des *Flavivirus*, ce phénomène est compliqué par l'expression d'IFI-6 (*Interferon  $\alpha$  inducible protein 6*) qui prévient les invaginations membranaires du RE nécessaires au complexe répliatif (Richardson et al., 2018). Aussi, l'expression de la 2'-5'-oligoadenylate synthase 1 (OAS1) lors de l'infection participe à l'activation de l'endoribonucléase RNase L en produisant des 2'-5'-oligoadenylates liés, celle-ci joue alors un rôle inhibiteur en réduisant la stabilité du génome viral. Cet axe s'est notamment illustré pour ses fonctions protectrices contre DENV, alors que ZIKV semble résistant à l'activité de RNase L (R.-J. Lin et al., 2009; Whelan et al., 2019). Enfin, la vipérine, faisant probablement partie des ISGs les plus étudiés, a été associée à des activités antivirales variées certainement en conséquence de l'éventail possible des cycles viraux établis (Helbig & Beard, 2014; Rivera-Serrano et al., 2020). Ainsi, pour ZIKV et DENV, la vipérine a montré son activité inhibitrice en interagissant avec la protéine NS3 et même en l'adressant au protéasome pour être dégradée, mais aussi en entravant la répliation du génome probablement par des interactions avec le génome viral au site de répliation (Helbig et al., 2013; Panayiotou et al., 2018).

La question de l'effet du métabolisme sur la production des effecteurs antiviraux en est cependant à ses premiers balbutiements par rapport aux travaux menés sur la détection des PAMPs et la sécrétion de l'IFN. Ainsi, il semble qu'une concentration élevée de glucose, généralement propice à la glycolyse, favorise l'expression d'une ISG essentielle au contrôle de l'infection par le virus Zika, la vipérine (**Figure 25**) (Reslan et al., 2022). Ce qui tranche avec les travaux explorant la détection des pathogènes et la sécrétion de l'IFN, puisqu'ici la glycolyse ferait la part belle à la production de cette ISG, là où elle semblait défavorable en amont de la signalisation par l'IFN. Pour autant, dans ces travaux l'expression d'aucune autre ISG n'a été explorée, et l'effet de la glycolyse pourrait être spécifique à la vipérine (Reslan et al., 2022).

C'est notamment un aspect que nous avons exploré dans ces travaux. Également, la place du métabolisme glutaminergique lors de l'infection virale et de la mise en place de la réponse antivirale reste en suspens dans la littérature (Koufaris & Nicolaidou, 2021). La L-glutamine est-elle indispensable au virus lors de sa réplication, ou serait-ce plutôt l'hôte qui en aurait besoin pour produire une réponse antivirale efficace (Koufaris & Nicolaidou, 2021) ?



**Figure 25 – Effecteurs antiviraux et *Flavivirus*.** La fixation des IFN de type I et III sur leur récepteur respectif aboutit via la voie JAK/STAT à la translocation nucléaire des facteurs ISGF3 et GAF. Ces facteurs interagissent avec leur promoteur respectif ISRE et GAS, résultant en l'expression des gènes stimulés par l'interféron (ISGs), qui sont les effecteurs de la réponse antivirale. Lors de l'infection par ZIKV et DENV plusieurs de ces ISGs ont montré une activité antivirale, que ce soit lors de l'entrée, de la réplication ou de l'assemblage du virus. D'autres ISGs comme ISG15 ont plutôt un rôle de promotion de la réponse antivirale, en favorisant l'activité de certains facteurs impliqués dans cette réponse. Si ce n'est le rôle d'une concentration élevée de glucose sur l'expression de la vipérine, l'implication du métabolisme dans l'expression des effecteurs antiviraux reste à explorer.

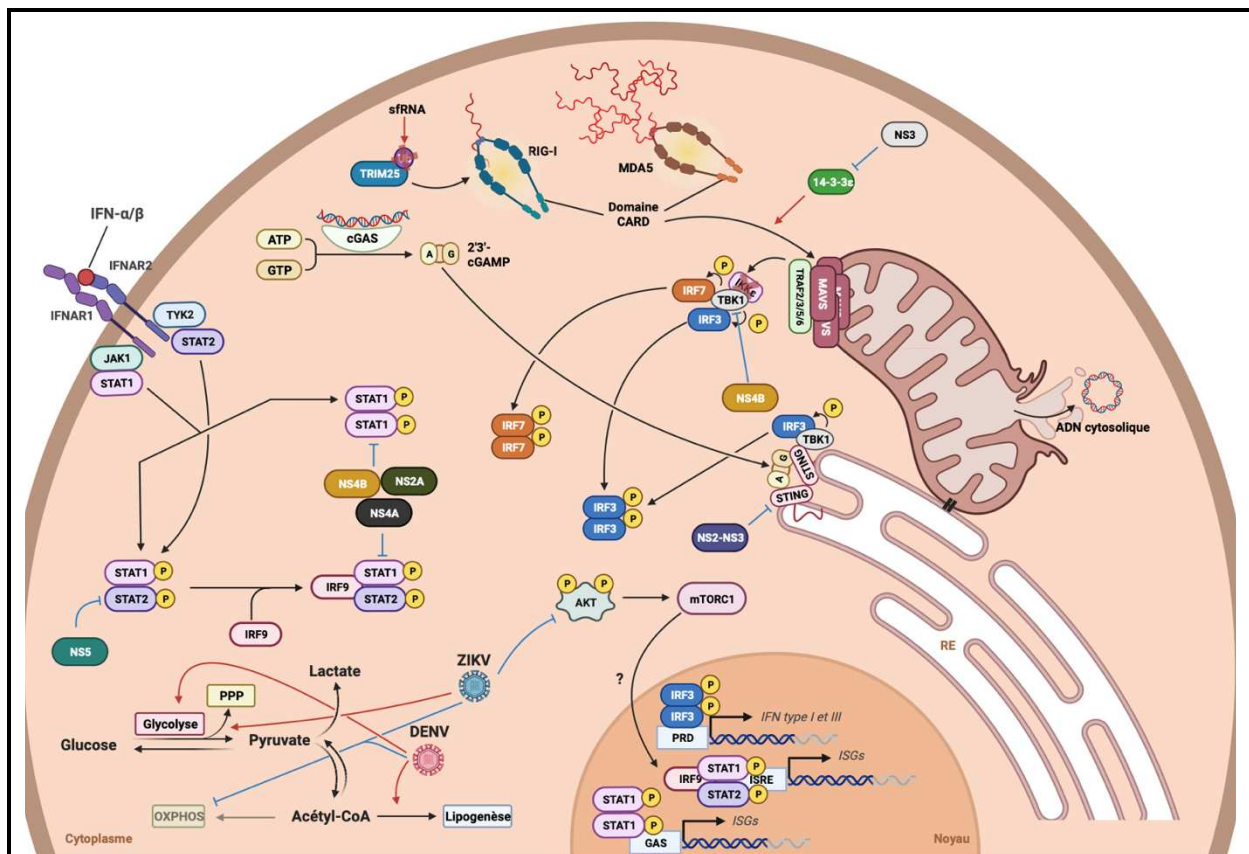
### I.2.v.c. Reprogrammation métabolique par les virus et éviction immunitaire associée

Ainsi, comme nous avons pu l'évoquer, l'établissement de la réponse interférons par la cellule infectée ou les cellules alentour est l'une des premières lignes de défense que doit affronter le virus pour se répliquer efficacement. Il n'est donc pas étonnant qu'au cours de leur évolution



commune avec l'hôte les virus aient développé des moyens de protection vis-à-vis de cette réponse. Il est d'ailleurs intéressant de noter que même si les méthodes employées pour juguler la réponse interférons diffèrent d'un virus à un autre, seuls quelques facteurs de l'hôte sont régulièrement ciblés pour l'endiguer. On se rend donc compte que peu de soupapes de sécurité séparent le virus d'une répllication efficace. La manipulation de la voie IFN par les *Flavivirus*, dont ZIKV et DENV, s'effectue à plusieurs niveaux. D'abord, la détection du pathogène, et donc la production d'IFN- $\beta$  en réponse, peut être la cible d'une régulation par les virus de la Dengue et Zika (**Figure 26**). Comme nous l'avons vu, le système de détection des motifs associés à DENV et ZIKV doit se heurter à la barrière physique que représente le complexe répllicatif, limitant l'accès au génome viral pour RIG-I et MDA5 (Uchida et al., 2014; Welsch et al., 2009). La détection dépendante de RIG-I est également impactée à la fois par les sfRNA de DENV, inhibant l'ubiquitinylation de TRIM25 nécessaire à l'activation de RIG-I, et une interaction protéique de NS3 avec la protéine 14-3-3 $\epsilon$  limitant la translocation mitochondriale de RIG-I (Chan & Gack, 2016; Manokaran et al., 2015). De plus, la 2-O-méthylation portée par le génome viral est aussi responsable d'une diminution de sa reconnaissance par RIG-I (D. C. Chang et al., 2016). Par ailleurs, l'amplification de la réponse antivirale par l'axe cGAS/STING grâce à la détection de l'ADN mitochondrial, libéré dû aux dommages induits par l'infection, est notamment entravée par le clivage de STING via la protéase virale NS2-NS3 et la protéine NS2B de ZIKV et DENV (Aguirre et al., 2012, 2017; Ding et al., 2018). TBK1, qui intervient dans la phosphorylation des IRF3 et 7, est quant à elle la cible de la protéine NS4, inhibant l'induction de l'IFN- $\beta$  lors de l'infection (Dalrymple et al., 2015; Xia et al., 2018). La régulation de la réponse antivirale mise en place par DENV et ZIKV intervient également sur la voie de signalisation en aval des récepteurs à l'interféron, particulièrement au niveau de l'expression et de la fonction des facteurs de transcription STAT1 et STAT2. En effet, la protéine NS4B du virus de la Dengue est capable de limiter la translocation nucléaire de STAT1 (Muñoz-Jordán

et al., 2003). Alors que la protéine NS5, à la fois de ZIKV et DENV, sont en capacité d'induire la dégradation protéosomale de STAT2 (Ashour et al., 2009; Grant et al., 2016). Il faut noter que certaines des régulations citées ici interviennent via des interactions protéine-protéine qui sont spécifiques de l'hôte humain. Ainsi, par exemple Stat2 murin n'interagit pas avec la protéine NS5 (Ashour et al., 2010; Grant et al., 2016). Dans la même lignée, DENV est incapable de cliver la protéine murine STING (T. Zhu et al., 2022). Ces variations conduisent à une restriction des *Flavivirus* spécifique à l'espèce murine et représentent donc une barrière à l'infection chez cette espèce.



**Figure 26 – Manipulation de la réponse interférons par ZIKV et DENV.** Les virus de la Dengue et Zika sont capables d'interférer avec la mise en place de la réponse antivirale à plusieurs niveaux. En limitant la détection de leur génome viral par le système RLR d'une part, via l'activité de leur sRNA ou de leurs protéines virales NS3 et NS4B. La signalisation dépendante de l'interféron est également altérée puisque STAT1 et STAT2 sont ciblés par les protéines virales inhibant l'expression des ISGs. Par ailleurs, ZIKV et DENV sont connus pour inhiber la phosphorylation oxydative, initialement, et favoriser respectivement la voie des pentoses phosphate et la lipogenèse. À cela s'ajoute pour les deux virus, une capacité à favoriser la glycolyse aérobie. Ces modifications du métabolisme pourraient avoir un effet sur la détection du génome et la production des effecteurs antiviraux, mais cet aspect doit encore être exploré.

La manipulation virale lors de l'infection ne concerne pas que les réponses mises en place par la cellule infectée. En effet, le virus réalise un véritable hold-up en usant de toute la machinerie ainsi que des composants cellulaires, à son avantage, afin de se répliquer. Parmi les mécanismes mis en place par la plupart des virus, on note un détournement du métabolisme cellulaire de l'hôte permettant la production rapide d'une quantité importante de biomasse (nucléotides, lipides, acides aminés) et d'énergie sous la forme d'ATP. Ainsi, pour répondre à leur besoin en ressource et en énergie, les virus provoquent chez la cellule infectée un effet semblable à celui déjà répertorié par Warburg pour les cellules cancéreuses (Allen et al., 2022; Goyal & Rajala, 2023; Thaker et al., 2019; Warburg, 1956). À savoir, une promotion de la glycolyse et le détournement du pyruvate vers la production de lactate plutôt que pour entrer dans le TCA et ce malgré le contexte aérobie, on parle alors de glycolyse aérobie ou d'effet Warburg. Ceci aboutit à la production rapide d'énergie mais également d'intermédiaires pouvant intervenir dans d'autres voies métaboliques essentielles à la formation de biomasse, comme la PPP par exemple pour les acides nucléiques (Thaker et al., 2019). À cet effet Warburg-like, s'ajoute souvent une augmentation de la glutaminolyse, la glutamine alimentant alors de manière anaplérotique le TCA, ses intermédiaires permettant également la production de biomasse (Allen et al., 2022). De manière non exhaustive, on peut ainsi citer l'exemple du virus de la Dengue qui par l'utilisation respective de ses protéines non-structurales NS1 et NS3 peut induire une glycolyse aérobie, comme l'illustre l'augmentation de la production de lactate 10 heures post-infection, et augmente la lipogenèse cellulaire (Allonso et al., 2015; Fontaine et al., 2015; Heaton et al., 2010). ZIKV pourrait également altérer l'activité mitochondriale, en détournant l'usage des intermédiaires de la glycolyse vers la PPP, résultant en une dysfonction mitochondriale qui participerait aux défauts congénitaux chez le nouveau-né issu d'une mère infectée (Figure 26) (Ledur et al., 2020; Yau et al., 2021). L'importance de cet impact sur l'activité mitochondriale est à relativiser selon le modèle cellulaire (Sahoo et al., 2023). De plus, on peut

noter une action d'origine virale au niveau des récepteurs dévolus aux nutriments, influant sur la disponibilité de ces nutriments et nécessairement sur les voies métaboliques les concernant. L'expression de transporteurs tels que GLUT1 peut donc être régulée à la hausse, c'est notamment le cas lors des infections par HIV et le virus d'Epstein-Barr (Anzinger et al., 2018; Loisel-Meyer et al., 2012; J. Zhang et al., 2017).

Or, puisque la réponse antivirale semble reposer sur un métabolisme adéquat pour être plus efficiente, le métabolisme est une cible intéressante pour l'évasion immune. Ainsi, il a été démontré que les Poxvirus produisent la protéine F17 ayant la capacité d'interagir avec les sous-unités RICTOR et RAPTOR des complexes mTORC1 et mTORC2, entraînant leur séquestration et donc une dysrégulation de mTOR (Meade et al., 2018). Par ailleurs, comme évoqué précédemment, mTOR participe à la régulation de la réponse antivirale cGAS/STING-dépendante via S6K (Imanishi et al., 2019). La séquestration de RICTOR et RAPTOR par F17 conduit donc in fine à une diminution de la sécrétion d'ISGs (Meade et al., 2018). De manière similaire, les protéines NS4A et NS4B de ZIKV inhibent la voie de signalisation AKT – mTOR, sans que n'ait été exploré l'effet sur l'expression des gènes antiviraux (Liang et al., 2016). Il a également été démontré que le HIV se reposait sur une reprogrammation métabolique pour optimiser sa réplication, et que les cellules de personnes dites « contrôleuses » étaient réfractaires à cette reprogrammation, expliquant la faible réplication du virus chez ces individus (Angin et al., 2019). Les individus non-contrôleurs, ce malgré un traitement antirétroviral, voient le métabolisme de leur LT être dépendant du glucose, là où les LT de « contrôleurs » ont des sources métaboliques diverses pour assurer leur survie ainsi que leur fonction (Angin et al., 2019). Les cellules des individus contrôleurs présentaient d'ailleurs un meilleur profil d'effecteur avec notamment une expression plus importante d'IFNB1 ou encore de TNF, renforçant la capacité du HIV à détourner la réponse antivirale par un contrôle du métabolisme cellulaire (Angin et al., 2019). De manière intéressante, l'effet délétère de la reprogrammation métabolique sur le

contrôle de la réplication virale a pu être levé en traitant les cellules d'individus non-contrôleurs avec de l'IL-15, diversifiant alors leur métabolisme cellulaire, notamment par une augmentation significative de la respiration cellulaire (Angin et al., 2019). Par ailleurs, soutenant le rôle de la mitochondrie dans la mise en place de la réponse immune innée, il a été établi que l'élongation mitochondriale associée à une inhibition de la fission médiée par DRP1 (*Dynamin-related Protein 1*), via la protéine NS4B du virus de la Dengue, limite la mise en place de la réponse antivirale dépendante de RIG-I, au profit de la réplication virale. Si l'élongation mitochondriale est régulièrement associée à une augmentation de l'OXPPOS et de la production de ROS, c'est plutôt ici l'altération de la plateforme mitochondrie – RE qui semble à l'origine de l'inhibition de la réponse antivirale (Chatel-Chaix et al., 2016).

## **II. Problématique et contexte de recherche**

Nous entrons actuellement dans une ère d'émergence virale, dont l'île de La Réunion a déjà été le théâtre il y a de cela quelques années, avec l'émergence d'une souche épidémique du virus du Chikungunya en 2005. Ce processus d'émergence semble s'accélérer, avec des occurrences régulières qui sont rapportées par les médias et les pouvoirs publics. SARS-CoV, MERS-CoV, Chikungunya, Zika, Ebola et SARS-CoV-2 sont autant d'espèces virales qui nous ont rappelé à l'ordre. Concernant, le virus de la Dengue qui s'est répandu à La Réunion depuis 2018, plusieurs sérotypes ont circulé de manière concomitante jusqu'en 2021, en s'accompagnant parfois de formes sévères et également de rares formes ophtalmiques. La situation géographique de l'île de La Réunion, dans l'océan Indien, l'expose d'une part aux émergences venant d'Asie mais également aux émergences venant d'Afrique, comme cela pourrait être le cas un jour de la part du virus Zika. C'est pourquoi, l'UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire et Tropical), s'attèle depuis sa création à étudier des virus qui représentent un risque particulier pour la population des îles du sud-ouest de l'océan Indien, même si les avancées effectuées auraient des retombées bien plus larges. L'équipe MOCA (Mécanismes

mOléculaires et Cellulaires des Agents biologiques) au sein de laquelle ces travaux de thèse ont été effectués s'intéresse à l'étude des arbovirus à travers le prisme de leurs interactions avec leur hôte. Un des aspects que nous désirions développer était l'étude de la pathogénicité des *Flavivirus* DENV et ZIKV en lien avec le métabolisme de l'hôte, surtout l'influence de ces contextes métaboliques sur la mise en place de la réponse antivirale développée en cas d'infection par ces virus. Le délai nécessaire pour obtenir des opportunités thérapeutiques pérennes est long. De ce fait, l'étude des déterminants métaboliques nécessaires à la mise en place d'une réponse antivirale plus efficace pourrait permettre de dégager de possibles mesures prophylactiques, à explorer plus en avant par la suite, notamment pour les individus souffrant de maladies métaboliques et qui présentent déjà un risque plus accru d'infection.

Auparavant, les données disponibles dans la littérature établissaient que les virus DENV et ZIKV réorientaient le métabolisme de la cellule infectée plutôt vers l'accroissement de la glycolyse et de la lipogenèse, au détriment de la phosphorylation oxydative. S'il est indéniable que cette reprogrammation métabolique est essentielle à la progénie virale, en fournissant au virus tous les composants nécessaires à sa réplication, le rôle qu'elle pourrait avoir sur la pathogenèse et sur la mise en place de la réponse antivirale n'était alors pas exploré. Les notions d'immunométabolisme appliquées à la réponse IFN développées plus haut, notamment le fait que des cellules résistantes à la reprogrammation de l'OXPPOS deviennent résistantes au HIV, nous ont poussé à émettre l'hypothèse que la diminution de l'OXPPOS induite à la fois par ZIKV et DENV se révèle importante pour réguler la réponse antivirale et donc établir un contexte plus propice à la réplication virale. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc entrepris d'établir un modèle d'infection, permettant d'étudier la réponse antivirale dans le cas d'une glycolyse privilégiée en comparaison à une OXPPOS privilégiée. Cette étude sur l'importance du métabolisme oxydatif lors de l'infection par les *Flavivirus* a également été l'occasion de revisiter

certaines de nos données avec un regard neuf, permettant de mettre en exergue l'importance du maintien d'un certain statut oxydo-réducteur pour le bon déroulement de l'infection.

# Résultats



**PARTIE I :**  
**Étude de l'influence de la phosphorylation  
oxydative sur la réponse antivirale**

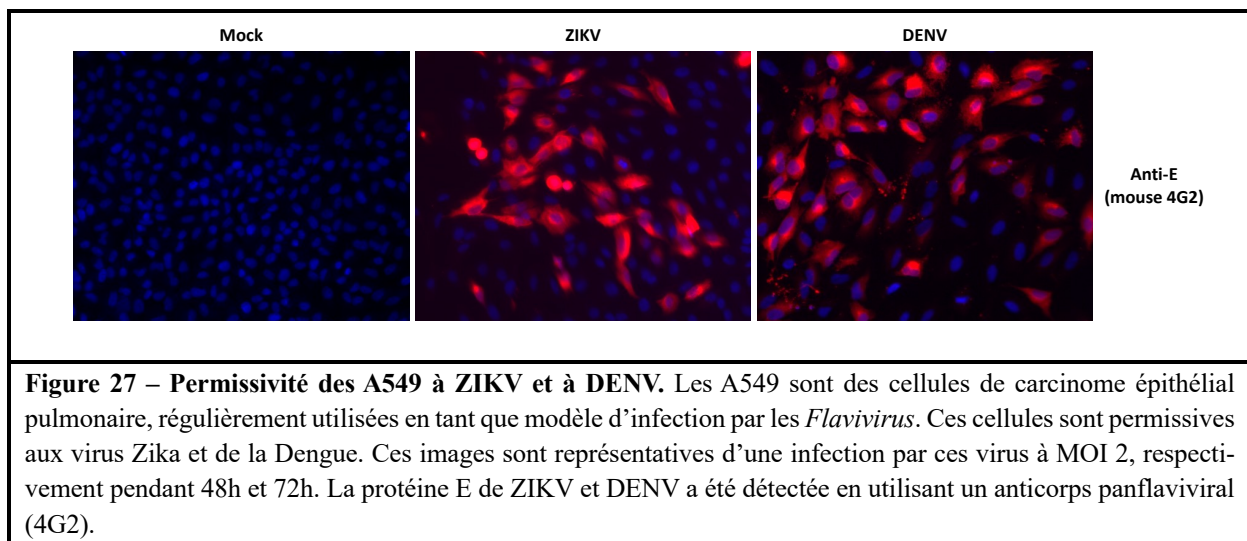
### III. Résultats

#### III.1. Étude de l'influence de la phosphorylation oxydative sur la réponse antivirale

##### III.1.i. La phosphorylation oxydative comme moteur de la réponse antivirale (Article 1)

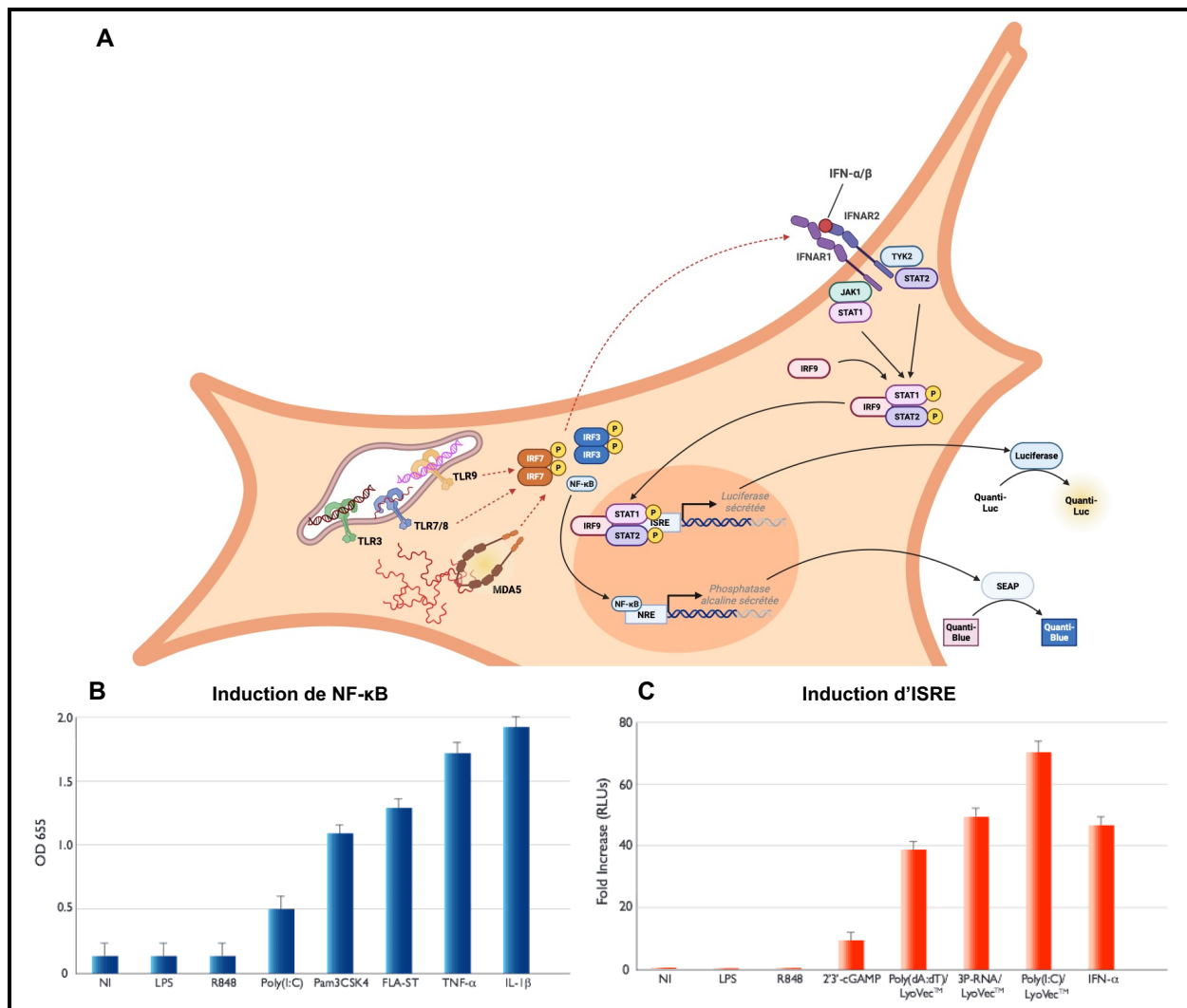
###### III.1.i.a. Mise en place du modèle

La première étape de ce travail de thèse aura donc été de mettre au point un modèle d'étude *in vitro* de la mise en place de la réponse antivirale dans différentes conditions métaboliques. Une fois ce modèle établi, nous l'utiliserions alors pour l'infection par les virus de la Dengue et Zika. Dans la perspective des infections futures, nous avons décidé d'utiliser des cellules permissives au virus de la Dengue et au virus Zika pour notre modèle. Au laboratoire, parmi les cellules présentant cette caractéristique, les A549, des cellules de carcinome épithélial pulmonaire, semblaient être le choix adéquat, puisque nous les utilisons régulièrement pour nos infections avec ZIKV, mais elles sont également permissives à DENV (**Figure 27**).



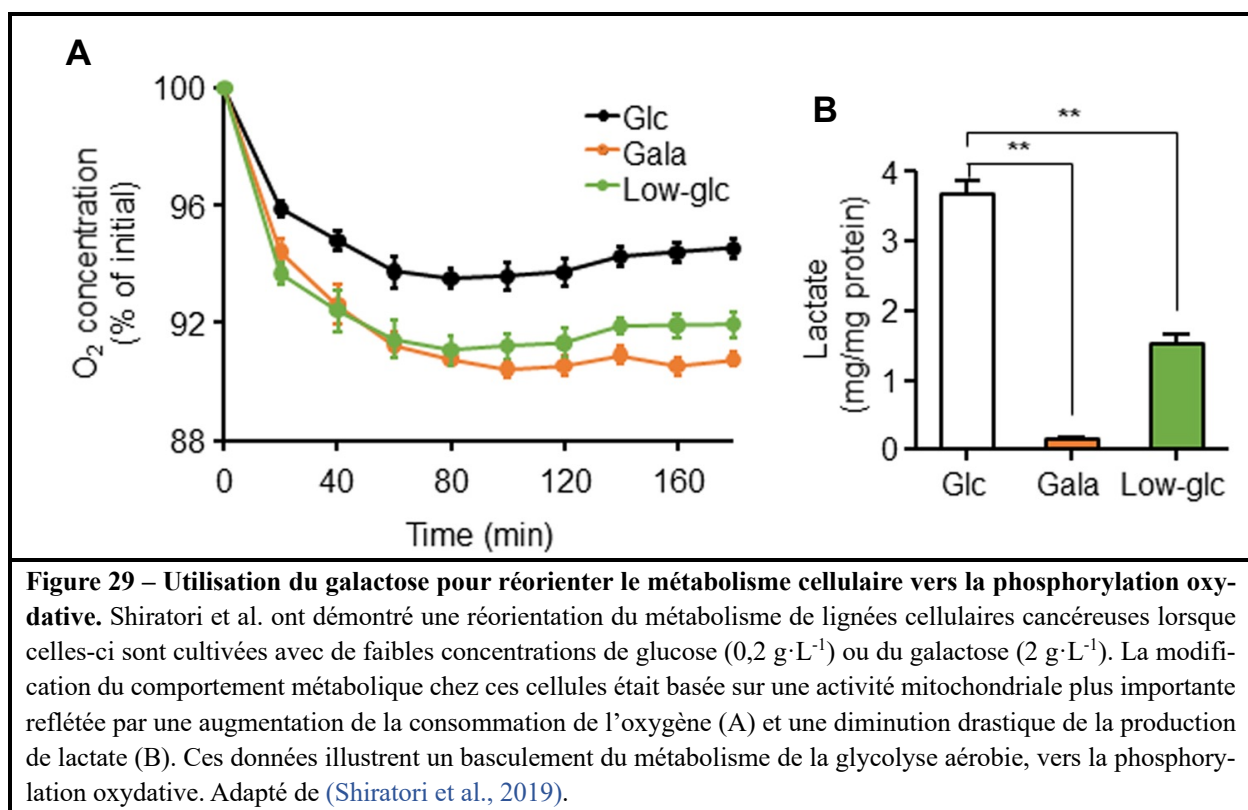
De plus, pour l'étude de la réponse antivirale, nous avons à notre disposition des A549 permettant l'exploration rapide de l'axe antiviral dépendant d'ISGF3 et NF- $\kappa$ B. En effet, les A549 Dual™ (A549<sup>Dual</sup>) sont des cellules rapportrices exprimant une luciférase sécrétée sous le contrôle du promoteur minimal de l'ISG54, qui permettent donc d'explorer la réponse antivirale dépendante de la sécrétion d'IFN de type I, l'intégration de ce signal via la voie JAK-STAT et la production des ISGs en conséquence (**Figure 28A**). La sécrétion de la luciférase et

l'émission de luminescence après l'ajout de son substrat reflète donc de manière fiable la production des ISGs dépendante d'un promoteur ISRE (**Figure 28C**). Les A549<sup>Dual</sup> sont également un système rapporteur pour la voie dépendante de NF-κB puisqu'elles expriment l'alkaline phosphatase sécrétée (SEAP) sous contrôle d'un élément NRE (*NF-κB responsive element*) (**Figure 27B**).



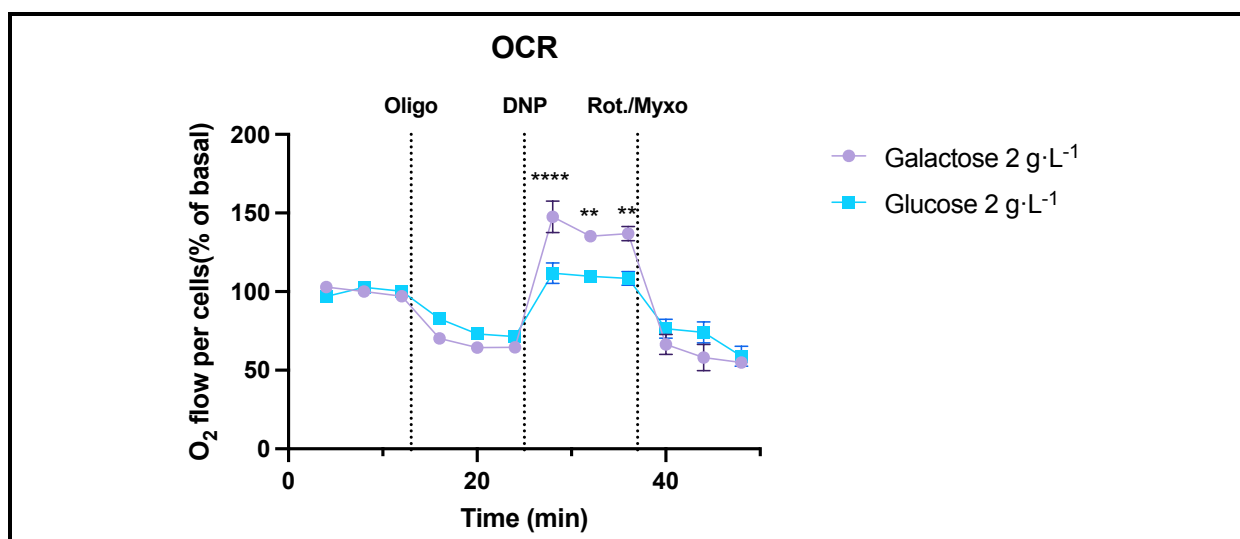
**Figure 28 – Systèmes rapporteurs NF-κB Blue et ISRE-Luciférase des A549 Dual™.** Les A549Dual sont des cellules rapportrices exprimant la phosphatase alcaline sécrétée (SEAP) sous contrôle d'un élément de réponse à NF-κB. La sécrétion et l'évaluation de l'activité de la SEAP dans le surnageant de culture des cellules permettent donc d'explorer l'expression et la production des gènes sous contrôle d'un tel élément de réponse. Aussi, ces cellules expriment la luciférase sous contrôle d'un promoteur ISRE. La quantification de la luminescence émise par le surnageant de culture des cellules permet donc d'explorer la réponse antivirale en aval des facteurs régulateurs de l'interféron IRF3 et IRF7. En conséquence, ce système permet d'évaluer l'expression et la production d'effecteurs antiviraux dépendante d'un promoteur ISRE. Comme l'illustrent les panels B et C, l'induction de ces systèmes rapporteurs répond à de nombreux stimuli (*A549-Dual™ Cells*, 2016).

Ces cellules sont dérivées d'un carcinome épithélial pulmonaire, leur métabolisme arbore toute la spécificité du métabolisme des cellules cancéreuses. Le métabolisme des A549 est soumis à l'effet Warburg, elles pratiquent donc la glycolyse aérobie au détriment de la phosphorylation oxydative, le pyruvate issu de la glycolyse est donc détourné vers la formation de lactate plutôt que d'alimenter le cycle de Krebs. L'utilisation de ces cellules pour comparer la mise en place de la réponse antivirale en contexte glycolytique et de phosphorylation oxydative nous a donc imposé le fait de trouver un moyen de réorienter leur métabolisme vers une situation plus physiologique, où l'OXPPOS est à l'origine de la production d'ATP. Pour contourner cette problématique, nous avons basé notre modèle sur les travaux de Shiratori et al. (Shiratori et al., 2019).



Dans ces travaux, l'équipe japonaise a réalisé que modifier le milieu de culture de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses permettait de restaurer leur capacité à réaliser la phosphorylation oxydative. Parmi les méthodes employées, les auteurs ont soit diminué la concentration de glucose, la passant de 2 g·L<sup>-1</sup> à 0,2 g·L<sup>-1</sup>, soit remplacé le glucose par du galactose à 2 g·L<sup>-1</sup>. Ces

modifications conduisent à une augmentation de la consommation de l'O<sub>2</sub> par les cellules cultivées avec une faible concentration de glucose ou avec du galactose (**Figure 29A**). Parallèlement, les auteurs rapportent une diminution drastique de la production de lactate (**Figure 29B**). Ces deux éléments traduisent la réorientation du métabolisme des cellules de la glycolyse aérobie vers la phosphorylation oxydative, soit exactement l'effet que nous recherchions.



**Figure 30 – Les A549<sup>Dual</sup> s'orientent vers l'OXPPOS en présence de galactose.** Nous avons comparé le taux de consommation d'oxygène d'A549<sup>Dual</sup> cultivées avec du RPMI contenant soit du glucose, soit du galactose 2 g·L<sup>-1</sup>. De l'oligomycine à 1 μM (Oligo) a été utilisée pour inhiber l'ATP synthase. 100 μM de 2,4-dinitrophenol (DNP) ont été utilisés en tant qu'agent découplant protonophorique, permettant d'atteindre la capacité respiratoire mitochondriale maximale. Enfin un mélange contenant 1 μM de roténone – 1 μM de myxothiazol a été utilisé pour découpler simultanément à la fois les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons, illustrant la consommation d'O<sub>2</sub> non mitochondriale. Ce graphique illustre que les cellules cultivées en RPMI avec du galactose ont une respiration mitochondriale accrue, avec notamment une capacité respiratoire maximale supérieure.

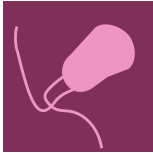
Confrontés à ces résultats, nous avons décidé de mettre en place notre modèle d'A549<sup>Dual</sup> en les cultivant avec du RPMI, ne contenant ni glucose, ni pyruvate, ni L-glutamine, dans lequel nous rajoutions d'une part du glucose pour arriver à la concentration finale de 2 g·L<sup>-1</sup> et d'autre part du galactose également à la concentration finale de 2 g·L<sup>-1</sup>. L'une des lignées cellulaires que Shiratori et al. avaient étudiées étaient les A549. Pour autant, nous avons entrepris de vérifier notre modèle avant de poursuivre notre étude sur la mise en place de la réponse antivirale. Ainsi, nous avons étudié par oxymétrie la variation de la consommation d'O<sub>2</sub> (*Oxygen Consumption Rate*, OCR) dans nos deux conditions de culture. Les A549<sup>Dual</sup> cultivées avec du milieu contenant 2 g·L<sup>-1</sup> de galactose ont effectivement une capacité respiratoire maximale

significativement plus importante que les cellules cultivées avec du glucose (**Figure 30**), illustrant la réorientation de nos cellules de la glycolyse aérobie vers l'OXPPOS.

### III.1.i.b. La phosphorylation oxydative est primordiale pour la production des effecteurs antiviraux

Comme nous l'avons développé dans la partie introductive, nous supposons que la phosphorylation oxydative joue un rôle central dans l'établissement d'une réponse interférons efficace, notamment du point de vue de la production des effecteurs antiviraux, expliquant en partie la récurrence du détournement du métabolisme vers la glycolyse aérobie lors d'une infection virale. Cependant, pour faire face à la capacité commune aux espèces virales, dont celles que nous voulions étudier, de limiter l'activation des voies déterminantes à la mise en place de la réponse IFN, nous avons décidé une fois notre modèle établi de s'affranchir de tout effet inhibiteur pour étudier la réponse antivirale. Ainsi, nous avons utilisé dans un premier temps un mimétique d'ARN viral, le poly:IC, afin d'induire l'axe antiviral. Après stimulation avec le poly:IC, le premier résultat intéressant que nous avons relevé est effectivement une augmentation de l'induction des ISG54/IFIT2 et ISG56/IFIT1 chez les cellules cultivées en galactose et qui donc ont une phosphorylation oxydative accrue. Pour confirmer le lien entre la phosphorylation oxydative et l'effet observé sur la réponse antivirale, nous nous sommes servis de la roténone, un inhibiteur du complexe I de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, utilisé dans la littérature pour inhiber l'OXPPOS. Le résultat frappant obtenu est qu'en présence de roténone, les cellules cultivées en galactose dont le métabolisme ne peut reposer que sur l'OXPPOS ont une abolition de l'effet observé précédemment. En effet, une diminution de l'induction de l'expression des ISGs quantifiée par RT-qPCR, qui retrouve un niveau similaire aux cellules cultivées en glucose, mais également de la production des ISGs reflétée par l'activité de la luciférase sécrétée dans le surnageant de culture, a été observée. Ces travaux nous ont

amené à la conclusion que la phosphorylation oxydative cellulaire était un pilier central à la production des effecteurs antiviraux en contexte infectieux.



Article

---

# The Efficient Antiviral Response of A549 Cells Is Enhanced When Mitochondrial Respiration Is Promoted

---

Grégoire Lebeau, Daed El Safadi, Aurélie Paulo-Ramos, Mathilde Hoareau, Philippe Desprès, Pascale Krejbich-Trotot, Florian Chouchou, Marjolaine Roche and Wildriss Viranaicken

## Special Issue

Host Immune Responses to RNA Viruses

Edited by

Dr. Stephanie Longet and Prof. Dr. Miles Carroll





## Article

# The Efficient Antiviral Response of A549 Cells Is Enhanced When Mitochondrial Respiration Is Promoted

Grégoire Lebeau <sup>1,\*</sup>, Daed El Safadi <sup>1</sup>, Aurélie Paulo-Ramos <sup>2</sup>, Mathilde Hoareau <sup>1</sup>, Philippe Desprès <sup>1</sup>, Pascale Krejbich-Trotot <sup>1</sup>, Florian Chouchou <sup>3</sup>, Marjolaine Roche <sup>1</sup> and Wildriss Viranaicken <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Plateforme Technologique CYROI, Université de La Réunion, INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, 94791 Sainte Clotilde, La Réunion, France

<sup>2</sup> INSERM, UMR 1188 Diabète Athérombose Réunion Océan Indien (DéTROÏ), Université de La Réunion, 97400 Saint-Denis, La Réunion, France

<sup>3</sup> IRISSE Laboratory (EA4075), UFR SHE, University of La Réunion, 97430 Le Tampon, La Réunion, France

\* Correspondence: gregorie.lebeau@univ-reunion.fr

**Abstract:** When exposed to a viral infection, the attacked cells promptly set up defense mechanisms. As part of the antiviral responses, the innate immune interferon pathway and associated interferon-stimulated genes notably allow the production of proteins bearing antiviral activity. Numerous viruses are able to evade the interferon response, highlighting the importance of controlling this pathway to ensure their efficient replication. Several viruses are also known to manipulate the metabolism of infected cells to optimize the availability of amino acids, nucleotides, and lipids. They then benefit from a reprogramming of the metabolism that favors glycolysis instead of mitochondrial respiration. Given the increasingly discussed crosstalk between metabolism and innate immunity, we wondered whether this switch from glycolysis to mitochondrial respiration would be beneficial or deleterious for an efficient antiviral response. We used a cell-based model of metabolic reprogramming. Interestingly, we showed that increased mitochondrial respiration was associated with an enhanced interferon response following polyriboinosinic:polyribocytidylic acid (poly:IC) stimulation. This suggests that during viral infection, the metabolic reprogramming towards glycolysis is also part of the virus' strategies to inhibit the antiviral response.

**Keywords:** antiviral response; ISGs; OXPHOS; mitochondrial respiration; metabolic reprogramming



**Citation:** Lebeau, G.; El Safadi, D.; Paulo-Ramos, A.; Hoareau, M.; Desprès, P.; Krejbich-Trotot, P.; Chouchou, F.; Roche, M.; Viranaicken, W. The Efficient Antiviral Response of A549 Cells Is Enhanced When Mitochondrial Respiration Is Promoted. *Pathogens* **2022**, *11*, 1168. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101168>

Academic Editors: Stephanie Longet, Miles Carroll and Lawrence S. Young

Received: 2 September 2022

Accepted: 7 October 2022

Published: 11 October 2022

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



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The 21st century is a reminder of how humanity is constantly exposed to the danger of infectious diseases. Most of them are caused by the emergence or re-emergence of viral infectious agents. We had to face the severe acute respiratory syndrome coronavirus outbreak (in 2003), the swine flu pandemic (in 2009), the Middle East respiratory syndrome coronavirus outbreak (in 2012), the Ebola virus disease epidemic (between 2013 and 2016), the Zika virus disease epidemic (in 2015), and recently, the SARS-CoV-2 and the monkeypox outbreaks [1–7]. In addition to these particularly worrying pathogens, more neglected viruses such as Dengue virus or Chikungunya virus cause epidemics whose impact on populations should not be underrated [8,9]. In addition, developed countries are faced with an increase in the prevalence of metabolic disorders [10,11] and an aging population worldwide [12], especially in Western countries. These characteristics could correlate with the observed weakening of the population against severe forms of infectious diseases [13–17]. It also suggests the importance that the host metabolism may have on the outcome of viral infections. In line with this assumption, it has already been shown that many viruses are able to interact with the metabolism of their host to take advantage of it [18–20].

Physiologically, the metabolism of a quiescent cell relies on tricarboxylic acid cycle (TCA) and subsequent oxidative phosphorylation to produce an adequate amount of

ATP, permitting to ensure all cellular functions [21]. Entry in TCA is mainly supported by pyruvate production, following intracellular glucose hydrolysis as the main source of tricarboxylic substrate [21]. Alternative tricarboxylic substrates exist and are, most of the time, derivatives of amino acids metabolism [21]. TCA allows the generation of reduced NADH and FADH<sub>2</sub>, which serve as electron transporters for the respiratory chain complexes [21]. Ultimately, oxidative phosphorylation, permitted by an aerobic environment and a suitable NADH and FADH<sub>2</sub> generation, occurs at the inner membrane of mitochondria with conversion of potential energy to ATP [21]. Oxidative phosphorylation remains the most potent source of ATP since 36 ATP are produced for 1 molecule of glucose, whereas in non-aerobic conditions, 2 ATP are produced for 1 molecule of glucose [22]. Nevertheless, a metabolism based on oxidative phosphorylation is less efficient for the production of biomass (i.e., amino acids, nucleotides, and lipids), explaining why dividing cells perform aerobic glycolysis to ensure biomass availability [22]. In addition, as cells undergo anarchic divisions, cancer cells are known to redirect their metabolism towards aerobic glycolysis by a phenomenon called the Warburg effect [23]. Similarly, during infection, viruses have been shown to hijack host metabolism and direct it towards aerobic glycolysis in order to generate a sufficient pool of building blocks for their replication [19].

It is noteworthy that host metabolism was shown to be particularly crucial in mounting an effective immune response [24–26]. Indeed, a shift of metabolism towards glycolysis was observed in macrophages, which is necessary for M1 polarization and the establishment of its pro-inflammatory capabilities [27], while oxidative phosphorylation was associated with M2 polarization of macrophages and their anti-inflammatory and reparative functions [27]. Focusing on antiviral response and metabolism crosstalk, contradictory data were found depending on the virus studied: if some inhibit the mTOR pathway, others instead induce the AMPK pathway. Thus, the mTOR pathway was shown to be altered by different viruses via mTORC1 activation, including HSV1 [28], HIV-1 [29], and HCV [30]. mTOR pathway is known to regulate the expression of several glycolytic enzymes, thus promoting glycolysis. On the other hand, the AMPK pathway, which mediates mTORC1 inhibition, was shown to be both altered or promoted, respectively, during DENV infection and ZIKV infection [31,32]. Despite these conflicting data, it should be noted that glucose metabolism has an important place in the development of the antiviral response. Indeed, recently, a link between glucose metabolism and virus struggling has been established in vitro. Differential amounts of glucose in the culture medium of human kidney cells could lead to increased expression of antiviral effectors during ZIKV infection [33]. Conversely, oxidative phosphorylation could be a trigger for the development of an appropriate antiviral response. Supporting this hypothesis, it was shown that cells resistant to the induction of aerobic glycolysis promoted by HIV, which also perform more oxidative phosphorylation, had a higher antiviral potential accompanied by a control of the virus [20]. Reinforcing the link between cell respiration and viral infection, flaviviruses were shown to affect the respiratory pathway of infected cells by disrupting mitochondrial fission through the action of NS4B on mitofusins [34], thus preventing the initiation of a mitochondria-dependent antiviral state due to decreased ROS production [35].

During replication, numerous RNA viruses go through a stage where their genome is found as a double-stranded RNA (dsRNA) in the infected cell's cytoplasm [36]. This dsRNA is recognized as a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) by the pattern recognition receptors (PRRs) (i.e., endosomal Toll-like receptor 3 and cytosolic RIG-I-like receptors), leading to IRFs' phosphorylation and translocation, ultimately resulting in type I IFNs' ( $\alpha/\beta$ ) release [37–39]. In a paracrine and autocrine manner, the released IFNs will induce a signaling cascade via IFNs  $\alpha/\beta$  receptors (IFNARs), leading to the production of antiviral proteins. The interferon-stimulated genes (ISGs) encoding antiviral proteins are under the control of promoters containing an ISRE or a gamma interferon activation site (GAS) element [40]. These antiviral effectors have various functions on the virus life cycle, including inhibition of viral entry, translation, replication, or even budding [41]. Alternatively, they are able to improve sensing or potentiate interferon

signaling pathways [41]. The acute antiviral response is one of the first mechanisms to take place following infection, as it is the first line of defense preventing the virus from spreading across the organism [42]. Thus, this response is achieved by non-immune cells as part of innate immunity, pending the deployment of a specific adaptive immune response [42]. Notably, ISG56/IFIT1 and ISG54/IFIT2 are both members of the ISG56/IFIT1 gene family encoding P56 family proteins [43]. P56 proteins are cytoplasmic proteins with a tetratricopeptide repeat motif [43]. They do not possess enzymatic activity but are known to exert their antiviral properties in a non-specific manner through general inhibition of cell translation [43]. In parallel, more specific activities have been described against HCV, SINV, or HPV [43].

Herein, we wondered if increased OXPHOS could be beneficial for the development of antiviral response. To address this question, we set up a model of improved mitochondrial OXPHOS based on the work of Shiratori et al. [44]. Then, we studied the antiviral response through the expression and induction of antiviral genes (i.e., ISGs). Interestingly, we describe here an enhanced antiviral response in cells that mainly perform OXPHOS in contrast to cells whose metabolism depends mainly on glycolysis. This effect on antiviral response was shown to be based on mitochondrial function, as no improvement was observed when using rotenone, a mitochondrial OXPHOS inhibitor.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cells and Reagents

The human A549-Dual™ (A549<sup>Dual</sup>) are adherent epithelial cells derived from A549 lung carcinoma cell line (ATCC, CCL-185™). A549D were purchased from InvivoGen (ref. a549d-nfis, San Diego, CA, USA). Lactate dehydrogenase (LDH) assay was performed using CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity assay from Promega (ref. G1780, Madison, WI, USA). Neutral red was purchased from Sigma-Aldrich (ref. N4638, Saint-Louis, MO, USA). Colorimetric lactate assay kit was purchased from Sigma-Aldrich (ref. MAK064, Saint-Louis, MO, USA). QUANTI-Luc™ substrate was obtained from InvivoGen (ref. rep-qlc1, San Diego, CA, USA). Rotenone was purchased from Sigma-Aldrich (ref. R8875, Saint-Louis, MO, USA). Poly(I:C) (HMW)/LyoVec™ (PIC) was purchased from InvivoGen (ref. tlrl-piclv, San Diego, CA, USA).

### 2.2. Cell Culture and Stimulation

A549<sup>Dual</sup> cells were cultured for maintenance at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in 4.5 g·L<sup>-1</sup> glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Dutscher, Brumath, France), 100 U·mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 0.5 µg·mL<sup>-1</sup> amphotericin B (PAN Biotech, Dutscher, Brumath, France) and containing 10 µg·mL<sup>-1</sup> blasticidin and 100 µg·mL<sup>-1</sup> zeocin (InvivoGen, San Diego, CA, USA) for selection of cells expressing NF-κB-SEAP and IRF-Luc reporters.

Antiviral response was induced using polyriboinosinic:polyribocytidylic acid (poly:IC), a double-stranded RNA composed of an inosine strand and a cytidine strand, which was complexed with transfection reagents to improve its uptake. Poly:IC is used as a natural immunostimulant simulating viral infection. Based on Shiratori et al. [44], A549<sup>Dual</sup> from passage 25 to 32 were cultured in RPMI-1640 (ref. P04-17550, PAN Biotech, Aidenbach, Germany) containing either glucose (2 g·L<sup>-1</sup>) or galactose (2 g·L<sup>-1</sup>) upon stimulation to promote metabolic reprogramming (Figure S1). Briefly, cells were plated in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS containing 2 g·L<sup>-1</sup> of glucose or 2 g·L<sup>-1</sup> of galactose. After 24 h of adaptation, cells were stimulated during 24 h using PIC at 0.25 µg·mL<sup>-1</sup>. In the same manner, assessment of antiviral response following cellular respiration inhibition was achieved using PIC at 0.25 µg·mL<sup>-1</sup> and rotenone at 1 µg·mL<sup>-1</sup> during 24 h. Prior to these manipulations, we determined that the use of PIC at a concentration of 0.25 µg·mL<sup>-1</sup> allowed the establishment of an effective antiviral response (Figure S3). In addition, the cytotoxicity of rotenone at 1 µg·mL<sup>-1</sup> was evaluated (Figure S4). Following stimulation,

cell culture supernatant was harvested and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , while cells were lysed using RLT Lysis Buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for subsequent RNA extraction.

### 2.3. Cytotoxicity Assays

A549<sup>Dual</sup> were plated in 96-well plate with a density of seeding corresponding to 10,000 cells per well. Cells were then treated, respectively, with DMEM, RPMI with glucose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , or RPMI with galactose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . DMEM–DMSO 10% was used as a positive death inductor. Then, 24 h after, the supernatant was harvested for LDH assay, and cells underwent neutral red assay.

LDH assay was achieved using CytoTox 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cytotoxicity assay from Promega following manufacturer recommendations. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of supernatant was mixed with 50  $\mu\text{L}$  of LDH substrate and incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Then, absorbance was read at 490 nm using a FLUOstar<sup>®</sup> Omega (BMG LABTECH, Offenburg, Germany).

$$\text{Percent cytotoxicity} = 100 \times \frac{\text{Experimental LDH release } (OD_{490})}{\text{Maximum LDH release } (OD_{490})} \quad (1)$$

Concomitantly, cell viability was assessed with neutral red uptake assay, as described by Repetto et al. [45]. Briefly, after removal of the cell culture supernatant, 100  $\mu\text{L}$  of medium (DMEM, RPMI with glucose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  or RPMI with galactose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively) containing 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of neutral red was added to each well. Cells were then incubated during 2 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Following incubation, the medium was removed, and cells were washed with PBS. Finally, 150  $\mu\text{L}$  of neutral red destain (50% ethanol, 49%  $\text{H}_2\text{O}$ , 1% glacial acetic acid) was added to each well. Absorbance was read at 540 nm using FLUOstar<sup>®</sup> Omega microplate reader (BMG LABTECH, Offenburg, Germany).

$$\text{Cell viability } (\%) = 100 \times \frac{\text{Experimental condition } (OD_{540})}{\text{Negative control } (OD_{540})} \quad (2)$$

### 2.4. Phenol Red Absorbance Measurement

Phenol red was used to assess pH in cell culture medium [46]. Cells were cultured in RPMI with glucose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  or RPMI with galactose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . At cell confluence, culture medium was harvested, and pH was evaluated by measuring the absorbance at 450 and 560 nm. Absorbance spectra were obtained using Secomam UviLine 9600 (Aqualabo, Champigny-sur-Marne, France). Results were normalized to the absorbance of fresh medium.

### 2.5. Lactate Assay

Production of lactate was assessed in the cell culture supernatant using a colorimetric lactate assay kit (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), following manufacturer instructions. Briefly, cells were cultured in RPMI with glucose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  or RPMI with galactose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , and at confluence, cell culture supernatant was harvested. Then, samples were deproteinized and concentrated using a 10 kDa MWCO spin filter 10 min at  $4000\times g$ . Following this, 50  $\mu\text{L}$  of supernatant was used for reaction and mixed with 50  $\mu\text{L}$  of the master mix reaction. Absorbance was immediately read at 570 nm using Infinite<sup>®</sup> 200 pro microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland). The amount of lactate present in each sample was determined from a lactate standard curve.

### 2.6. RT-qPCR

Total RNA was extracted from cell lysates by using the RNeasy Plus Mini Kit (cat. 74136, Qiagen, Hilden, Germany). The total cDNA was obtained by reverse transcription using random primers from Invitrogen (ref. 58875, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and M-MLV reverse transcriptase enzyme (ref. M1708, Promega, Madison, WI, USA) at  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 60 min. cDNA was then subjected to a quantitative polymerase chain reaction us-

ing a CFX96 Connect™ Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For amplification, Absolute™ Blue qPCR SYBR Green Low ROX mix (ref. AB-4322, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and specific primers were used to assess gene transcripts expression for following targets: ISG54 (F: 5'-CTGGTCACCTGGGGAAACTA-3', R: 5'-GAGCCTTCTCAAAGCACACC-3'), ISG56 (F: 5'-GCAGCCAAGTTTTACCGAAG-3', R: 5'-CACCTCAAATGTGGGCTTTT-3'), and RNA polymerase II (F: 5'-GCACCACGTCCAATGACAT-3', R: 5'-GTGCGGCTGCTTCCATAA-3'). A threshold cycle (Ct) was calculated for each single sample amplification reaction in the exponential phase of amplification, using Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Data obtained were processed using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, with RNA polymerase II serving as the housekeeping gene.

### 2.7. Measurement of the IFN- $\beta$ Pathway Activation

Activation of the interferon regulatory factors (IRF) pathway was monitored by measuring Lucia luciferase activity in A549<sup>Dual</sup> cells. It was evaluated using QUANTI-Luc substrate according to manufacturer's recommendations. Briefly, 100  $\mu$ L of QUANTI-Luc substrate was added to 20  $\mu$ L of cell culture supernatant, and IRF-induced luciferase levels were quantified by luminescence measurement using a Luminoskan™ microplate luminometer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Results are presented as fold-change ratio of luminescence emitted by supernatant from treated cells in comparison with control cells.

### 2.8. Statistical Analyses

Statistical analyses were done by two-way ANOVA using Graph-Pad Prism software version 9. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Degrees of significance are indicated in the figure captions as follows: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0002$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; ns = not significant.

## 3. Results

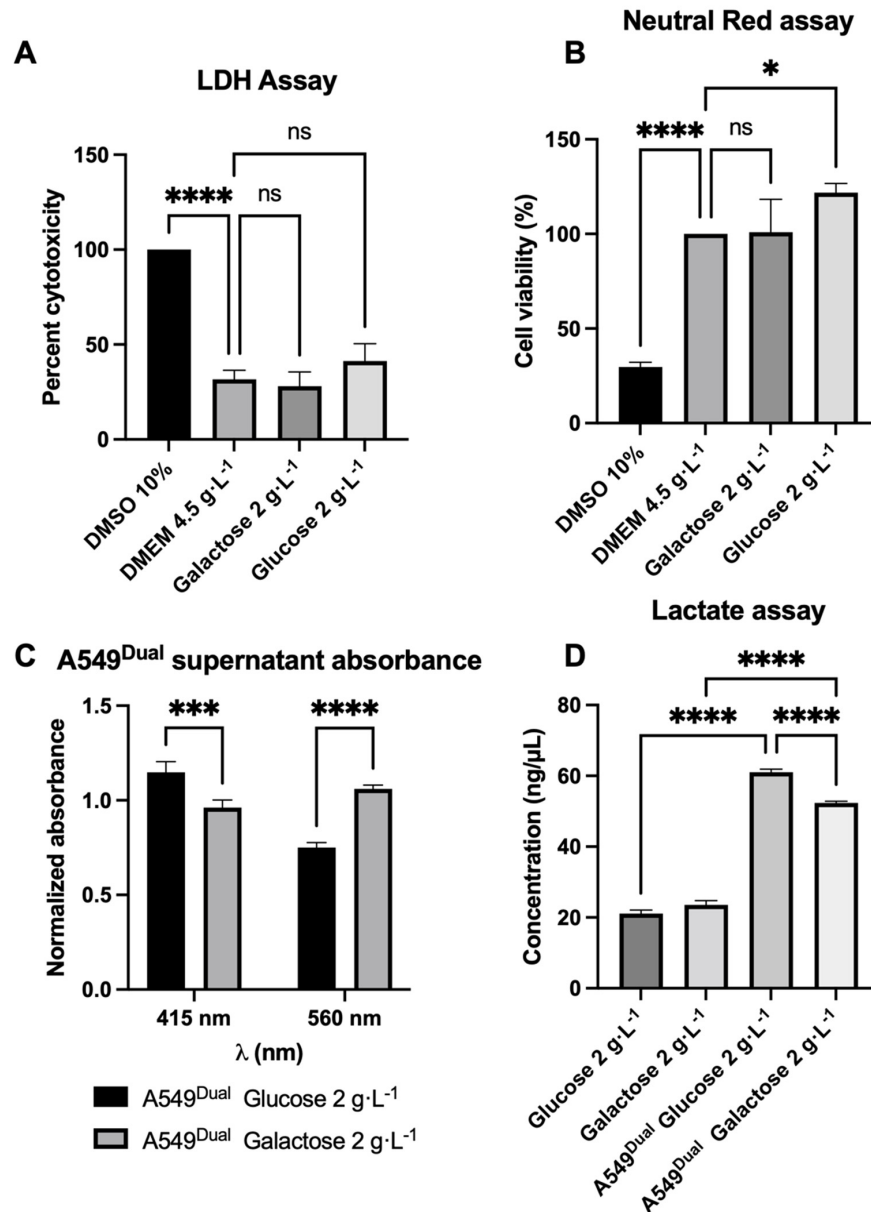
### 3.1. A549<sup>Dual</sup> Is a Suitable Model for Metabolic Reprogramming Study

To assess the potential of mitochondrial OXPHOS on the efficiency of the antiviral response, we set up a metabolic reprogramming model based on a work recently published by Shiratori et al. [44]. In their work, Shiratori et al. showed that alternative culture methods for several cancer cell lines (PANC-1, A549, and HeLa) lead to a change in the metabolic pathways responsible for ATP production. The cell-growing conditions allow an upregulated mitochondrial function and OXPHOS instead of glycolysis for ATP production [44]. Thus, similarly to their methods, we cultured the epithelial cell line A549<sup>Dual</sup> in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS and only containing glucose 2 g·L<sup>-1</sup> or galactose 2 g·L<sup>-1</sup> (Figure S1).

We first had to determine if the specific culture conditions with glucose or galactose 2 g·L<sup>-1</sup> would affect the viability of the A549<sup>Dual</sup>. To evaluate cell viability, we performed an LDH assay by measuring the activity of released LDH in the supernatant of our cells. As shown in Figure 1A, the cell culture conditions do not present any cytotoxicity. These results were confirmed by a neutral red uptake assay (Figure 1B).

It was previously described that cultivating cells in RPMI supplemented with galactose 2 g·L<sup>-1</sup> increases OXPHOS and O<sub>2</sub> consumption. This was notably evidenced, as ATP production was inhibited in the presence of oligomycin in contrast to cells cultured in glucose 2 g·L<sup>-1</sup> [44]. Moreover, a decrease in lactate production due to the shift from glycolysis to OXPHOS characterized cells cultured in galactose [44]. In order to validate the identical behavior of our A549<sup>Dual</sup> grown under the same conditions, we assessed the amount of lactate produced. To do so, we first measured the absorbance of the culture supernatant when cells reached confluence in the two culture conditions. The shift of phenol red from red to yellow is a potent indicator to assess the pH of the culture medium by measuring the absorbance at 415 nm and 560 nm [46]. Of note, it is known that diminution of pH in the culture medium is in part associated with production of lactate by the cells in culture [47]. Interestingly, we found that the supernatant of cells cultured in RPMI

glucose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  presents a higher absorbance at 415 nm and lower absorbance at 560 nm when compared to the cells cultured in RPMI galactose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 1C). For the same density of cells, this reflects acidification of the medium, which is more important for the cells cultured in glucose probably because of higher lactate production and release due to glycolysis.



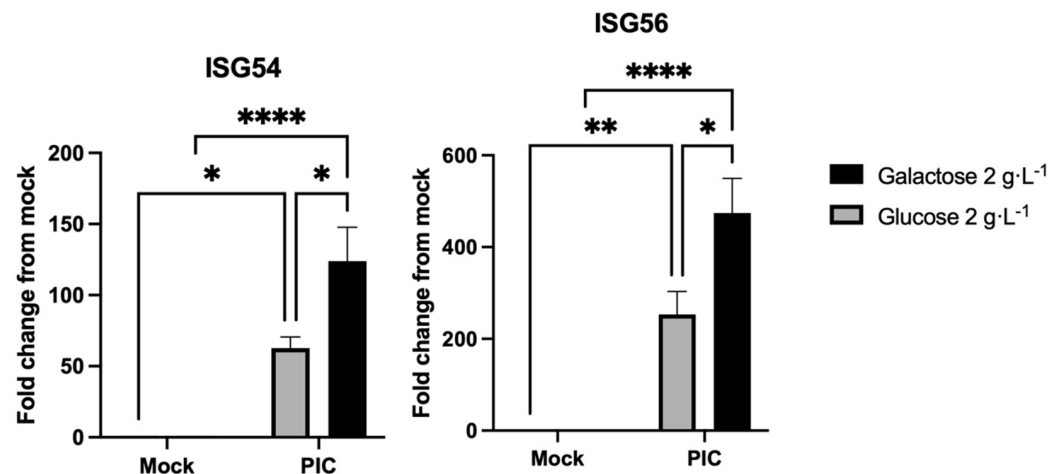
**Figure 1.** A549<sup>Dual</sup> reprogramming from glycolysis to OXPHOS. (A,B) The different culture conditions do not affect A549<sup>Dual</sup> viability. The RPMI medium supplemented with glucose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  or galactose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  does not affect cell viability as tested by both lactate dehydrogenase assay (A) and neutral red uptake assay (B) after 24 h of adaptation. DMEM-DMSO 10% was used for maximum death inducement. (C,D) The metabolism of cells grown in galactose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  is less dependent on lactate production. Lactate production has been assessed in the supernatant of cells, first by evaluating the pH of cell culture supernatant (C) and then by using a commercial kit (D). Both experiments show a lactate production consistent with what was described by Shiratori et al. [44]; thus, A549<sup>Dual</sup> cultured in galactose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  have a metabolism shift from glycolysis to OXPHOS. For absorbance measurement, OD were normalized to OD of fresh culture medium. Error bars represent standard errors of three independent experiments. ns = not significant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.002$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

To confirm this higher production of lactate and validate the suitability of our model for further experiments, we quantified the amount of lactate released under both culture conditions. Consistent with the previous result and with the work of Shiratori et al., we found that A549<sup>Dual</sup> cultured in galactose 2 g·L<sup>-1</sup> produce significantly less lactate than A549<sup>Dual</sup> cultured in glucose 2 g·L<sup>-1</sup> (Figure 1D). During all the experiments for the model characterization at the time of the analyses, the number of cells remains identical between the cells grown in glucose or galactose (Figure S2). The observed effects are not related to a difference in cell growth. Therefore, A549<sup>Dual</sup> are a suitable cell model to study metabolic reprogramming and the impact of increased OXPHOS on the implementation of antiviral responses.

### 3.2. Metabolic Reprogramming Enhances Antiviral Response

Regular moderate physical activity appears to be associated with the development of less-severe disorders during infectious diseases [48–50]. In addition, a regular and moderate physical activity is associated with a higher mitochondrial activity and, consequently, an improved OXPHOS [51–53]. We wondered whether, at the cellular level, an increase in OXPHOS could be associated with the improvement of the antiviral response.

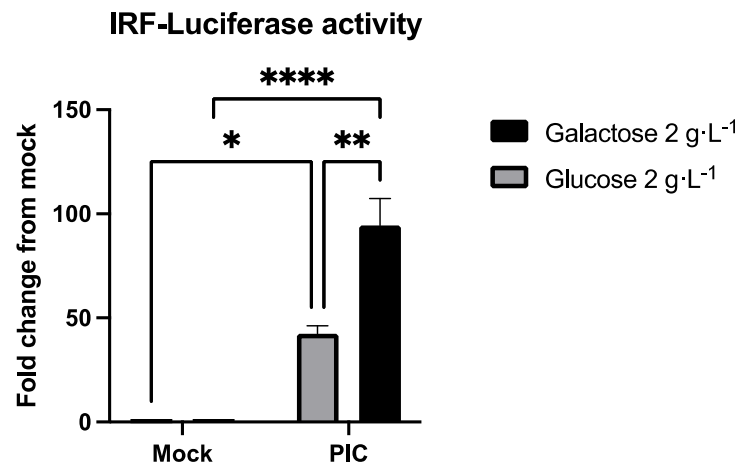
To test this hypothesis, we stimulated A549<sup>Dual</sup> with poly(I:C) (PIC), a dsRNA, which is widely used as a pathogen-associated molecular pattern mimetic. PIC is known to mimic replicating viral RNA and to trigger the canonical antiviral response, i.e., the IRF signaling pathway, through activation of TLR3-, RIG-I-, and RIG-I-like receptors (RLR), resulting in type I IFNs production and ISGs expression [54,55]. Thus, we assessed the expression of ISGs by A549<sup>Dual</sup> in response to PIC stimulation. As presented in Figure 2, stimulation with PIC 0.25 µg·mL<sup>-1</sup> induces a significant increase in ISG54 and ISG56 expression (at least 50- and 200-fold increase, respectively). Importantly, we report a greater ISGs expression inducement (up to a 2-fold difference) when the cells were grown in galactose 2 g·L<sup>-1</sup> compared to the cells grown in glucose 2 g·L<sup>-1</sup>. This result indicates that cellular metabolism, depending on whether it is mainly glycolysis or OXPHOS pathway, has an effect on the antiviral response.



**Figure 2.** Metabolic reprogramming increases the expression of antiviral genes. ISG54 and 56 expressions have been assessed by RT-qPCR following a 24-h stimulation of A549<sup>Dual</sup> either grown in glucose 2 g·L<sup>-1</sup> or galactose 2 g·L<sup>-1</sup> using PIC 0.25 µg·mL<sup>-1</sup>. Relative gene expression was obtained using RNA Polymerase II as a housekeeping gene. Fold-change results were obtained following normalization with relative gene expression of non-treated cells. Error bars represent standard errors of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

To confirm the effect observed at the transcriptional level, we assessed the production of proteins dependent on the ISRE promoter. Indeed, A549<sup>Dual</sup> are reporter cells Lucia luciferase under the control of an ISG54 minimal promoter in conjunction with five IFN-stimulated response elements (ISRE). Hence, we assessed the release of secreted luciferase

in the supernatant of PIC-treated cells by measuring emitted luminescence using Lucia luciferase substrate (i.e., QUANTI-Luc). In agreement with RT-qPCR results, we observe a strong induction of secreted luciferase in response to PIC stimulation, representing a significant induction of antiviral proteins whose production is under the control of ISRE (Figure 3). Again, the induction is twice as high in cells grown in galactose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  as in those grown in glucose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 3).



**Figure 3.** Metabolic reprogramming enhances the production of ISRE-dependent proteins. Analysis of IRF pathway activation in response to PIC  $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  stimulation of A549<sup>Dual</sup> either grown in glucose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  or galactose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Activity of secreted Lucia luciferase was measured using QUANTI-Luc substrate 24 h after treatment. Results are expressed as a fold change of luminescence intensity between control cells and treated cells. Error bars represent standard errors of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

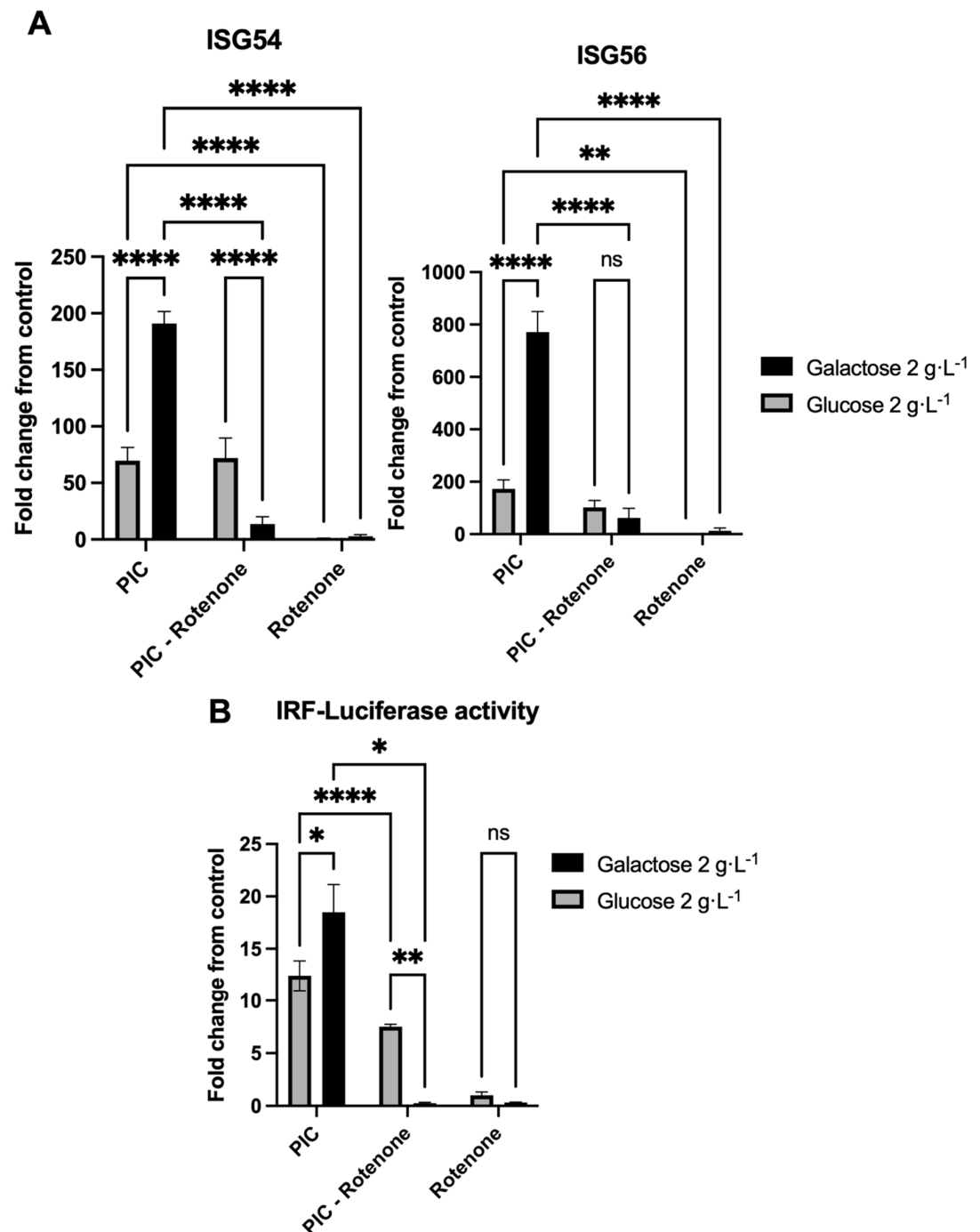
### 3.3. Antiviral Response Enhancement Relies on Cellular Respiration

From the precedent results, it is possible to argue that the differential induction of antiviral proteins in our two culture conditions relies on the improved OXPHOS of cells grown in galactose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . However, to confirm this assumption, we decided to repeat the experiments in the presence of rotenone. Rotenone is a broad-spectrum insecticide, piscicide, and pesticide of vegetal origin, known to inhibit the complex I of mitochondrial electron transport chain [56], thus blocking OXPHOS and associated production of ATP [56].

Following the addition of rotenone  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ISGs expression was no longer observable in cells grown in galactose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and stimulated with PIC  $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  compared to cells stimulated with PIC alone (Figure 4A). Furthermore, in comparison to cells grown in glucose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , the expression of ISGs reached a lower level in the presence of rotenone, whereas no significant difference in expression was found for A549<sup>Dual</sup> cultured in glucose and either treated or not with rotenone (Figure 4A). This result illustrates that the enhancement of ISGs expression in cells whose metabolism has been reprogrammed using galactose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  essentially relies on improved OXPHOS. To further confirm this result, as previously, we assessed the induction of antiviral proteins using the IRF-luciferase reporter system permitted by A549<sup>Dual</sup>.

Remarkably, as shown in Figure 4B, similar results are obtained at the protein level, with luciferase gene expression and induction under the control of ISRE promoter. Indeed, a significant decrease is observed in antiviral protein production for the cells practicing OXPHOS and treated with both rotenone and PIC versus cells stimulated with PIC alone. As earlier, for cells grown in glucose  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  whose metabolism relies on glycolysis, the induction of antiviral proteins in presence of rotenone and PIC almost matches that of cells in presence of PIC alone (Figure 4B).





**Figure 4.** Antiviral enhancement relies on oxidative phosphorylation. (A) ISG54 and 56 expressions were assessed by RT-qPCR following a 24-h stimulation of A549<sup>Dual</sup> either grown in glucose 2 g·L<sup>-1</sup> or galactose 2 g·L<sup>-1</sup> using PIC 0.25 µg·mL<sup>-1</sup>, rotenone 1 µg·mL<sup>-1</sup>, or both. Relative gene expression was obtained using RNA Polymerase II as a housekeeping gene. Fold change results were obtained following normalization with relative gene expression of non-treated cells. (B) Analysis of IRF pathway activation in A549<sup>Dual</sup> either grown in glucose 2 g·L<sup>-1</sup> or galactose 2 g·L<sup>-1</sup> following stimulation with PIC 0.25 µg·mL<sup>-1</sup>, rotenone 1 µg·mL<sup>-1</sup>, or both. Activity of secreted Lucia luciferase was measured using QUANTI-Luc substrate 24 h after treatment. Results are expressed as a fold change of luminescence intensity between control cells and treated cells. Error bars represent standard errors of three independent experiments. Error bars represent standard errors of three independent experiments. ns = not significant; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 4. Discussion

Recently, the benefit of physical exercise on the development of severe forms of infectious diseases has been discussed, resulting in conflicting data [50,57,58]. Indeed, exercise demonstrated a protective effect against the development of severe forms of SARS-CoV-2 infection if the exercise was regular and moderate [48,49,59]. Of note, regular and moderate exercise is linked to the development of cellular respiration associated with a more effective mitochondrial oxidative phosphorylation [51–53]. On the other hand, intense or irregular sports practices are associated with a basal inflammatory state and lactate-dependent ATP production, which are favorable to viral infections [58]. Unfortunately, at the cellular level, the impact of mitochondrial oxidative phosphorylation on the establishment of a proper antiviral response has been poorly studied. However, Angin and colleagues reported increased antiviral potential against HIV in patient cells reprogrammed to boost their OXPHOS [20]. A study on this concern was necessary to emphasize the data obtained on patients, which mostly rely on retrospective studies.

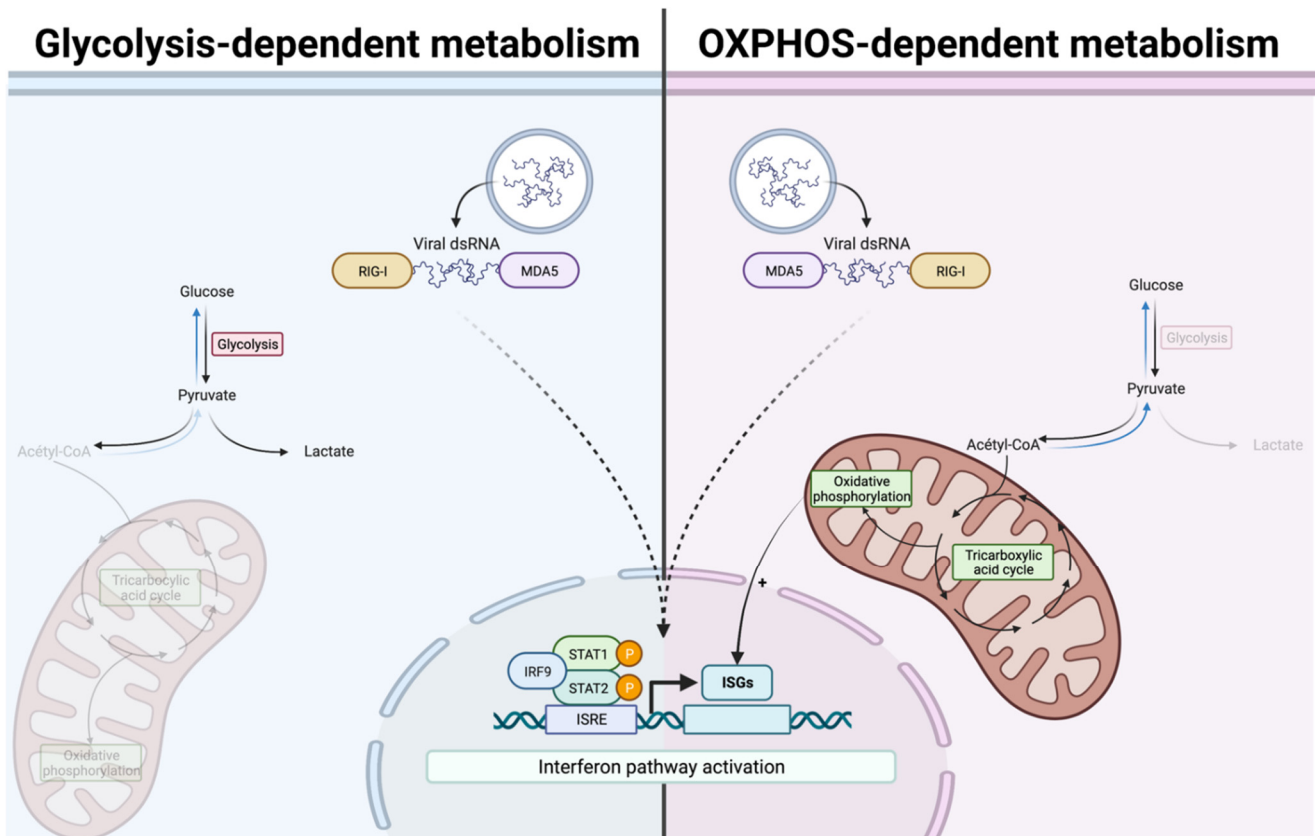
To do so, we set up an *in vitro* model of improved mitochondrial oxidative phosphorylation in cultured cells, based on the work of Shiratori et al. [44]. Indeed, cancer cell lines are known to base their metabolism mostly on glycolysis and lactate production in order to optimize biomass production (e.g., nucleotides, amino acids, lipids) for more efficient cell proliferation [23]. Changing the growing medium from a glucose-containing medium to a galactose-containing medium redirects the cellular metabolism towards tricarboxylic acid cycle (TCA) and OXPHOS [44]. With galactose as a nutrient source, cells activate autophagic mechanisms leading to the release of glutamine, which, once converted into glutamate, serves as a substrate for TCA [44].

Using our validated model (Figure 1), we showed that cells with improved OXPHOS were able to mount an enhanced antiviral response through ISGs expression (Figure 2) and induction (Figure 3). Indeed, we reported an increased level of ISG54 and ISG56 expression in response to PIC stimulation. These genes, respectively, encode for IFIT2 and IFIT1 as antiviral effectors and are both under the control of two ISRE elements [43]. This justifies the use of the IRF–luciferase system permitted by A549<sup>Dual</sup>. Indeed, in these cells, the expression of Lucia luciferase is under the control of ISRE [60], reflecting the expression of ISRE-dependent ISGs.

Finally, to ensure that antiviral response enhancement was relying on mitochondrial respiration, we decided to stimulate A549<sup>Dual</sup> this time with both PIC and rotenone, a complex I inhibitor widely used in mitochondrial function studies. As shown in Figure 4, ISGs were no longer expressed in cells grown in galactose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and treated with PIC and rotenone when compared to cells only treated with PIC. This indicates that potentiation of antiviral response described earlier relied on the improved mitochondrial function obtained in cells cultivated in galactose. Surprisingly, cells grown in glucose  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  had the same levels of ISG54 and ISG56 expression whenever treated with PIC or with both PIC and rotenone. This suggests that the glucose condition of cell culture leads to an antiviral response only dependent on glycolysis.

Herein, we demonstrated an increased antiviral response in case of boosted OXPHOS (Figure 5). However, one limitation that can be argued is that we have demonstrated this for ISGs dependent on the ISRE element in their promoter. It would be interesting to further investigate whether the expression of ISGs with GAS elements in their promoter follows the same pattern. In addition, we would like to pursue this work by using primary cell cultures to overcome the Warburg effect of cancer cell lines [23]. This would allow us to be closer to what is observed physiologically under infection conditions, just adjusting the level of OXPHOS by using different amounts of glucose in the growth medium. On the other hand, it is known that during an infection, viral proteins often have an inhibitory activity on the antiviral response. This has been demonstrated for several viruses, such as the Dengue virus [61], the Zika virus [62], or even recently for the SARS-CoV-2 virus [63]. Thus, we attempted to overcome this inhibitory effect by using poly:IC, allowing us to have a general answer regarding the effect of OXPHOS on the development of the antiviral

response. However, it remains important to determine whether the general mechanism we describe here is applicable to an infection with a replicating virus or whether more specific mechanisms are to be reported according to the family of viruses studied. To answer this, further studies are needed using several viruses, notably those of critical concerns nowadays.



**Figure 5.** Enhancement of OXPHOS is associated with improvement of antiviral response.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens11101168/s1>.

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

**Funding:** This research was funded by the CASI project (supported by BioST federation of Université de La Réunion). G.L., D.E.S. and A.P.-R. have Ph.D. degree scholarships from Réunion University (Ecole doctorale STS) funded by DIRED/2021-0161, DIRED/2021-1115, and DIRED/2021-1124 from Région Réunion, respectively.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in this paper.

**Acknowledgments:** Figures S1 and 5 were created using [Biorender.com](https://www.biorender.com).

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

## Abbreviations

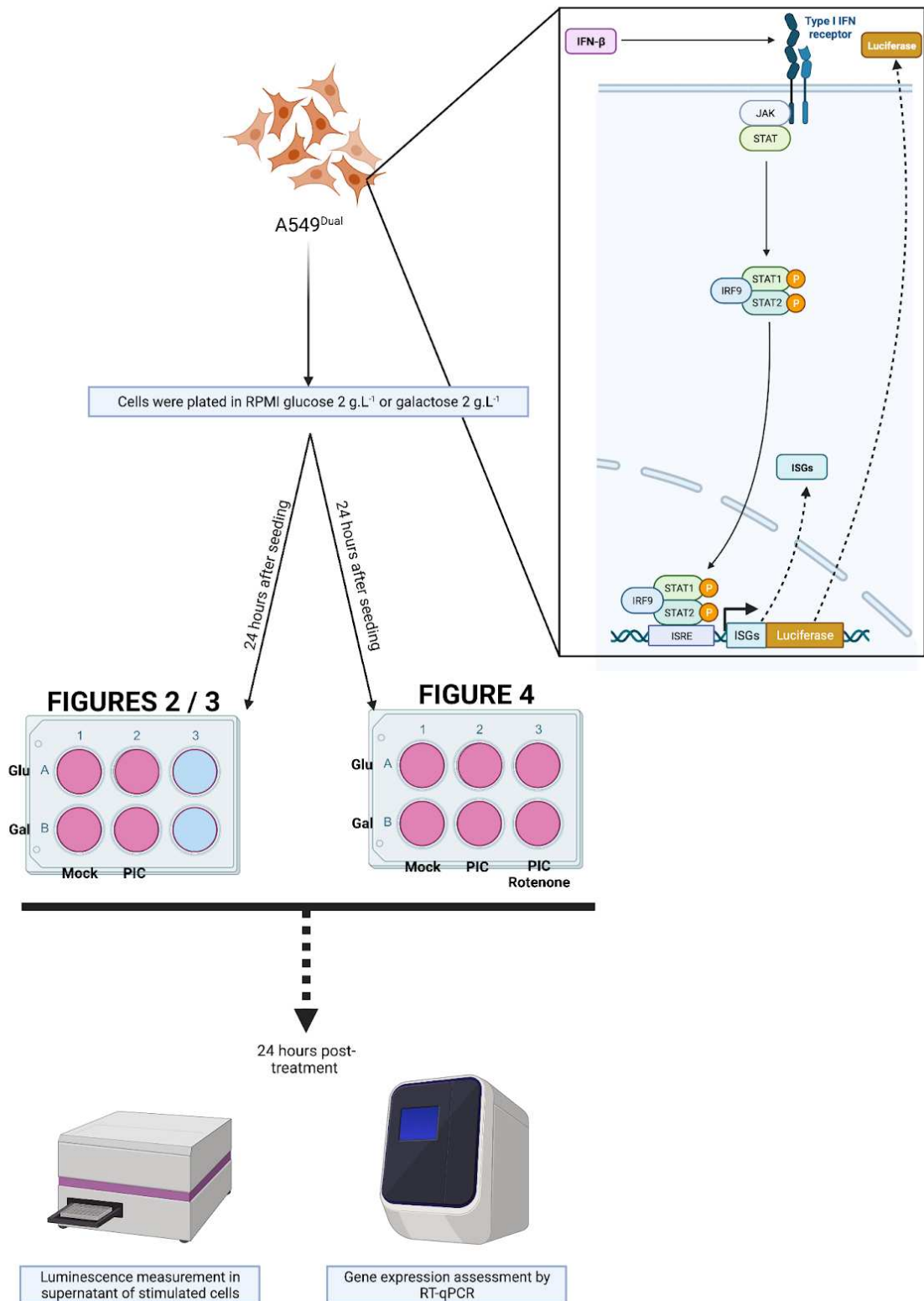
<b>A549<sup>Dual</sup></b>	A549-Dual <sup>TM</sup> , expressing NF- $\kappa$ B-SEAP and IRF-Luc reporters
<b>GAS</b>	Gamma interferon activation site
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFNAR</b>	IFNs $\alpha/\beta$ receptor
<b>IRF</b>	Interferon regulatory factor
<b>ISG</b>	Interferon stimulated gene
<b>ISRE</b>	IFN-stimulated response element
<b>OXPHOS</b>	Oxidative phosphorylation
<b>PIC</b>	Poly(I:C) (HMW)/Lyovect <sup>TM</sup>

## References

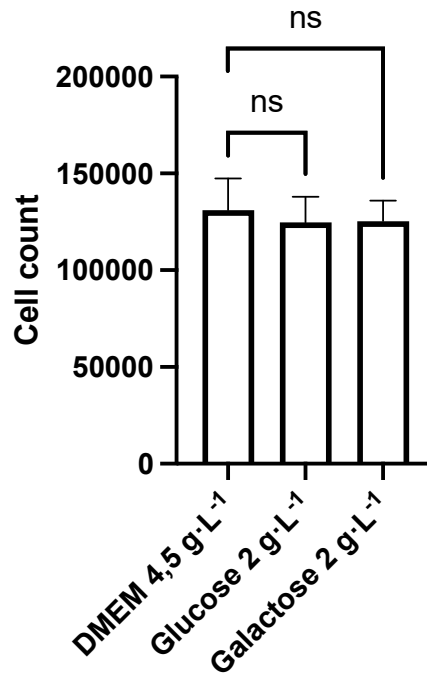
1. Ksiazek, T.G.; Erdman, D.; Goldsmith, C.S.; Zaki, S.R.; Peret, T.; Emery, S.; Tong, S.; Urbani, C.; Comer, J.A.; Lim, W.; et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1953–1966. [[CrossRef](#)]
2. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team; Dawood, F.S.; Jain, S.; Finelli, L.; Shaw, M.W.; Lindstrom, S.; Garten, R.J.; Gubareva, L.V.; Xu, X.; Bridges, C.B.; et al. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2605–2615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zaki, A.M.; van Boheemen, S.; Bestebroer, T.M.; Osterhaus, A.D.M.E.; Fouchier, R.A.M. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1814–1820. [[CrossRef](#)]
4. Baize, S.; Pannetier, D.; Oestereich, L.; Rieger, T.; Koivogui, L.; Magassouba, N.; Soropogui, B.; Sow, M.S.; Keita, S.; De Clerck, H.; et al. Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1418–1425. [[CrossRef](#)]
5. Faria, N.R.; Azevedo, R.d.S.d.S.; Kraemer, M.U.G.; Souza, R.; Cunha, M.S.; Hill, S.C.; Theze, J.; Bonsall, M.B.; Bowden, T.A.; Rissanan, I.; et al. Zika Virus in the Americas: Early Epidemiological and Genetic Findings. *Science* **2016**, *352*, 345–349. [[CrossRef](#)]
6. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; et al. A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. *Nature* **2020**, *579*, 270–273. [[CrossRef](#)]
7. Thornhill, J.P.; Barkati, S.; Walmsley, S.; Rockstroh, J.; Antinori, A.; Harrison, L.B.; Palich, R.; Nori, A.; Reeves, I.; Habibi, M.S.; et al. Monkeypox Virus Infection in Humans across 16 Countries—April–June 2022. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *387*, 679–691. [[CrossRef](#)]
8. Simmons, C.P.; Farrar, J.J.; van Vinh Chau, N.; Wills, B. Dengue. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 1423–1432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Weaver, S.C.; Lecuit, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 1231–1239. [[CrossRef](#)]
10. Hossain, P.; Kawar, B.; El Nahas, M. Obesity and Diabetes in the Developing World—A Growing Challenge. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 213–215. [[CrossRef](#)]
11. Saklayen, M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **2018**, *20*, 12. [[CrossRef](#)]
12. Partridge, L.; Deelen, J.; Slagboom, P.E. Facing up to the Global Challenges of Ageing. *Nature* **2018**, *561*, 45–56. [[CrossRef](#)]
13. Karlsson, E.A.; Beck, M.A. The Burden of Obesity on Infectious Disease. *Exp. Biol. Med.* **2010**, *235*, 1412–1424. [[CrossRef](#)]
14. Lin, R.J.; Lee, T.H.; Leo, Y.S. Dengue in the Elderly: A Review. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2017**, *15*, 729–735. [[CrossRef](#)]
15. van Crevel, R.; van de Vijver, S.; Moore, D.A.J. The Global Diabetes Epidemic: What Does It Mean for Infectious Diseases in Tropical Countries? *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2017**, *5*, 457–468. [[CrossRef](#)]
16. Grasselli, G.; Greco, M.; Zanella, A.; Albano, G.; Antonelli, M.; Bellani, G.; Bonanomi, E.; Cabrini, L.; Carlesso, E.; Castelli, G.; et al. Risk Factors Associated With Mortality Among Patients With COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy. *JAMA Intern. Med.* **2020**, *180*, 1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Chandrasekaran, B.; Ganesan, T.B. Sedentarism and Chronic Disease Risk in COVID-19 Lockdown—A Scoping Review. *Scott. Med. J.* **2021**, *66*, 3–10. [[CrossRef](#)]
18. Allonso, D.; Andrade, I.S.; Conde, J.N.; Coelho, D.R.; Rocha, D.C.P.; da Silva, M.L.; Ventura, G.T.; Silva, E.M.; Mohana-Borges, R. Dengue Virus NS1 Protein Modulates Cellular Energy Metabolism by Increasing Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. *J. Virol.* **2015**, *89*, 11871–11883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Thaker, S.K.; Ch’ng, J.; Christofk, H.R. Viral Hijacking of Cellular Metabolism. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 59. [[CrossRef](#)]
20. Angin, M.; Volant, S.; Passaes, C.; Lecuroux, C.; Monceaux, V.; Dillies, M.-A.; Valle-Casuso, J.C.; Pancino, G.; Vaslin, B.; Le Grand, R.; et al. Metabolic Plasticity of HIV-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells Is Associated with Enhanced Antiviral Potential and Natural Control of HIV-1 Infection. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 704–716. [[CrossRef](#)]
21. Fernie, A.R.; Carrari, F.; Sweetlove, L.J. Respiratory Metabolism: Glycolysis, the TCA Cycle and Mitochondrial Electron Transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2004**, *7*, 254–261. [[CrossRef](#)]
22. Lunt, S.Y.; Vander Heiden, M.G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 441–464. [[CrossRef](#)]
23. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–1033. [[CrossRef](#)]
24. Ganesan, K.; Chawla, A. Metabolic Regulation of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2014**, *32*, 609–634. [[CrossRef](#)]

25. Plaza, J.J.G.; Hulak, N.; Kausova, G.; Zhumadilov, Z.; Akilzhanova, A. Role of Metabolism during Viral Infections, and Crosstalk with the Innate Immune System. *Intractable Rare Dis. Res.* **2016**, *5*, 90–96. [CrossRef]
26. Moreno-Altamirano, M.M.B.; Kolstoe, S.E.; Sánchez-García, F.J. Virus Control of Cell Metabolism for Replication and Evasion of Host Immune Responses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 95. [CrossRef]
27. Kelly, B.; O'Neill, L.A. Metabolic Reprogramming in Macrophages and Dendritic Cells in Innate Immunity. *Cell Res.* **2015**, *25*, 771–784. [CrossRef]
28. Martin, S.; Saha, B.; Riley, J.L. The Battle over MTOR: An Emerging Theatre in Host–Pathogen Immunity. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002894. [CrossRef] [PubMed]
29. Le Sage, V.; Cinti, A.; Amorim, R.; Mouland, A.J. Adapting the Stress Response: Viral Subversion of the MTOR Signaling Pathway. *Viruses* **2016**, *8*, 152. [CrossRef]
30. Stöhr, S.; Costa, R.; Sandmann, L.; Westhaus, S.; Pfaender, S.; Anggakusuma; Dazert, E.; Meuleman, P.; Vondran, F.W.R.; Manns, M.P.; et al. Host Cell MTORC1 Is Required for HCV RNA Replication. *Gut* **2016**, *65*, 2017–2028. [CrossRef]
31. Jordan, T.X.; Randall, G. Flavivirus Modulation of Cellular Metabolism. *Curr. Opin. Virol.* **2016**, *19*, 7–10. [CrossRef]
32. Kumar, A.; Singh, P.K.; Giri, S. AMP-Activated Kinase (AMPK) Promotes Innate Immunity and Antiviral Defense against Zika Virus Induced Ocular Infection. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 50.14.
33. Reslan, A.; Haddad, J.G.; Desprès, P.; Bascands, J.-L.; Gadea, G. High Glucose Induces in HK2 Kidney Cells an IFN–Dependent ZIKV Antiviral Status Fueled by Viperin. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1577. [CrossRef]
34. Chatel-Chaix, L.; Cortese, M.; Romero-Brey, I.; Bender, S.; Neufeldt, C.J.; Fischl, W.; Scaturro, P.; Schieber, N.; Schwab, Y.; Fischer, B.; et al. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 342–356. [CrossRef]
35. Carneiro, L.; Guissard, C.; Offer, G.; Belenguer, P.; Pénicaud, L.; Leloup, C. The mitochondrial fission induced by glucose is essential to the ROS signaling in hypothalamic detection of hyperglycemia. *Diabetes Metab.* **2010**, *36*, A38. [CrossRef]
36. Weber, F.; Wagner, V.; Rasmussen, S.B.; Hartmann, R.; Paludan, S.R. Double-Stranded RNA Is Produced by Positive-Strand RNA Viruses and DNA Viruses but Not in Detectable Amounts by Negative-Strand RNA Viruses. *J. Virol.* **2006**, *80*, 5059–5064. [CrossRef] [PubMed]
37. Takeda, K.; Akira, S. Toll-like Receptors in Innate Immunity. *Int. Immunol.* **2005**, *17*, 135–145. [CrossRef]
38. Yoneyama, M.; Kikuchi, M.; Natsukawa, T.; Shinobu, N.; Imaizumi, T.; Miyagishi, M.; Taira, K.; Akira, S.; Fujita, T. The RNA Helicase RIG-I Has an Essential Function in Double-Stranded RNA-Induced Innate Antiviral Responses. *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 730–737. [CrossRef]
39. Andrejeva, J.; Childs, K.S.; Young, D.F.; Carlos, T.S.; Stock, N.; Goodbourn, S.; Randall, R.E. The V Proteins of Paramyxoviruses Bind the IFN-Inducible RNA Helicase, Mda-5, and Inhibit Its Activation of the IFN-Beta Promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17264–17269. [CrossRef]
40. Plataniias, L.C. Mechanisms of Type-I- and Type-II-Interferon-Mediated Signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 375–386. [CrossRef]
41. Schoggins, J.W.; Rice, C.M. Interferon-Stimulated Genes and Their Antiviral Effector Functions. *Curr. Opin. Virol.* **2011**, *1*, 519–525. [CrossRef] [PubMed]
42. Seth, R.B.; Sun, L.; Chen, Z.J. Antiviral Innate Immunity Pathways. *Cell Res.* **2006**, *16*, 141–147. [CrossRef] [PubMed]
43. Fensterl, V.; Sen, G.C. The ISG56/IFIT1 Gene Family. *J. Interferon Cytokine Res.* **2011**, *31*, 71–78. [CrossRef]
44. Shiratori, R.; Furuichi, K.; Yamaguchi, M.; Miyazaki, N.; Aoki, H.; Chibana, H.; Ito, K.; Aoki, S. Glycolytic Suppression Dramatically Changes the Intracellular Metabolic Profile of Multiple Cancer Cell Lines in a Mitochondrial Metabolism-Dependent Manner. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18699. [CrossRef]
45. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [CrossRef] [PubMed]
46. Held, P. Using Phenol Red to Assess PH in Tissue Culture Media. Available online: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/using-phenol-red-to-assess-ph-in-tissue-culture-media/> (accessed on 21 July 2022).
47. Michl, J.; Park, K.C.; Swietach, P. Evidence-Based Guidelines for Controlling PH in Mammalian Live-Cell Culture Systems. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 144. [CrossRef] [PubMed]
48. Machado, C.L.F.; Pinto, R.S.; Brusco, C.M.; Cadore, E.L.; Radaelli, R. COVID-19 Pandemic Is an Urgent Time for Older People to Practice Resistance Exercise at Home. *Exp. Gerontol.* **2020**, *141*, 111101. [CrossRef]
49. Fernández-Lázaro, D.; González-Bernal, J.J.; Sánchez-Serrano, N.; Navascués, L.J.; Ascaso-del-Río, A.; Mielgo-Ayuso, J. Physical Exercise as a Multimodal Tool for COVID-19: Could It Be Used as a Preventive Strategy? *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 8496. [CrossRef]
50. Harris, M.D. Infectious Disease in Athletes. *Curr. Sport. Med. Rep.* **2011**, *10*, 84–89. [CrossRef]
51. Korzeniewski, B.; Zoladz, J.A. Training-Induced Adaptation of Oxidative Phosphorylation in Skeletal Muscles. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 37–40. [CrossRef]
52. Fiorenza, M.; Lemminger, A.K.; Marker, M.; Eibye, K.; Marcello Iaia, F.; Bangsbo, J.; Hostrup, M. High-intensity Exercise Training Enhances Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Efficiency in a Temperature-dependent Manner in Human Skeletal Muscle: Implications for Exercise Performance. *FASEB J.* **2019**, *33*, 8976–8989. [CrossRef]

53. Balan, E.; Schwalm, C.; Naslain, D.; Niens, H.; Francaux, M.; Deldicque, L. Regular Endurance Exercise Promotes Fission, Mitophagy, and Oxidative Phosphorylation in Human Skeletal Muscle Independently of Age. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Gitlin, L.; Barchet, W.; Gilfillan, S.; Cella, M.; Beutler, B.; Flavell, R.A.; Diamond, M.S.; Colonna, M. Essential Role of Mda-5 in Type I IFN Responses to Polyriboinosinic:Polyribocytidylic Acid and Encephalomyocarditis Picornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 8459–8464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kato, H.; Sato, S.; Yoneyama, M.; Yamamoto, M.; Uematsu, S.; Matsui, K.; Tsujimura, T.; Takeda, K.; Fujita, T.; Takeuchi, O.; et al. Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response. *Immunity* **2005**, *23*, 19–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Heinz, S.; Freyberger, A.; Lawrenz, B.; Schladt, L.; Schmuck, G.; Ellinger-Ziegelbauer, H. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Simpson, R.J.; Campbell, J.P.; Gleeson, M.; Krüger, K.; Nieman, D.C.; Pyne, D.B.; Turner, E.; Walsh, N.P. Can Exercise Affect Immune Function to Increase Susceptibility to Infection? *Exerc. Immunol. Rev.* **2020**, *15*, 8–22.
58. Martin, S.A.; Pence, B.D.; Woods, J.A. Exercise and Respiratory Tract Viral Infections. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **2009**, *37*, 157–164. [[CrossRef](#)]
59. Sallis, R.; Young, D.R.; Tartof, S.Y.; Sallis, J.F.; Sall, J.; Li, Q.; Smith, G.N.; Cohen, D.A. Physical Inactivity Is Associated with a Higher Risk for Severe COVID-19 Outcomes: A Study in 48 440 Adult Patients. *Br. J. Sport. Med.* **2021**, *55*, 1099–1105. [[CrossRef](#)]
60. A549-DualTM Cells. Available online: <https://www.invivogen.com/a549-dual> (accessed on 25 July 2022).
61. Castillo Ramirez, J.A.; Urcuqui-Inchima, S. Dengue Virus Control of Type I IFN Responses: A History of Manipulation and Control. *J. Interferon Cytokine Res.* **2015**, *35*, 421–430. [[CrossRef](#)]
62. Wu, Y.; Liu, Q.; Zhou, J.; Xie, W.; Chen, C.; Wang, Z.; Yang, H.; Cui, J. Zika Virus Evades Interferon-Mediated Antiviral Response through the Co-Operation of Multiple Nonstructural Proteins in Vitro. *Cell Discov.* **2017**, *3*, 17006. [[CrossRef](#)]
63. Li, J.-Y.; Liao, C.-H.; Wang, Q.; Tan, Y.-J.; Luo, R.; Qiu, Y.; Ge, X.-Y. The ORF6, ORF8 and Nucleocapsid Proteins of SARS-CoV-2 Inhibit Type I Interferon Signaling Pathway. *Virus Res.* **2020**, *286*, 198074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

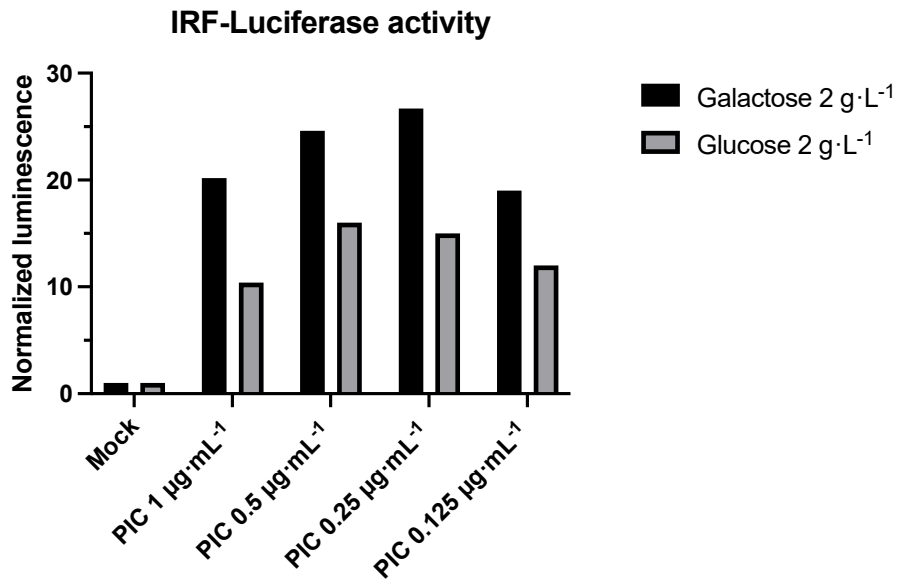


**Figure S1. Experiments flowchart.**

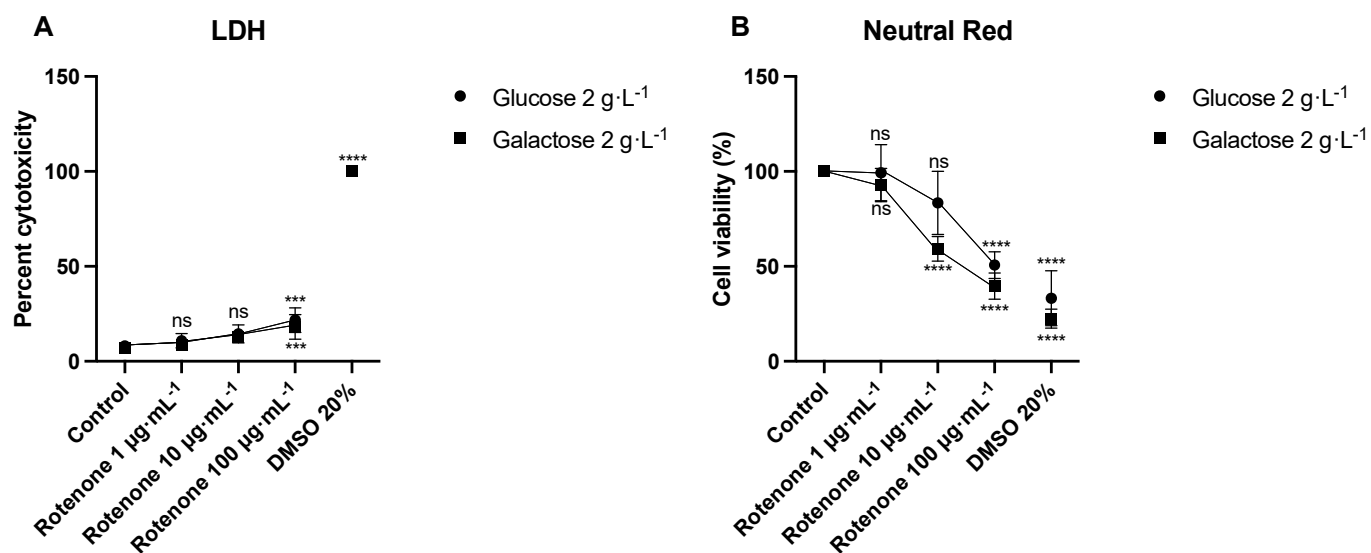


**Figure S2. Cell growth comparison.** A549<sup>Dual</sup> were cultured in DMEM glucose 4,5 g·L<sup>-1</sup> or RPMI glucose 2 g·L<sup>-1</sup> / galactose 2 g·L<sup>-1</sup>. Cells were seeded at the same density for each condition. Three days after seeding growth rate was assessed by counting cells using flow cytometry. This allowed us to determine that no significant difference in cell number was observable for the duration of the experiments. ns = not significant.





**Figure S3. Poly:IC dose determination.** We treated A549<sup>Dual</sup> with poly:IC concentrations ranging from 1 µg·mL<sup>-1</sup> to 0.125 µg·mL<sup>-1</sup> for 24 hours. We then evaluated the impact of these different concentrations on establishment of antiviral response by measuring activity of secreted Lucia luciferase. Results are expressed as a fold change of luminescence intensity between control cells and treated cells.

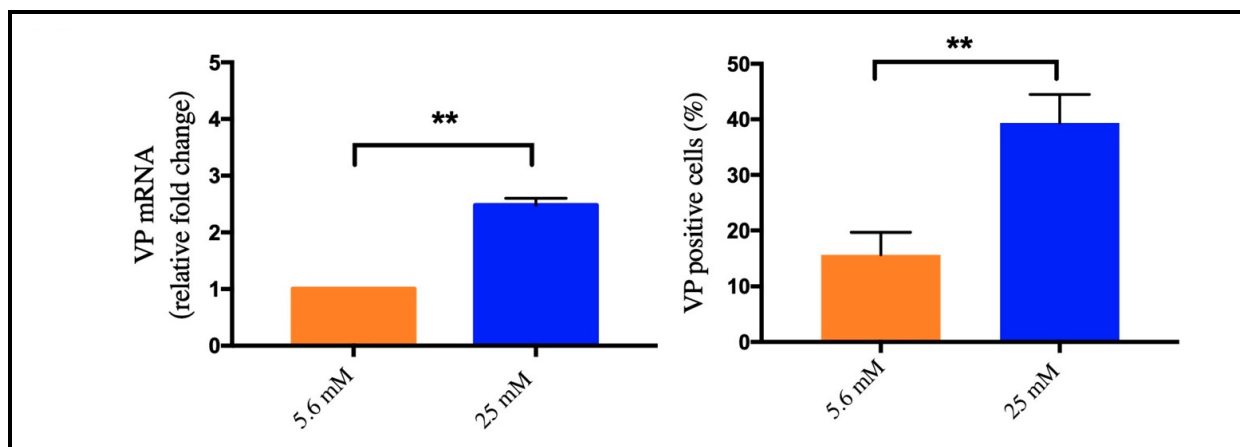


**Figure S4. Cytotoxicity assessment of rotenone on A549<sup>Dual</sup>.** We treated A549<sup>Dual</sup> with rotenone concentrations ranging from 1 µg·mL<sup>-1</sup> to 100 µg·mL<sup>-1</sup> for 24 hours. We then evaluated the impact of these different concentrations on cell viability by LDH assay and neutral red assay. ns = not significant; \*\*\*  $p < 0.0002$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### III.1.i.c. Discussion de l'article 1

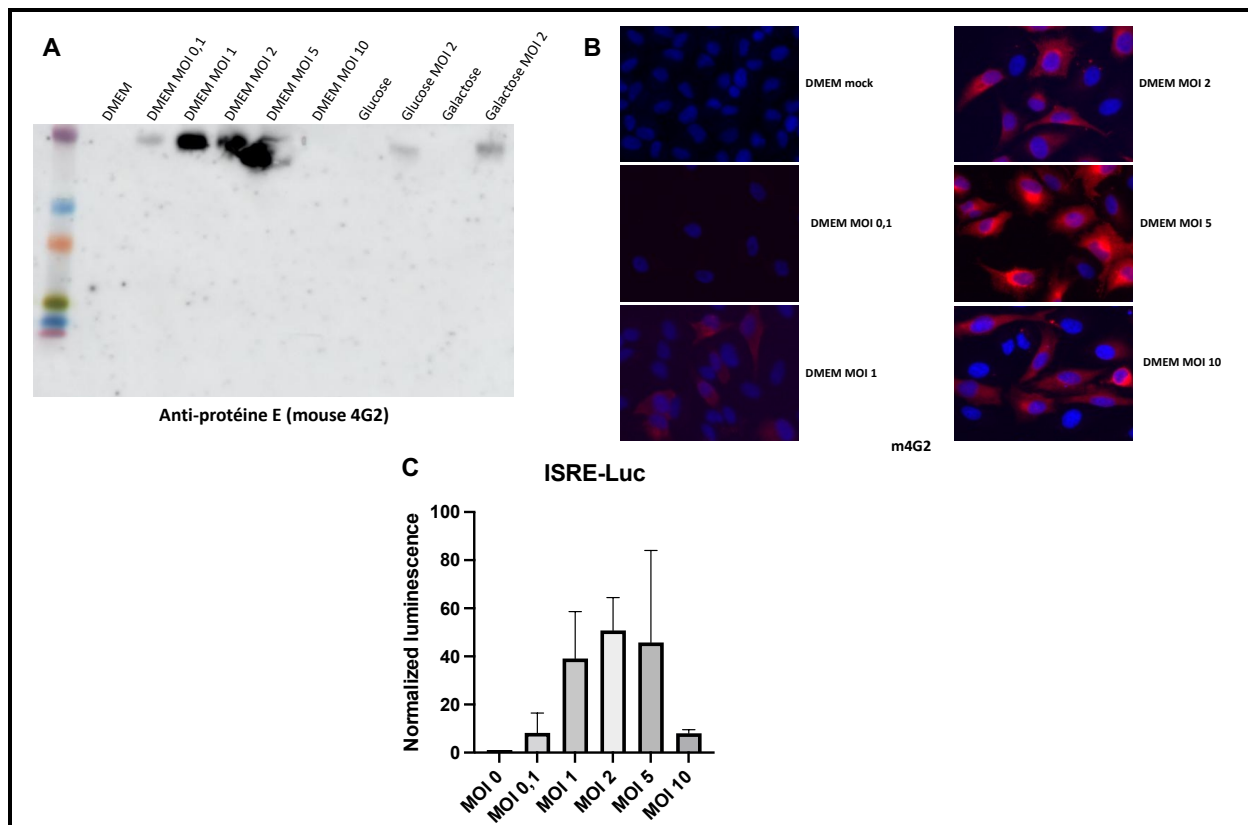
Si des liens sont déjà faits dans la littérature entre une OXPPOS défaillante et une infection exacerbée, notamment concernant l'infection par le HIV (Angin et al., 2019). S'il a déjà été établi que la production d'IFN de type I dépendante de la détection par les RLR et les TLR semble tributaire de la phosphorylation oxydative (Buskiewicz et al., 2016; Cao et al., 2008; W. Zhang et al., 2019). À notre connaissance, au travers de ce premier article, nous sommes parmi les premiers à apporter une preuve de concept que l'OXPPOS est également essentielle à la production des effecteurs antiviraux, qui sont les véritables acteurs de la réponse IFN. Ainsi, de manière similaire à la sécrétion d'IFN de type I, nous avons montré que la promotion de la phosphorylation oxydative est favorable à la production d'effecteurs antiviraux en réponse à une stimulation par du poly:IC. En effet, la stimulation de cellules cultivées en galactose, pour booster leur phosphorylation oxydative, a abouti à une expression plus importante d'ISG54 et d'ISG56, deux effecteurs antiviraux appartenant à la famille IFIT. Le reproche majeur qui peut être fait à cette étude est que nous nous sommes limités à l'étude de l'expression génique d'une part, la part protéique de notre étude se reposant uniquement sur un système rapporteur. C'est une faiblesse que nous avons tenté de corriger au mieux par la suite.

La publication de cette étude a coïncidé avec la publication d'autres travaux de notre équipe qui rapportent, de manière surprenante, que l'hyperglycémie généralement propice à la glycolyse, favorisait l'expression d'une ISG essentielle au contrôle de l'infection par le virus Zika, la vipérine (**Figure 31**) (Reslan et al., 2022). Ces résultats tranchent avec ceux que nous avons obtenus. Pour autant, dans ces travaux, l'expression d'aucune autre ISG n'a été explorée (Reslan et al., 2022). C'est pourquoi, dans la suite de mes travaux de thèse, nous avons pris le parti d'inclure l'étude de l'expression de la vipérine en parallèle des autres ISGs que nous allons tester, pour éventuellement mettre en avant son statut particulier.



**Figure 31 – L'expression de la vipérine semble augmenter en contexte glycolytique.** Reslan et al. retrouvent lors d'une culture avec du glucose à 25 mM ( $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) une augmentation de l'expression de la vipérine, associée à une augmentation du nombre de cellules positives, en comparaison avec les cellules cultivées avec une concentration moins élevée de glucose (5,6 soit  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Ces résultats illustrent que la vipérine pourrait être régulée à la hausse en contexte glycolytique, puisque l'augmentation du glucose exogène a tendance à favoriser la glycolyse aérobie. Adapté de (Reslan et al., 2022).

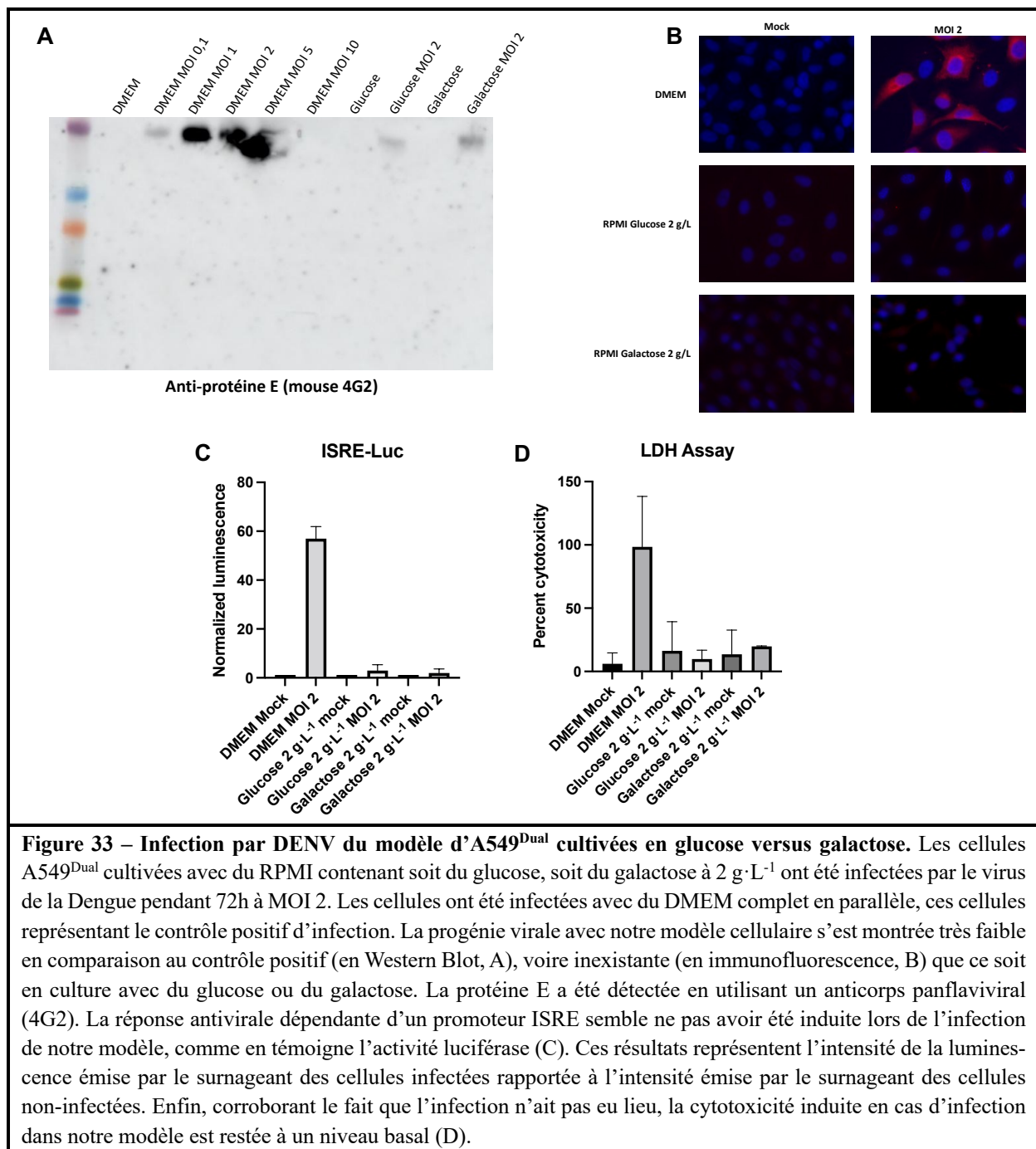
Puisque notre modèle semblait porter ses fruits pour l'étude comparative de la mise en place de la réponse antivirale en contexte de glycolyse et d'OXPHOS, nous avons entrepris de l'utiliser pour une infection virale totale en présence du virus de la Dengue. Pour cela, nous nous sommes servis d'une souche de DENV-2 disponible au laboratoire, représentative du virus circulant à La Réunion en 2018. L'infection des A549<sup>Dual</sup> cultivées de manière classique, en DMEM et à plusieurs multiplicités d'infection (MOI) s'est montrée effective et concomitante au développement d'une réponse IFN importante (**Figure 32**).



**Figure 32 – Infection des A549<sup>Dual</sup> par DENV.** Les cellules A549<sup>Dual</sup> ont été infectées par une souche de DENV-2 représentative du virus qui circulait à La Réunion en 2018, pour tester notre production virale. L'infection avec dose croissante de virus, allant de MOI 0,1 à 10, s'est montrée productive comme l'illustre les résultats obtenus en Western Blot (A) et en immunofluorescence (B), basés sur la détection de la protéine E du virus. La protéine E a été détectée en utilisant un anticorps panflaviviral (4G2). La réponse antivirale dépendante du promoteur ISRE a elle aussi été évaluée post-infection. Comme le montre l'activité de la luciférase, il semble que la production des effecteurs antiviraux dépendante de ce promoteur semble répondre à l'infection (C). Ces résultats représentent l'intensité de la luminescence émise par le surnageant des cellules infectées rapportée à l'intensité émise par le surnageant des cellules non-infectées.

Cependant, lors de l'infection des cellules cultivées en RPMI, supplémenté par du glucose ou du galactose à  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , nous nous sommes heurtés à une difficulté. Il s'est avéré que notre modèle cellulaire n'aboutissait à aucune infection évidente. En effet, comme l'illustre la **Figure 33**, en Western Blot, la détection de la protéine E était très faible dans notre modèle en comparaison du signal observé pour les cellules cultivées en DMEM. Le même constat peut être tiré de l'analyse faite en immunocytofluorescence, où aucune cellule positive pour la protéine E n'a pu être détectée dans les cellules cultivées en RPMI ; que ce soit avec du galactose ou du glucose, en comparaison avec les cellules cultivées en DMEM, et ce malgré des temps d'infection variant entre 48h et 72h. À cela s'ajoute une réponse IFN et un effet cytopathique, mesuré via

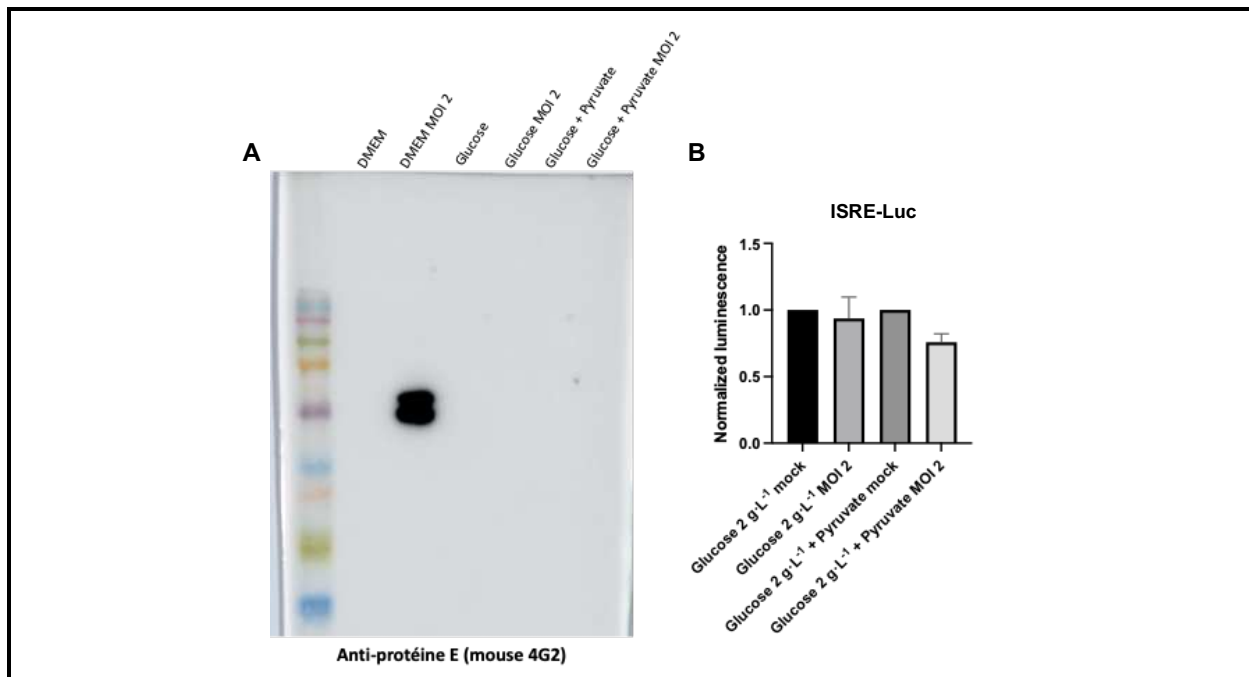
la quantification de l'activité Lactate Déshydrogénase (LDH) extracellulaire, inexistant dans notre modèle cellulaire, confirmant que l'infection n'avait pas eu lieu.



### III.1.ii. Mise en évidence d'une réponse antivirale bivalente selon le contexte métabolique cellulaire

Une part importante de notre travail à partir de ce point aura été de tenter d'apporter des modifications à notre modèle de culture cellulaire, afin de pouvoir l'infecter par la suite. Quel

élément déterminant se révélait différent entre une infection menée en DMEM comparée à une infection en RPMI ? Était-ce dû à un composant spécifique du DMEM, facilitateur, ou au contraire du RPMI, alors inhibiteur ? Une donnée essentielle sur le milieu que nous utilisons jusqu'ici pour la culture est qu'il ne contenait pas de sodium pyruvate, alors que nous en ajoutions, de manière classique, 1 mM dans le DMEM. Nous sommes donc partis du principe que la différence que nous observions dans la capacité à infecter les cellules pourrait venir de la nécessité d'avoir du sodium pyruvate lors de l'infection. Cependant, même en ajoutant du pyruvate à notre milieu en amont de l'infection, aucune différence n'a été observée avec les tentatives précédentes (**Figure 34**).



**Figure 34 – Variation des conditions d'infection.** L'infection par DENV de cellules cultivées avec du RPMI contenant soit du glucose, soit du galactose à la concentration de  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  n'aboutit à aucune infection productive. L'ajout de pyruvate dans le milieu de culture n'a pas changé la donne. La protéine E est restée indétectable après cette modification des conditions d'infection (A). La protéine E a été détectée en utilisant un anticorps panflaviviral (4G2). Il en est de même pour la mise en place de la réponse ISRE-dépendante (B). Ces résultats représentent l'intensité de la luminescence émise par le surnageant des cellules infectées rapportée à l'intensité émise par le surnageant des cellules non-infectées.

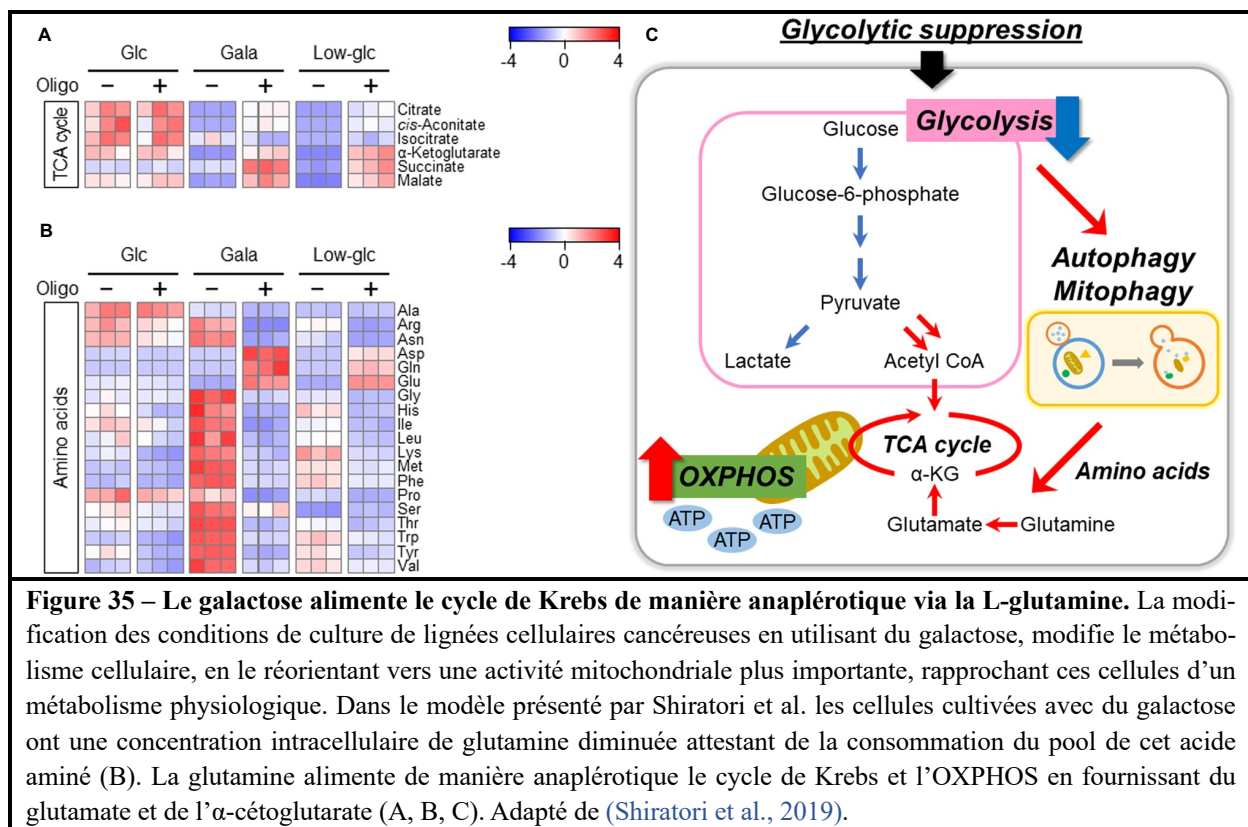
Notre regard s'est alors porté sur la L-glutamine. En effet, la composition du DMEM et du RPMI varie sur plusieurs points. Mais l'un des plus importants est la concentration en L-glutamine qui est de  $584 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (3 mM) dans le DMEM contre 0 dans le RPMI, en absence de

supplémentation. Or, comme je l'évoquais précédemment, nous avons décidé de ne pas compléter notre RPMI avec de la L-glutamine, pour se prémunir d'un biais éventuel lié à l'ajout de cet acide aminé qui, de façon notoire, est lié à l'alimentation anaplérotique du cycle de Krebs. Des données disponibles dans la littérature font état d'une possible « addiction » à la glutamine lors de plusieurs infections virales, c'est le cas du Poliovirus, du virus de l'Herpes associé au sarcome de Kaposi ou encore du HIV (Eagle & Habel, 1956; Hegedus et al., 2017; Koufaris & Nicolaidou, 2021; Sanchez et al., 2017). De plus, même si la cellule hôte est capable de synthétiser de la glutamine *de novo*, il semble que cette synthèse soit insuffisante pour soutenir une répllication virale maximale. Ainsi, il est rapporté régulièrement une augmentation de l'expression des transporteurs cellulaires de la glutamine chez les cellules infectées, permettant l'apport de glutamine exogène pour subvenir aux besoins du virus (Koufaris & Nicolaidou, 2021).

Il semblerait donc que nos difficultés à infecter notre modèle avec le virus de la Dengue puisse provenir de l'absence de L-glutamine dans notre RPMI. En effet, il est possible, vu les données établies dans la littérature, que le pool de glutamine intracellulaire dans nos cellules soit insuffisant pour permettre une répllication efficace et que l'absence de L-glutamine exogène limite la reconstitution de ce pool. Toutefois, si une telle addiction a déjà été rapportée pour d'autres virus, elle n'a pour l'heure jamais été évoquée, à notre connaissance, pour DENV. Aussi, l'hypothèse de l'addiction à la glutamine par la cellule infectée reste pour l'instant en suspens dans la littérature (Koufaris & Nicolaidou, 2021). D'une part, la glutamine est évoquée comme élément essentiel à la tenue d'un cycle viral efficace alors que, d'autre part, la glutamine serait une brique nécessaire à la cellule hôte pour conduire une réponse antivirale efficace. Par ailleurs, Shiratori et al. ont rapporté dans leur étude que le remplacement du glucose par le galactose réorientait les cellules cancéreuses vers un métabolisme basé sur la phosphorylation oxydative. Et que cette réorientation était rendue possible par l'alimentation anaplérotique du TCA par la glutamine, comme illustré par la diminution de la concentration de la glutamine



intracellulaire dans les cellules cultivées en galactose, au profit de la synthèse d' $\alpha$ -KG (**Figure 35**). Compte-tenu de ces différentes données, nous avons émis l'hypothèse que les résultats que nous avons eus précédemment, c'est-à-dire l'amélioration de la production des effecteurs antiviraux par la phosphorylation oxydative, pourraient reposer en réalité sur la glutamine, en tant que substrat du TCA. Ainsi, l'addiction de la cellule hôte infectée à la glutamine affecterait autant la réplication du virus que la réponse IFN, elle-même.



### III.1.ii.a. La L-glutamine alimente la phosphorylation oxydative facilitant la mise en place de la réponse antivirale

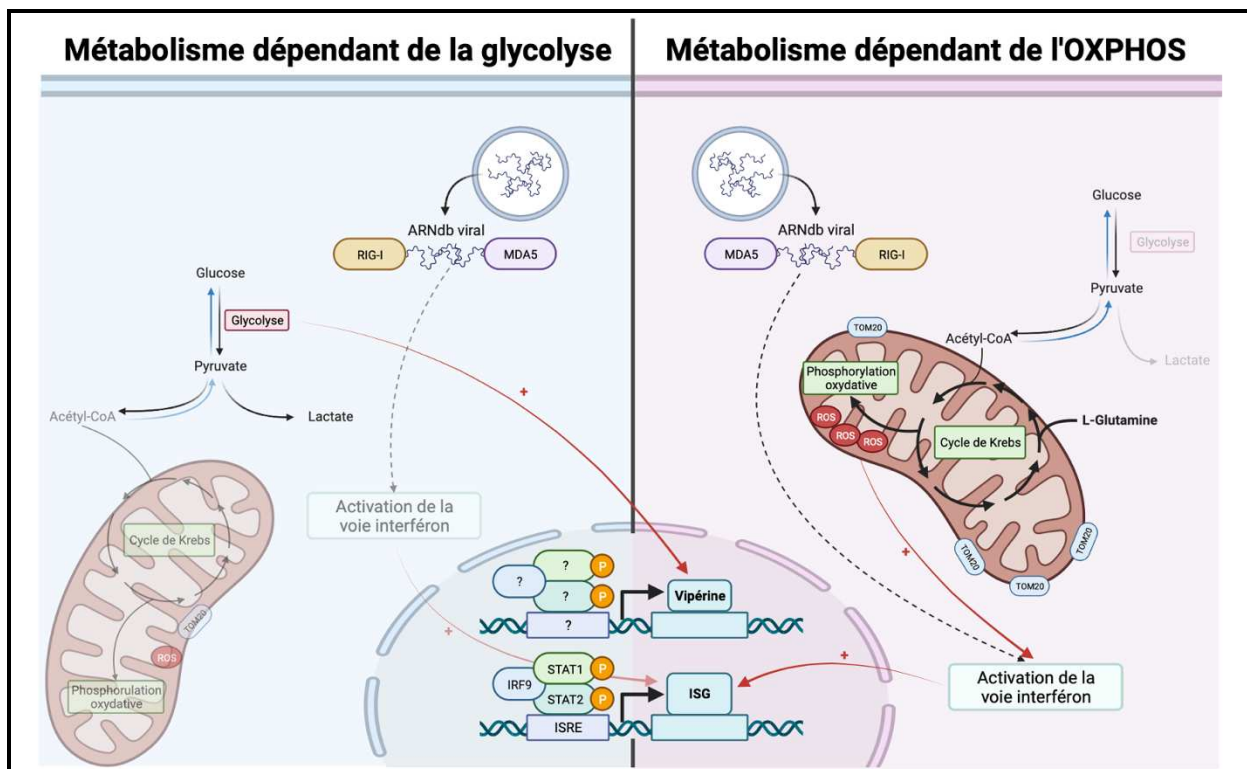
En conséquence, nous avons fait le choix pour la suite de nos travaux de revoir notre modèle d'étude de l'influence de la phosphorylation oxydative sur la production des effecteurs antiviraux. À partir de là, nous cultiverions les A549<sup>Dual</sup> d'une part avec du RPMI contenant 2 g·L<sup>-1</sup> de glucose mais sans L-glutamine et d'autre part avec du RPMI contenant 2 g·L<sup>-1</sup> de glucose supplémenté avec 2 mM de L-glutamine. Comme précédemment, nous avons voulu caractériser notre modèle pour nous assurer que l'apport de L-glutamine dans le milieu allait

bien permettre aux cellules de se reposer sur la phosphorylation oxydative. Là encore, nous avons retrouvé une augmentation du flux de consommation d'O<sub>2</sub>, que ce soit au niveau basal ou lorsque l'activité mitochondriale était maximale. Les cellules cultivées avec de la L-glutamine retrouvait bien un métabolisme plus physiologique avec une phosphorylation oxydative plus active (**Article 2, Figure 1**). La suite logique a été pour nous de répéter notre étude précédente avec le poly:IC mais cette fois en comparant l'apport de la L-glutamine. La stimulation des A549<sup>Dual</sup> avec le mimétique d'ARN viral a conduit au même constat que précédemment, avec une augmentation significative de l'expression génique de plusieurs ISGs (ISG12, ISG15, ISG54, ISG56 et IRF1) chez les cellules cultivées avec de la L-glutamine et donc ayant une OXPHOS accrue (**Article 2, Figure 2**). Ces résultats ont été confirmés avec le système rapporteur ISRE-Luciférase, et cette fois par Western Blot. De manière intéressante, cette augmentation s'accompagnait d'une élévation des ROS mitochondriaux, mesurés grâce à une sonde spécifique, le MitoSOX<sup>®</sup> (**Article 2, Figure 2 et 5**). À noter, nous avons également démontré une augmentation du marquage TOM20 (*Translocase Outer Membrane 20*), traduction possible d'un compartiment mitochondrial plus actif. La mitochondrie semble réellement au cœur de l'amélioration de la production des effecteurs antiviraux chez les cellules cultivées en L-glutamine. En particulier, les ROS produits en plus grande quantité dans cette condition ont probablement pour rôle de potentialiser la signalisation via MAVS, puisqu'il est connu que les ROS mitochondriaux ont un rôle dans l'agrégation de cette protéine et la signalisation en aval.

### III.1.ii.b. Des effecteurs antiviraux maintiennent une capacité antivirale en cas de glycolyse

Comme je l'évoquais, les données obtenues sur la vipérine au laboratoire nous ont fait nous questionner sur l'expression de cette protéine dans notre modèle. Nous avons donc évalué cette expression suite à la stimulation par le poly:IC et avons pu rapporter une augmentation de l'expression génique de la vipérine dans les cellules cultivées sans L-glutamine, cette expression

étant réduite en présence de L-glutamine (**Article 2, Figure 3**). Il faut noter, qu'une autre cible que nous avons eu la possibilité de tester, OAS1, suit la même logique d'expression. Ces résultats ont pu être confirmés au niveau protéique par Western Blot (**Article 2, Figure 5**). À ce stade, il semblait fortement probable pour nous qu'il y ait une dichotomie dans l'expression des effecteurs antiviraux. Certains, comme ISG15, ISG54 et ISG56 requièrent une OXPHOS active, alors que d'autres comme OAS1 et la vipérine seraient exprimés en contexte glycolytique (**Figure 35**).



**Figure 36 – Le métabolisme cellulaire dresse les contours d'une réponse antivirale ambivalente.** Dans le cas d'un métabolisme régi par l'activité mitochondriale et la phosphorylation oxydative, la détection de motifs associés au pathogène d'origine virale semble aboutir à une réponse antivirale plus importante, représentée par la production d'ISGs, telles que ISG15, ISG54 et ISG56. L'amélioration de la synthèse de ces effecteurs est liée à la phosphorylation oxydative, et semble corrélée avec une production de ROS mitochondriaux plus importante. En contexte glycolytique, la voie de l'interféron est en revanche inefficace, la production des ISGs citées précédemment est limitée. Seuls la vipérine et OAS1 restent exprimés à des niveaux satisfaisants, avec un mode d'expression indépendant de l'interféron  $\beta$ .

Pour objectiver cela, nous avons d'une part tenté d'inhiber la glycolyse avec du 2-DG et d'autre part la phosphorylation oxydative, toujours avec de la roténone. Comme nous le pensions, l'utilisation de 2-DG a conduit à une perte de l'expression génique et protéique de la vipérine, semblant confirmer que son expression est dépendante de la glycolyse. Comme

précédemment, les autres ISGs testées (ISG12, ISG15, ISG54 et ISG56) voyaient leur niveau régulé en présence de roténone, attestant du lien existant entre l'OXPHOS et l'expression de ces ISGs (**Article 2, Figure 5**). Nous avons finalement consacré la fin de cette étude à tenter de déterminer ce qui pouvait expliquer la dichotomie dans l'expression des ISGs selon le contexte métabolique. Nous avons pu mettre en avant que cette variation est sans doute à mettre en relation avec un axe IFN- $\beta$  / JAK / STAT dont l'activité est amoindrie en contexte glycolytique, notamment dû à une expression de l'IFN- $\beta$  réduite, la vipérine et OAS1 parvenant à échapper à la diminution liée à cette voie d'induction (**Article 2, Figure 6**).

# Metabolic Dependency Shapes Bivalent Antiviral Response in Host Cells: The Role of Glutamine

Grégoire Lebeau<sup>1</sup>, Aurélie Paulo-Ramos<sup>2</sup>, Mathilde Hoarau<sup>2</sup>, Daed El Safadi<sup>1</sup>, Olivier Meilhac<sup>2</sup>, Pascale Krejbich-Trotot<sup>1</sup>, Marjolaine Roche<sup>1</sup> and Wildriss Viranaicken<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de la Réunion, INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Plateforme Technologique CYROI, 94791 Sainte Clotilde, La Réunion, France

<sup>2</sup> Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Campus Santé Université de la Réunion, 77 avenue du Docteur Jean-Marie Dambreville, 97410 Saint-Pierre, France

\* Correspondence: gregorie.lebeau@univ-reunion.fr (G.L.)

**Abstract:** The establishment of effective antiviral responses within host cells is intricately related to their metabolic status, shedding light on immunometabolism. In this study, we investigated the hypothesis that cellular reliance on glutamine metabolism contributes to the development of a potent antiviral response. We evaluated the antiviral response in the presence or absence of L-glutamine in the culture medium, revealing a bivalent response hinging on cellular metabolism. While certain interferon-stimulated genes (ISGs) exhibited higher expression in an oxidative phosphorylation (OXPHOS)-dependent manner, others were surprisingly upregulated in a glycolytic-dependent manner. This metabolic dichotomy was influenced in part by variations in IFN- $\beta$  expression. We initially demonstrated that the presence of L-glutamine induced an enhancement of oxidative phosphorylation in A549 cells. Furthermore, in cells stimulated poly:IC, a marked increase in ISGs expression was observed in a dose-dependent manner with L-glutamine supplementation. Interestingly, our findings unveiled a metabolic dependency in the expression of specific ISGs. In particular, genes such as ISG54, ISG12 and ISG15 exhibited heightened expression in cells cultured with L-glutamine, corresponding to higher OXPHOS rates and IFN- $\beta$  signaling. Conversely, the expression of viperin and 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 was inversely related to L-glutamine concentration, suggesting a glycolysis-dependent regulation, confirmed by inhibition experiments. This study highlights the intricate interplay between cellular metabolism, especially glutaminergic and glycolytic, and the establishment of the canonical antiviral response characterized by the expression of antiviral effectors, potentially paving the way for novel strategies to modulate antiviral responses through metabolic interventions.

**Keywords:** antiviral response, OXPHOS, mitochondrial respiration, glycolysis, metabolic reprogramming, immunometabolism

## Abbreviations

<b>2-DG</b>	2-deoxyglucose
<b>A549<sup>Dual</sup></b>	A549-Dual <sup>TM</sup> , expressing NF- $\kappa$ B-SEAP and IRF-Luc reporters
<b>GAS</b>	Gamma interferon activation site
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFNAR</b>	IFNs $\alpha/\beta$ receptor
<b>IRF</b>	Interferon Regulatory Factor
<b>ISG</b>	Interferon Stimulated Gene
<b>ISRE</b>	IFN-stimulated response element
<b>mROS</b>	Mitochondrial reactive oxygen species
<b>OXPHOS</b>	Oxidative phosphorylation
<b>PIC</b>	Poly(I:C) (HMW) / LyoVec <sup>TM</sup>

## 1. Introduction

Over the past two decades, we have been regularly confronted with our vulnerability to infectious diseases, whether emerging or re-emerging [1–7]. To deal with epidemics that can take on worldwide proportions, major research efforts have been required to gain a better understanding, not only of the emergence of these viruses, but also the pathophysiology associated with them. The antiviral response is one of the most widely explored aspects, depicting the host-pathogen relationship that develops during infection, which represents an evolutionary mechanism elaborated by the host to struggle against viral infections [8]. The canonical pathway of the antiviral response - the Interferon (IFN) pathway - is initiated by the recognition of pattern associated molecular patterns (PAMPs), usually viral nucleic acids, by pattern recognition receptors (PRRs). The viral genome released into the cytosol is specifically recognized by RIG-I like receptors (RLR *e.g.*, RIG-I and MDA5) notably for viral 5'PPP-RNA and cyclic GMP-AMP Synthase (cGAS) for viral dsDNA [9,10]. Nucleic acids of endosomal origin are recognized by Toll-like receptors (TLRs) found in the endosome; TLR3 for dsRNA, TLR7/8 for ssRNA and TLR9 for DNA containing unmethylated CpGs [9]. Most of these receptors activate interferon regulatory factors (IRFs) via adaptor proteins. For example, RIG-I and MDA5 interact with MAVS via their CARD domain, leading to a signaling cascade involving TRAF3, TBK1 and IKK $\epsilon$ , resulting in phosphorylation and heterodimerization of IRF7 and IRF3 [9]. Similarly, TLR3, via TRIF, leads to activation of IRF3 and 7 while TLR7, 8 and 9, via MYD88, lead to the formation of IRF7 homodimers [9]. More recently, the demonstration of the ability of cGAS to produce cyclic GMP-AMP (cGAMP) following the detection of cytosolic dsDNA led to the description of a new IFN production pathway, via the Stimulator of Interferon Genes – STING [10]. STING, through TBK1, leads to phosphorylation and homodimerization of IRF3 [10]. Finally, IRFs activated by these different pathways can translocate to the nucleus of the infected cell, where they interact with their promoter to allow transcription of type I and III IFNs. It is difficult to distinguish the intrinsic activity of type I IFNs (predominantly  $\beta$ ) from type III IFNs, as their secretion occurs concomitantly [11]. Secreted IFNs act in an autocrine and paracrine manner, via their IFNAR1/2 and IFNLR1/IL-10R $\beta$  receptors respectively, leading to the phosphorylation and homodimerization of STAT1 (GAF) on the one hand and, on the other, to the formation of the ISGF3 complex, composed of IRF9 and phosphorylated STAT1 and 2 [11,12]. ISGF3 interacts with the interferon-sensitive responsive element (ISRE), while GAF interacts with the gamma interferon activation site (GAS), in both cases leading to the expression of ISGs [11,12]. Alternatively, specific antiviral programs have been demonstrated, involving, for example, peroxisomal localization of MAVS which, after interaction with RIG-I, specifically induces activation of IRF1 leading to direct expression of antiviral genes and, at epithelial level, IFN- $\lambda$  [13,14]. The interferon-stimulated genes (ISGs) encode antiviral proteins that have various functions on the virus life cycle, including inhibition of viral entry (myxovirus resistance genes), translation and replication (IFIT family, viperin), or even budding (tetherin) [11]. Additionally, they are able to improve sensing or potentiate interferon signaling pathways [15].

The IFN response is acute, representing the first line of defense deployed by cells at the site of infection, limiting the spread of the virus throughout the body. It also enables the innate and adaptive immune responses to be established accordingly [16]. However, this line of defense is vulnerable and many viruses have developed mechanisms to circumvent and control the antiviral response. To avoid the IFN response, several of these mechanisms are often active simultaneously. Upstream of IFN secretion, certain viruses appear to act by limiting the detection of their genome or by interfering with the signaling pathways leading to IFN secretion. For example, the N and NSP5 proteins of SARS-CoV-2 limit the polyubiquitination of RIG-I, which is involved in the stabilization of its CARD domains and the aggregation of

MAVS [17]. Viral protease from HCV has shown the ability to cleave Cardif an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway [18]. Viral escape can also occur downstream of IFN secretion by inhibiting ISG production. Many viruses (*e.g.*, Nipah virus, Measles virus, DENV, ZIKV) are able to target STAT1 and STAT2, sequestering them or causing their degradation [19]. Furthermore, while metabolism has proven to be of interest in the activation of immune cells [20], it is no less central to the IFN response. Metabolism is a crucial control point for the virus during infection in several regards. Firstly, during infection, the diversion of cellular metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis, via a Warburg-like effect, allows the virus to access a quantity of biomass consistent with viral progeny [21]. On the other hand, control of metabolism could limit its effects on the establishment of the antiviral response. Indeed, we have previously shown that induction of the antiviral response by poly:IC in galactose-cultured cells, to boost their oxidative phosphorylation, resulted in greater expression of ISGs than when cells based their metabolism on glucose use and glycolysis [22]. Consistent with our results, mitochondrial ROS production was previously shown to induce MAVS oligomerization and type I IFN production [23]. In support of this hypothesis, it was shown that cells resistant to HIV-induced aerobic glycolysis have a higher antiviral potential and are accompanied by virus control [24]. Strengthening the link between cell respiration and virus infection, flavivirus affects the respiratory pathways of infected cells, notably through inhibition of mitochondrial fission by NS4B, which prevents the onset of mitochondrial antiviral status due to decreased ROS production [25,26]. Additionally, illustrating the deleterious effect of aerobic glycolysis on infected cells, the lactate produced by this process has been shown to affect RIG-I-dependent IFN production by regulating MAVS [27].

It has been stated on several occasions that the supply of TCA and therefore of oxidative phosphorylation can occur through the anaplerotic use of glutamine to give  $\alpha$ -ketoglutarate. However, to date, the beneficial effect of glutamine during infection remained unclear. Indeed, it has been suggested that infected cells may be 'addicted' to glutamine, although it has not been established whether this addiction is due to the virus or rather to the requirement for glutamine to mount an effective antiviral response [28]. The work of Shiratori et al. illustrates that the use of galactose to force the metabolic reprogramming of cancer cells toward OXPHOS relies on increasing the glutamine pool to anaplerotically generate TCA intermediates [29]. In light of these data and our previous work, we hypothesize here that the host cell depends on glutamine to establish a metabolic process adapted to the development of an effective antiviral response. To test this hypothesis, we decided to evaluate the antiviral response in the presence or absence of L-glutamine in our culture medium. Interestingly, we demonstrated the existence of a bivalent antiviral response depending on cellular metabolism. Indeed, some ISGs are more expressed in an OXPHOS-dependent manner, as we expected, while others are more expressed in a glycolytic-dependent manner, the dichotomy in part relying on a variation of IFN- $\beta$  expression.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Cells and reagents*

The human A549-Dual™ (A549<sup>Dual</sup>) are adherent epithelial cells derived from A549 lung carcinoma cell line (ATCC, CCL-185™). A549<sup>Dual</sup> were purchased from InvivoGen (ref. a549d-nfis, San Diego, CA, USA). QUANTI-Luc™ substrate was obtained from InvivoGen (ref. rep-qlc1, San Diego, CA, USA). Oligomycin (ref. 75351), myxothiazol (ref. T5580), 2-deoxyglucose (2-DG, ref. D8375), 2,4-dinitrophenol (DNP, ref. D198501) and rotenone (ref. R8875) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Poly(I:C) (HMW) / LyoVec™ (PIC) was purchased from InvivoGen (ref. tlrl-piclv, San Diego, CA, USA). MitoSOX™ Red was purchased from InvitroGen (ref. M36008, Carlsbad, CA, USA). Non-essential amino acid solution was purchased from PAN Biotech (ref. P08-32100, Aidenbach, Germany).

## 2.2. Cell culture

A549<sup>Dual</sup> cells were cultured for maintenance at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in 4,5 g·L<sup>-1</sup> glucose Dubecco's Modified Eagle's Medium – DMEM (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Dutscher, Brumath, France), 100 U·mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin, 2 mM L-glutamine and 0.5 µg·mL<sup>-1</sup> amphotericin B (PAN Biotech, Dutscher, Brumath, France) and containing 10 µg·mL<sup>-1</sup> blasticidin and 100 µg·mL<sup>-1</sup> zeocin (InvivoGen, San Diego, CA, USA), for selection of cells expressing NF-κB-SEAP and IRF-Luc reporters.

## 2.3. Oxygen consumption rate assessment

A549<sup>Dual</sup> cells were cultured in 25 cm<sup>2</sup> flasks, DMEM 4.5 g·L<sup>-1</sup> glucose was replaced by RPMI 2 g·L<sup>-1</sup> glucose, supplemented or not with 2 mM L-glutamine 24 hours before oxygen consumption rate (OCR) assessment. The cells were then washed with PBS, collected with trypsin / EDTA, and centrifuged at 800×g for 5 min, at room temperature. Subsequently, cell pellets were suspended in a volume of RPMI 2 g·L<sup>-1</sup> glucose, supplemented or not with 2 mM L-glutamine, allowing the number of cells per chamber to be standardized (approximately 2×10<sup>6</sup> cells). Basal oxygen consumption rates were continuously measured on whole cells at 37°C, using a Clark-type oxygen electrode (Oroboros Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). For calibration of the polarographic oxygen sensor and measurement of background oxygen consumption, the medium without biological sample was added to the O2k-chamber. For each experimental condition, OCR was measured in the presence or absence of the F1F0-ATP synthase inhibitor – oligomycin (1 µM), the glycolysis inhibitor – 2-DG (5 mM), the protonophoric uncoupler – dinitrophenol (100 µM) and a mix of the mitochondrial complex III inhibitor – myxothiazol (1 µM) and the mitochondrial complex I inhibitor – rotenone (1 µM). Data were expressed as picomoles O<sub>2</sub> consumed by cells per second and per million of cells.

## 2.4. Cytotoxicity assay

A549<sup>Dual</sup> were plated in 96-well plate with a density of seeding corresponding to 10,000 cells per well. Cells were then treated respectively with RPMI 2 g·L<sup>-1</sup> glucose, supplemented (or not) with 2-mM L-glutamine, containing increasing doses of 2-DG (ranging from 1 mM to 20 mM). DMEM – DMSO 10% was used as a positive death inductor. 24 hours after, cells undergo for neutral red assay.

Cell viability was assessed with neutral red uptake assay, as described by Repetto et al. [30]. Briefly, after removal of the cell culture supernatant, 100 µL of medium containing 40 µg·mL<sup>-1</sup> of neutral red was added to each well. Cells were then incubated during 2 hours at 37°C. Following incubation, medium was removed and cells were washed with PBS. Finally, 150 µL of neutral red destain (50% ethanol, 49% H<sub>2</sub>O, 1% glacial acetic acid) was added to each well. Absorbance was read at 540 nm using FLUOstar® Omega microplate reader (BMG LABTECH, Offenburg, Germany).

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times \frac{\text{Experimental condition } (OD_{540})}{\text{Negative control } (OD_{540})}$$

## 2.5. Cell stimulation

Antiviral response was induced using polyriboinosinic:polyribocytidylic acid (poly:IC), a double stranded RNA complexed with transfection reagents which improve its uptake. A549<sup>Dual</sup> were cultured in RPMI-1640 (ref. P04-17550, PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with glucose (2 g·L<sup>-1</sup>) and with or without L-glutamine upon stimulation, to promote metabolic reprogramming. Briefly, cells were plated in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS containing 2 g·L<sup>-1</sup> of glucose with L-glutamine at different concentrations (0 mM, 0.2 mM, 1 mM or 2mM). After 24 hours of adaptation, cells were stimulated during 6 hours using PIC at 0.25 µg·mL<sup>-1</sup> to study early steps of IFN pathway and 24



hours for late steps of IFN pathway (*e.g.*, ISGs production). In the same manner, assessment of antiviral response following cellular respiration or glycolysis inhibition was achieved using 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PIC and respectively 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  rotenone or 5 mM 2-DG during 24 hours on A549<sup>Dual</sup> either cultured in RPMI-1640 with 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose either supplemented with L-glutamine 2 mM or not for 24 hours. Following stimulation, cell culture supernatant was harvested and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , while cells were either used fresh in flow cytometry, fixed for immunofluorescence or lysed using RLT Lysis Buffer (Qiagen, Hilden, Germany) for subsequent RNA extraction or using RIPA buffer for subsequent protein preparation.

## 2.6. RT-qPCR

Total RNA has been extracted from cell lysates by using the RNeasy Plus Mini Kit (cat. 74136, Qiagen, Hilden, Germany). The total cDNA was obtained by reverse transcription using random primers from Invitrogen (ref. 58875, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and M-MLV reverse transcriptase enzyme (ref. M1708, Promega, Madison, WI, USA) at  $42^{\circ}\text{C}$  for 60 minutes. cDNA was then subjected to a quantitative polymerase chain reaction, using a CFX96 Connect<sup>TM</sup> Real Time Detection System (Bio-Rad, Hercule, CA, USA). For amplification, BlasTaq<sup>TM</sup> 2X qPCR MasterMix (ref. G892-1, Applied Biological Materials, Vancouver, Canada) and specific primers were used to assess gene transcripts expression for following targets: ISG56, ISG54, ISG15, ISG12, IRF1, Viperin, OAS1, CMPK2, lncRNA-NRIR, IFN- $\beta$ , RNA polymerase II and 18S ribosomal RNA. A threshold cycle (Ct) was calculated for each single sample amplification reaction in the exponential phase of amplification, using Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, Hercule, CA, USA). Data obtained were expressed as mean normalized expression, RNA polymerase II and 18S ribosomal RNA serving as housekeeping gene.

Gene	Forward primer	Reverse primer
RNA polymerase II	5'-GAGAGCGTTGAGTTCCAGAACC-3'	5'-TGGATGTGTGCGTTGCTCAGCA-3'
18S ribosomal RNA	5'-AGCCTGCGGCTTAATTTGAC-3'	5'-CAACTAAGAACGGCCATGCA-3'
ISG56	5'-GCAGCCAAGTTTTACCGAAG-3'	5'-CACCTCAAATGTGGGCTTTT-3'
ISG54	5'-CTGGTCACCTGGGGAAACTA-3'	5'-GAGCCTTCTCAAAGCACACC-3'
ISG15	5'-AGATCACCCAGAAGATCGGC-3'	5'-GAGGTTGTCGTCATTTGTCC-3'
ISG12	5'-CGTCCTCCATAGCAGCCAAGAT-3'	5'-ACCCAATGGAGCCCAGGATGAA-3'
IRF1	5'-GAGGAGGTGAAAGACCAGAGCA-3'	5'-TAGCATCTCGGCTGGACTTCGA-3'
Viperin	5'-GATGTTGGTGTAGAAGAAGC-3'	5'-CCAATCCAGCTTCAGATCAG-3'
OAS1	5'-CATGCAAATCAACCATGCCA-3'	5'-ACAACCAGTCCAGCGTCAGATC-3'
CMPK2	5'-CCAGGTTGTTGCCATCGAAG-3'	5'-CAAGAGGGTGGTACTTTAAGAG-3'
lncRNA-NRIR	5'-CCACCCCCACGAAGAAATTATATATC-3'	5'-GTTAGAGTGTCTGCTGCAATAATC-3'
IFN- $\beta$	5'-CTTGATTCTACAAAGAAGCAGC-3'	5'-TCCTCCTTCTGGAAGTCTGCA-3'

## 2.7. Western blot

Stimulated cells (see 2.4 *Cell stimulation*) were lysed in 200  $\mu\text{L}$  of radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Lysate were sonicated at  $0^{\circ}\text{C}$  for 1 min of pulse at 40% at 0.5 cycle using an Omni-Ruptor 4000 (Omni International, Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France). Proteins from total cell extract were quantified using BCA reagent according to manufacturer instructions (Sigma-Aldrich, Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France). A standardized amount of protein extracts was treated with Laemmli buffer containing 10 mM DTT and heated at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min. 15  $\mu\text{g}$  of proteins were separated on precast NuPAGE gels 4 – 12% (Thermofischer, France) at 200V constant for 35 minutes. Transfer was performed on NC Protan supported membrane with a 0.45  $\mu\text{m}$  pores (Amersham, GE, Buc, France) at 60 mA constant per gel for 2 hours using a semi-dry system. After transfer, the membranes were saturated with 5% nonfat

dry milk in PBS – Tween 0.1%. Membranes were then incubated successively with primary antibodies and secondary antibodies diluted in PBS – Tween 0.1% – 1% nonfat dry milk. Blots were revealed with enhanced chemiluminescence, ECL prime detection reagents (GE, Buc, France) using an Amersham Imager 680 (GE, Buc, France).

Target	Reference	Dilution
Rabbit anti-ISG15	MA5-29371 (Invitrogen)	1:1000
Mouse anti-ISG56	MA5-25050 (Invitrogen)	1:1000
Mouse anti-Viperin	MABF106 (Sigma-Aldrich)	1:1000
Mouse anti-IFN- $\beta$	AB_2122765 (Biolegend)	1:1000
Rabbit anti-pSTAT2	07-224 (Sigma-Aldrich)	1:1000
Rabbit anti- $\beta$ -Tubulin	AC008 (ABclonal)	1:1000
Goat anti-rabbit immunoglobulin-HRP	AB_2313567 (Jackson ImmunoResearch)	1:5000
Goat anti-mouse immunoglobulin-HRP	AB_10015289 (Jackson ImmunoResearch)	1:5000

### 2.8. Mitochondrial ROS measurement

Mitochondrial ROS were measured with MitoSOX™ Red using a flow cytometry-based protocol [31]. Briefly, A549<sup>Dual</sup> were washed with PBS 1X, harvested with trypsin / EDTA, and centrifuged at 800×g for 5 min. After three washes, cells were resuspended in preheated RPMI 2 g·L<sup>-1</sup> glucose without phenol red, supplemented or not with 2 mM L-glutamine. MitoSOX™ Red at a final concentration of 5  $\mu$ M was added to cell suspension and incubated for 30 min at 37°C. After three washes with preheated medium, the expression of MitoSOX™ is quantified in the PE channel by flow cytometry, using a CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, USA).

### 2.9. Immunofluorescence

A549<sup>Dual</sup> cells grown on glass coverslips were fixed with 3.7% paraformaldehyde – 50 mM HEPES – 150 mM NaCl at room temperature for 10 min. Fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 3 min. The coverslips were incubated with primary antibodies in 1% BSA – PBS. Antigen – antibody binding was visualized with donkey anti-mouse Alexa 488 Fluor-conjugated and donkey anti-rabbit Alexa 488 Fluor-conjugated secondary antibodies. Nucleus morphology was revealed by 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) staining. The coverslips were mounted with ibidi Mounting Medium (ref. 50001, ibidi, Gräfelfing, Germany) and fluorescence was observed using an AXIO OBSERVER 7 equipped with the Apotome.2 (Zeiss, Oberkochen, Germany). The images were acquired with the ZEN software version 3.1 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Target	Reference	Dilution
Mouse anti-TOM20	sc-17764 (Santa Cruz)	1:200
Mouse anti-IFN- $\beta$	AB_2122765 (Biolegend)	1:200
Rabbit anti-STAT2	sc-22816 (Santa Cruz)	1:200
Donkey anti-mouse Alexa 488	ab150105 (abcam)	1:750
Donkey anti-rabbit Alexa 488	ab150073 (abcam)	1:750

### 2.10. Measurement of the IFN- $\beta$ Pathway activation

Activation of the Interferon regulatory factors (IRF) pathway was monitored by measuring Lucia luciferase activity in A549<sup>Dual</sup> cells. It was evaluated using QUANTI-Luc substrate according to manufacturer's recommendations. Briefly, 100  $\mu$ L of QUANTI-Luc substrate was added to 20  $\mu$ L of cell culture supernatant and IRF-induced luciferase levels were

quantified by luminescence measurement using a Luminoskan™ microplate luminometer (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

### 2.11. *Transcription factors prediction*

Prediction of potential binding sites for transcription factors in the promoter region of antiviral effectors was achieved using PROMO tool from ALGGEN group, which based on TRANSFAC 8.3 [32,33]. Briefly, a sequence of at least 1000 bp upstream of the 1<sup>st</sup> exon of each of the following genes was recovered from the Ensembl database [34]: viperin (ENSG00000134321), OAS1 (ENSG00000089127), ISG12 (ENSG00000165949), ISG15 (ENSG00000187608) and ISG54 (ENSG00000119922). These sequences were submitted to MultiSearchSites to search for binding sites that viperin and OAS1 sequences share on the one hand and ISG12, ISG15, and ISG54 on the other, restricting the prediction to the human set of transcription factors. A Venn diagram was then drawn to illustrate the transcription factors common or specific to these groups [35].

### 2.12. *Statistical analyses*

For all figures except figures 1 and 2C, statistical analyses were performed by two-way ANOVA with Dunnett's correction using Graph-Pad Prism software version 9. For figures 1 and 2C, statistical analyses were done using unpaired T-test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. The degrees of significance are indicated in the figures captions as follow: \* $p < 0.0332$ ; \*\*  $p < 0.0021$ ; \*\*\*  $p < 0.0002$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 3. Results

### 3.1. *Enhancement of OXPHOS occurs in presence of L-glutamine*

We have previously demonstrated the ability of cells to produce a more effective antiviral response if cellular respiration was increased [22]. We then induced metabolic reprogramming of our cells using galactose. Galactose was shown to anaplerotically feed TCA via L-glutamine production [29]. An open question in the literature is whether L-glutamine is essential for antiviral response or viral progeny [28]. In light of our previous results, we hypothesized that L-glutamine would be essential for the establishment of an effective antiviral response, via the supply of TCA and OXPHOS.

As a first step, we therefore evaluated the ability of L-glutamine to induce an increase in cellular respiration. To do so, we cultured A549<sup>Dual</sup> cells in RPMI containing 2 g·L<sup>-1</sup> glucose, supplemented or not with 2 mM L-glutamine. After 24h of adaptation, we measured the O<sub>2</sub> consumption of our cells by oximetry, using different uncoupling agents. As shown in **Figure 1A**, our two culture conditions lead to a different O<sub>2</sub> consumption rate. Indeed, the basal level of O<sub>2</sub> consumption is significantly increased in the presence of L-glutamine (**Figure 1B - left panel**). Moreover, using 2,4-dinitrophenol to force the passage of protons from the mitochondrial intermembrane space reveals that the maximal respiratory capacity of A549<sup>Dual</sup> is also significantly increased – 40% higher – in the presence of L-glutamine (**Figure 1B – middle panel**). Finally, we measured the proportion of O<sub>2</sub> consumption not attributable to mitochondria, completely uncoupling the mitochondrial respiratory chain using a mixture of rotenone and myxothiazol. Cells grown without L-glutamine showed greater non-mitochondrial cellular respiration than cells grown in the presence of L-glutamine (**Figure 1B - right panel**). Notably, the proton leakage assessed through the use of oligomycin was not different between our two culture conditions. Also, the use of 2-deoxyglucose (2-DG) induces a decrease in O<sub>2</sub> consumption but with no significant difference between cells cultured with or without L-glutamine. Thus, we have shown that L-glutamine induces an increase in cellular respiration in A549<sup>Dual</sup> which, according to our hypothesis, could be associated with a greater antiviral response in an infectious context.

### 3.2. The antiviral response is bivalent and varies according to metabolic context

As mentioned above, the role of L-glutamine in infection is not well defined yet. Some believe that L-glutamine is essential for virus progeny, making the virus addicted to L-glutamine [28]. Others suggest that L-glutamine is necessary for the antiviral response, making the host cell addicted to L-glutamine during infection. Assuming that L-glutamine supports a metabolism based on oxidative phosphorylation, it seems reasonable to suppose that it would also support the development of the antiviral response. In order to prove the host cell's addiction to L-glutamine for the development of the antiviral response, we decided to use poly:IC (PIC) with increasing doses of L-glutamine. PIC is a dsRNA, widely used as pathogen associated molecular pattern mimetic. Indeed, It is known to mimic replicating viral RNA and to trigger the antiviral response, through activation of TLR3, RIG-I and RIG-I like receptors (RLR), resulting in type I IFNs production and ISGs expression [36,37].

Thus, we cultured A549<sup>Dual</sup> with increasing doses of L-glutamine (from 0 to 2 mM) for 24 h before stimulation with PIC 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . After 24h of stimulation, we assessed the development of the antiviral response by measuring ISGs expression by RT-qPCR. All ISGs tested here (IRF1, ISG15, ISG56, ISG54 and ISG12) showed an increase in expression in response to PIC. Also, interestingly, their expression increases in dose response with L-glutamine until it reaches a maximum, which is consistent with the level of expression found in cells cultured in complete DMEM. The difference in expression with cells cultured without L-glutamine was significant as early as 0.2 mM L-glutamine, with levels varying between 2 and 5-fold more, depending on the gene studied (**Figure 2A**). To validate the effect observed at the transcriptional level, we assessed the synthesis of proteins that rely on the ISRE promoter. Specifically, since we used A549<sup>Dual</sup>, which expresses Lucia luciferase under the control of an ISG54 minimal promoter along with five IFN-stimulated response elements (ISRE), we were able to evaluate ISGs protein expression via luciferase secretion supernatant. Consequently, we examined the release of luciferase into the supernatant of cells treated with PIC by measuring the emitted luminescence using the Lucia luciferase substrate (QUANTI-Luc). Consistent with the results obtained from RT-qPCR, we detected a significant increase in luciferase activity upon PIC stimulation and along with an increase in L-glutamine concentration (up to 10-fold), representing a significant induction of antiviral proteins whose production is under the control of ISRE (**Figure 2B**).

Oxidative phosphorylation within the mitochondria has been regularly associated with the production of mitochondrial reactive oxygen species (mROS) that have several physiological functions [38]. Among the functions repeatedly associated with these mROS is the promotion of the antiviral response [23,39]. Using MitoSOX™, we explored the formation of mROS in our model by flow cytometry. Thus, after 6h of stimulation with PIC, mROS induction was greater in cells cultured with 2 mM L-glutamine, illustrating the concomitance of this induction with the establishment of the early steps of the antiviral response (**Figure 2C and S1**). Furthermore, this induction was associated with increased TOM20 labeling in A549Dual cells cultured in L-glutamine and treated with PIC for 6h (**Figure 2D**). The increase in TOM20 signal is another manifestation of a more functional mitochondrial network in the presence of L-glutamine, supporting oxidative phosphorylation (**Figure 1**) and induction of mROS (**Figure 2C**).

Furthermore, to confirm that the increase in antiviral response is related to a specific effect of L-glutamine, cells were stimulated with PIC 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in the presence (or absence) of a solution of non-essential amino acids – NEAA (0.1 mM L-alanine, 0.1 mM L-asparagine, 0.1 mM L-aspartic acid, 0.1 mM L-glutamic acid, 0.1 mM glycine, 0.1 mM L-proline and 0.1 mM L-serine) to which 2 mM L-glutamine was added (or not). As shown in **Figure S2**, luciferase activity, and

therefore the antiviral response it reflects, was not increased in the presence of NEAA alone. Of note, the addition of L-glutamine to this cocktail restored the previous results.

Surprisingly, the expression of some ISGs does not follow this trend, quite the contrary. Therefore, by evaluating the expression of viperin and 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1) by RT-qPCR under the same conditions, we established that these genes are more highly expressed at low L-glutamine concentration. Indeed, their expression decreases inversely (up to 7-fold) with increasing L-glutamine concentration (**Figure 3**). This suggests that there is in fact a dichotomy in the expression profile of ISGs depending on the predominant metabolic pathway at the time of PIC stimulation. If OXPHOS is favored, through L-glutamine, there will be a greater expression of ISG12, ISG15, ISG54, ISG56 and IRF1. On the contrary, if glycolysis is promoted, in this case in the absence of L-glutamine, other ISGs will be favored, such as OAS1 and viperin. To test the accuracy of this hypothesis, we needed to inhibit these different metabolic pathways under infectious condition and evaluate the development of the antiviral response for the different mentioned ISGs.

### *3.3. Antiviral response is bivalent and relying alternatively on glycolysis or OXPHOS*

As before [22], we used rotenone at a concentration of  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  to inhibit OXPHOS. Since rotenone is a broad-spectrum insecticide, piscicide and pesticide from vegetal origin, known to inhibit the complex I of mitochondrial electron transport chain, thus blocking OXPHOS and associated production of ATP [40]. While 2-DG, at 5 mM was used to inhibit glycolysis. Indeed, 2-DG is a glucose molecule with a 2-hydroxyl group replaced by hydrogen, leading to a molecule unsuitable for glycolysis which competitively inhibits glucose-6-phosphate production by phosphoglucoisomerase [41]. Of note, at the dose of 5 mM 2-DG exerts no cytotoxic effect, assessed by neutral red uptake assay, on A549<sup>Dual</sup> as shown in **Figure S2**. Thus, we used these inhibitors in combination with stimulation by  $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PIC, to study the impact of glycolysis and OXPHOS inhibition on the expression of the antiviral genes presented above.

First, we assessed this expression at the gene level, using RT-qPCR. As before, expression of IRF1, ISG12, ISG15, ISG54 and ISG56 was significantly increased following stimulation with PIC in the presence of 2 mM L-glutamine, compared with cells cultured without L-glutamine (**Figure 4**). On the contrary, viperin and OAS1 were expressed more when cells were cultured without L-glutamine. The addition of 2-DG, and the subsequent inhibition of glycolysis, resulted in no significant difference in the expression of IRF1, ISG12, ISG15, ISG54 and ISG56. On the other hand, expression of OAS1 and viperin is significantly altered in cells cultured without L-glutamine when glycolysis is inhibited (**Figure 4**). Therefore, we can conclude that, at the transcriptional level, the expression of genes such as OAS1 and viperin appears to be dependent on glycolysis, whereas the expression of other genes (e.g., ISG12, ISG15, IRF1) is independent of this metabolic pathway. Interestingly, the expression of these same genes is significantly inhibited in the presence of rotenone when cells are cultured with L-glutamine. Their expression level even reached that of cells cultured without L-glutamine, notably for ISG54 (**Figure 4**). Regarding OAS1 and viperin, their expression appeared less sensitive to rotenone in cells cultured without L-glutamine, illustrating that these genes are less dependent on OXPHOS than the others (**Figure 4**). Thus, we have demonstrated here that, at the transcriptional level, the increased expression of certain antiviral genes, such as ISG54 and ISG15, in L-glutamine-cultured cells is related to the higher OXPHOS rate in these cells.

At the protein level, we again studied the luminescence emitted by secreted luciferase in response to PIC to estimate the production of antiviral proteins under the control of the ISRE promoter. The results obtained are consistent with those obtained at the gene level for IRF1, ISG12, ISG15, ISG54 and ISG56. Namely, a decrease in luciferase activity, reflecting a reduction in the production of viral proteins under ISRE control, in response to rotenone treatment (**Figure**

**5A**). Finally, by Western blot, we found a higher signal for ISG56 and ISG15 in response to PIC for cells cultured in L-glutamine compared to cells cultured without (**Figure 5B**). This signal decreased after rotenone treatment, indicating that the up-regulated production of these antiviral proteins in L-glutamine-grown cells is indeed related to higher OXPHOS. Viperin, also assessed by Western blot, follows an opposite pattern. Indeed, cells cultured without L-glutamine show a higher signal in response to PIC, illustrating greater viperin production in these cells than in cells cultured with L-glutamine. However, this production was reduced after inhibition of glycolysis by 2-DG (**Figure 5B**). Inhibition of OXPHOS by rotenone also appears to alter viperin production at the protein level, whereas no effect was previously shown at the gene level.

#### *3.4. Viperin is expressed in a type I IFN-independent manner in glycolytic condition*

In an attempt to explain the specificity of viperin expression, we hypothesized that the viperin promoter region could possibly contain an element enabling greater viperin expression in response to glycolysis. Therefore, we evaluated the expression by RT-qPCR of cytidine / uridine monophosphate kinase 2 (CMPK2) and the lncRNA-negative regulator of the IFN response (lncRNA-NRIR), both of which are expressed at the same time as viperin (**Figure 6A**)[42]. As shown in **Figure 6B**, expression of CMPK2 or lncRNA-NRIR did not vary between L-glutamine and L-glutamine-free conditions. This result corroborates the fact that OAS1 also responds better in glycolysis, even though it does not depend on the same promoter region as viperin.

We then attempted to determine whether the switch that leads to a dichotomy in the ISGs expression profile between cells cultured in L-glutamine versus non-L-glutamine cells could be related to a difference in the expression of type I IFNs between our two conditions. Thus, by RT-qPCR, we assessed IFN- $\beta$  expression in response to a 6-hour stimulation with PIC, in the presence or absence of L-glutamine. Interestingly, cells cultured without L-glutamine exert an expression of IFN- $\beta$  similar to that observed for cells cultured with 2 mM L-glutamine (**Figure 6C**). However, this expression is not converted to the protein level, since the signal found for IFN- $\beta$  is weaker for cells cultured without L-glutamine, whether by Western Blot (**Figure 6D**) or immunofluorescence (**Figure 6E**). The higher expression of IFN- $\beta$  in cells cultured with 2 mM L-glutamine results in greater STAT2-mediated signaling in these cells compared to cells cultured without L-glutamine, as evidenced by the stronger signal observed for pSTAT2 for this condition (**Figure 6D**). Therefore, higher expression of ISGs such as ISG54, ISG15, or ISG56 would be associated with more efficient IFN-dependent signaling in the presence of L-glutamine. On the other hand, the increase in viperin and OAS1 expression in glycolysis appears to be independent of IFN signaling. At this point, we still assume that it is possible that the higher expression of these two genes in response to PIC under glycolytic conditions may result from the activation of a transcription factor specific to these two genes compared to the other genes studied here. We therefore sought possible binding sites for transcription factors found in common between the viperin and OAS1 genes on the one hand, and ISG15, ISG54 and ISG12 on the other. To do this, we analyzed a sequence of more than 1000 bp upstream of the first exon of each of these genes, using PROMO tool, based on TRANSFAC 8.3. We then compared the reported binding sites between these two analysis groups (**Figure 6F**). As shown in the Venn diagram, 58 potential binding sites are found to be in common between viperin and OAS1, but only three of these sites are found to be specific to these genes compared to the other ISGs tested: STAT5A, NF-Y, and E2F-1. Therefore, it is possible that one of these three transcription factors is responsible for the expression of viperin and OAS1 in cells treated without L-glutamine.

#### **4. Discussion**

With the succession of viral epidemics, some of which have a global impact, research efforts to understand host response mechanisms have intensified. While much progress has been made in understanding the role of metabolism in the activation and function of immune cells, and therefore in understanding how these cells respond to viral infection, depending on their metabolic setting, very little is known about the innate antiviral response of the infected host cell. An interesting question is whether their metabolism influences the canonical antiviral response, namely the IFN response.

It has been established on several occasions that, during viral infection, viruses manipulate host cell metabolism, diverting them from oxidative phosphorylation to glycolysis [21]. This detour has been shown to be of particular interest in viral progeny, as in the case of HIV and DENV [24,43,44]. However, the influence of such hijacking on the production of antiviral effector molecules induced by the IFN response has not yet been explored. The role of glutaminergic metabolism in the antiviral response also remains unresolved in the literature: does the benefit fall to the virus or to the host cell in the event of infection [28]? We have previously shown that OXPHOS promotes the expression of certain antiviral effectors such as ISG54 and ISG56. Furthermore, given that glutaminergic metabolism is closely linked to oxidative phosphorylation through anaplerotic feeding of TCA, we hypothesized here that glutamine intake in an infectious context would increase the antiviral response and the production of antiviral effectors. To address this hypothesis, we stimulated our cells with poly:IC in the presence or absence of L-glutamine, in order to study the intrinsic effect of metabolism on the antiviral response, while avoiding the inhibitory effect that viral proteins can induce during infection.

Here, we were able to demonstrate that cells cultured with 2 mM L-glutamine had more functional mitochondria (**Figure 2D**), which supported greater induction of OXPHOS and mROS induction (**Figures 1 and 2C**). Furthermore, the increased mitochondrial activity in these cells was correlated with a greater production of certain antiviral effectors (ISG12, ISG15, ISG54, ISG56, IRF1), as shown by inhibition of their expression in the presence of rotenone (**Figures 2, 4 and 5**). However, we were also able to show that the expression of certain ISGs escapes the need for OXPHOS, since viperin and OAS1 are more highly expressed in the presence of aerobic glycolysis (**Figures 3, 4 and 5**). One factor that may explain this dichotomy is that IFN- $\beta$  expression and subsequent signaling are greater in cells to which L-glutamine has been added (**Figure 6**). While higher expression of viperin and OAS1 could be related to a specific transcription factor such as E2F-1 (**Figure 6F**).

It had previously been shown that viperin expression was increased under conditions of high glucose and therefore glycolysis, enabling control of Zika virus infection [45]. These results were surprising in light of our work illustrating the beneficial effect of OXPHOS on the production of other antiviral effectors such as ISG54 and ISG56 [22]. Our study reconciles these results, as we have demonstrated the existence of a bivalent antiviral response, the orientation of which depends on cellular metabolic status (**Figure 7**). Therefore, OXPHOS in L-glutamine culture favors the production of ISGs such as ISG12, 15, 54 and 56. Whereas, glycolysis is beneficial for the production of viperin and OAS1. These results suggest that the bivalence of the antiviral response may be of interest in the event of metabolic reprogramming by the virus, with one taking over from the other. Thus, in the case of a Warburg-like effect, the host cell can still base its antiviral response on the induction of potent antiviral effectors such as viperin or OAS1. However, through this work we have not been able to uncover the mechanism leading to greater expression of viperin in a glycolytic context. And this important aspect remains to be explored in future work. We hypothesize that the expression of viperin and OAS1 could be linked to the activation of a specific transcription factor in this context. Among those we have identified (**Figure 6F**), it is known

that E2F-1 is normally sequestered by retinoblastoma protein (Rb). In the presence of glucose, E2F-1/pRB axis is more active, leading to release of E2F-1 and transcription of its targets [46]. Of note, we have been able to demonstrate that OXPHOS promotes IFN- $\beta$  production, in contrast to glycolysis, leading to a more efficient production of antiviral effectors. Although viperin gene expression is not affected by OXPHOS inhibition (**Figure 4**), its protein expression appears to be affected (**Figure 5**). Future studies should attempt to shed light on this finding, which may simply be linked to a rotenone effect. Finally, we also found that inhibition of OXPHOS by rotenone did not necessarily result in complete abolition of the expression of OXPHOS-dependent ISGs (**Figures 4 and 5**). This may be due to the fact that the use of rotenone does not result in suppression of mROS induction, since rotenone is sometimes used to induce their induction to a lesser extent [47].

In the light of our initial results, it might be possible to argue that the glutamine addiction discussed in the literature initially seems to go to the host cell, since it produces more antiviral effectors in the presence of L-glutamine. However, since some antiviral effectors can overcome this dependence, it seems that glutamine is more essential to the virus for its progeny [28]. This suggests an adaptive mechanism whereby, to counteract the virus-induced metabolic reprogramming that undermines the antiviral response carried out by ISGs (12, 15, 54 and 56), the host cell has found a way to promote the production of other effectors such as viperin and OAS1. We could be in a frenetic adaptive race in which the cellular metabolic status is of prime importance. These results are encouraging and suggest that the study of glutaminergic metabolism could be an interesting way of approaching the control of a viral infection, and thus exploring possible therapeutic or preventive opportunities. However, these data still need to be consolidated in the case of a real viral infection, especially using viruses of current medical importance, in order to decipher the contribution of L-glutamine and OXPHOS in this case.

#### **Author Contributions**

Investigation, resources, data curation, G.L., M.H., A.P.R., D.E.S, P.K.-T. and W.V.; writing—original draft preparation, G.L.; writing—review and editing, G.L., M.H., D.E.S, A.P.R., O.M., P.K.-T., M.R. and W.V.; Methodology, G.L. and W.V.; formal analysis, G.L. and W.V.; supervision, W.V.; Conceptualization, G.L., O.M., and W.V.; funding acquisition, G.L., M.R. and W.V.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### **Acknowledgments**

We would like to thank all our colleagues from PIMIT and DÉTROI and especially the Dr. Pascal Baret for his thankful help during this work. Graphical abstract was created using Biorender.com.

#### **Funding**

This research was funded by the CASI project (supported by BioST federation of Université de La Réunion). G.L., D.E.S and A.P.R. have PhD degree scholarship from Réunion University (Ecole doctorale STS) funded by DIREN/2021-0161, DIREN/2021-1115 and DIREN/2021-1124 from Région Réunion, respectively. We want to acknowledge the Dr. Philippe Desprès for his thoughtful advices.

#### **Informed Consent Statement**

Not applicable.

#### **Data Availability Statement**

The data presented in this study are available on request.

#### **Conflicts of Interest**



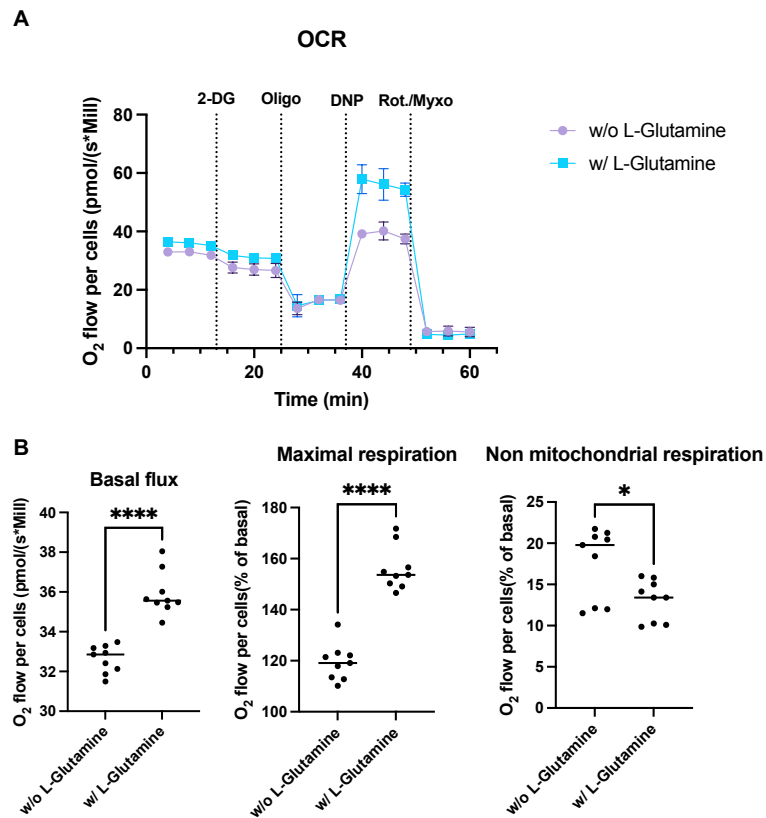
The authors declare no conflict of interest.

## References

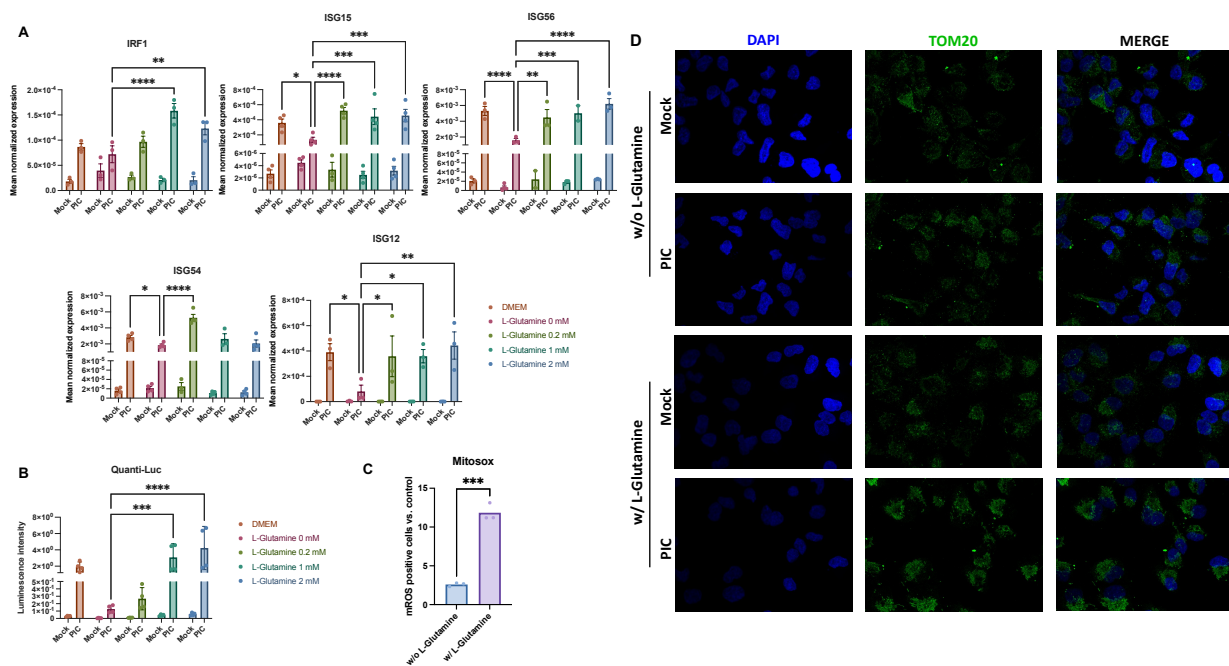
- [1] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>.
- [2] Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009;360:2605–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903810>.
- [3] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012;367:1814–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>.
- [4] Baize S, Pannetier D, Oestereich L, Rieger T, Koivogui L, Magassouba N, et al. Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea. *New England Journal of Medicine* 2014;371:1418–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1404505>.
- [5] Faria NR, Azevedo R do S da S, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* 2016;352:345–9. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5036>.
- [6] Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579:270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- [7] Thornhill JP, Barkati S, Walmsley S, Rockstroh J, Antinori A, Harrison LB, et al. Monkeypox Virus Infection in Humans across 16 Countries — April–June 2022. *New England Journal of Medicine* 2022;0:null. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2207323>.
- [8] Majzoub K, Wrensch F, Baumert TF. The Innate Antiviral Response in Animals: An Evolutionary Perspective from Flagellates to Humans. *Viruses* 2019;11:758. <https://doi.org/10.3390/v11080758>.
- [9] Chow KT, Gale M, Loo Y-M. RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annu Rev Immunol* 2018;36:667–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053309>.
- [10] Motwani M, Pesiridis S, Fitzgerald KA. DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease. *Nat Rev Genet* 2019;20:657–74. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0151-1>.
- [11] Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol* 2019;6:567–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>.
- [12] Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol* 2014;32:513–45. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>.
- [13] Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee ASY, Odendall C, Shum B, et al. Peroxisomes Are Signaling Platforms for Antiviral Innate Immunity. *Cell* 2010;141:668–81. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.018>.
- [14] Odendall C, Dixit E, Stavru F, Bierne H, Franz KM, Durbin AF, et al. Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol* 2014;15:717–26. <https://doi.org/10.1038/ni.2915>.
- [15] Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology* 2011;1:519–25. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008>.
- [16] McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O’Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2015;15:87–103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>.
- [17] Beyer DK, Forero A. Mechanisms of Antiviral Immune Evasion of SARS-CoV-2. *Journal of Molecular Biology* 2022;434:167265. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167265>.
- [18] Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167–72. <https://doi.org/10.1038/nature04193>.
- [19] Mesev EV, LeDesma RA, Ploss A. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat Microbiol* 2019;4:914–24. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0421-x>.
- [20] Loftus RM, Finlay DK. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *Journal of Biological Chemistry* 2016;291:1–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.693903>.
- [21] Thaker SK, Ch’ng J, Christofk HR. Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biology* 2019;17:59. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0678-9>.
- [22] Lebeau G, El Safadi D, Paulo-Ramos A, Hoareau M, Desprès P, Krejbich-Trotot P, et al. The Efficient Antiviral Response of A549 Cells Is Enhanced When Mitochondrial Respiration Is Promoted. *Pathogens* 2022;11:1168. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101168>.
- [23] Buskiewicz IA, Montgomery T, Yasewicz EC, Huber SA, Murphy MP, Hartley RC, et al. Reactive oxygen species induce virus-independent MAVS oligomerization in systemic lupus erythematosus. *Sci Signal* 2016;9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf1933>.
- [24] Angin M, Volant S, Passaes C, Lecroux C, Monceaux V, Dillies M-A, et al. Metabolic plasticity of HIV-specific CD8 + T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection. *Nature Metabolism* 2019;1:704–16. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0081-4>.
- [25] Chatel-Chaix L, Cortese M, Romero-Brey I, Bender S, Neufeldt CJ, Fischl W, et al. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host & Microbe* 2016;20:342–56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.008>.
- [26] Carneiro L, Guissard C, Offer G, Belenguer P, Pénicaud L, Leloup C. The mitochondrial fission induced by glucose is essential to the ROS signaling in hypothalamic detection of hyperglycemia. *Diabetes & Metabolism* 2010;36:A38. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(10\)70145-2](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(10)70145-2).
- [27] Zhang W, Wang G, Xu Z-G, Tu H, Hu F, Dai J, et al. Lactate Is a Natural Suppressor of RLR Signaling by Targeting MAVS. *Cell* 2019;178:176–189.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.003>.
- [28] Koufaris C, Nicolaidou V. Glutamine addiction in virus-infected mammalian cells: A target of the innate immune system?

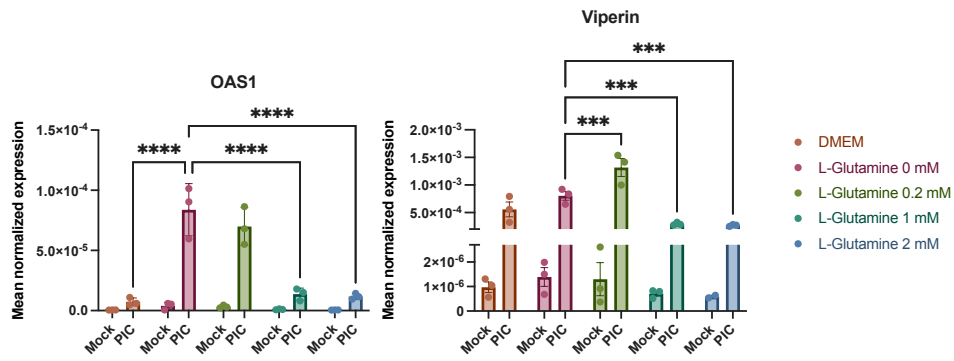
- Med Hypotheses 2021;153:110620. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110620>.
- [29] Shiratori R, Furuichi K, Yamaguchi M, Miyazaki N, Aoki H, Chibana H, et al. Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Sci Rep* 2019;9:18699. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55296-3>.
- [30] Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008;3:1125–31. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>.
- [31] Yang Y, Zhang G, Yang T, Gan J, Xu L, Yang H. A flow-cytometry-based protocol for detection of mitochondrial ROS production under hypoxia. *STAR Protocols* 2021;2:100466. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100466>.
- [32] Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Albà MM. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 2002;18:333–4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.2.333>.
- [33] Farré D, Roset R, Huerta M, Adsua JE, Roselló L, Albà MM, et al. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research* 2003;31:3651–3. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg605>.
- [34] Martin FJ, Amode MR, Aneja A, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barnes I, et al. Ensembl 2023. *Nucleic Acids Research* 2023;51:D933–41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac958>.
- [35] Heberle H, Meirelles GV, Da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 2015;16:169. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>.
- [36] Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8459–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603082103>.
- [37] Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005;23:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.010>.
- [38] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews* 2014;94:909–50. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>.
- [39] Nobre L, Wise D, Ron D, Volmer R. Modulation of Innate Immune Signalling by Lipid-Mediated MAVS Transmembrane Domain Oligomerization. *PLoS ONE* 2015;10:e0136883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136883>.
- [40] Heinz S, Freyberger A, Lawrenz B, Schladt L, Schmuck G, Ellinger-Ziegelbauer H. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Sci Rep* 2017;7:45465. <https://doi.org/10.1038/srep45465>.
- [41] Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem* 1957;224:963–9.
- [42] Kambara H, Niazi F, Kostadinova L, Moonka DK, Siegel CT, Post AB, et al. Negative regulation of the interferon response by an interferon-induced long non-coding RNA. *Nucleic Acids Research* 2014;42:10668–80. <https://doi.org/10.1093/nar/gku713>.
- [43] Fontaine KA, Sanchez EL, Camarda R, Lagunoff M. Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. *Journal of Virology* 2015;89:2358–66. <https://doi.org/10.1128/JVI.02309-14>.
- [44] Valle-Casuso JC, Angin M, Volant S, Passaes C, Monceaux V, Mikhailova A, et al. Cellular Metabolism Is a Major Determinant of HIV-1 Reservoir Seeding in CD4+ T Cells and Offers an Opportunity to Tackle Infection. *Cell Metabolism* 2019;29:611–626.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.015>.
- [45] Reslan A, Haddad JG, Desprès P, Bascands J-L, Gadea G. High Glucose Induces in HK2 Kidney Cells an IFN-Dependent ZIKV Antiviral Status Fueled by Viperin. *Biomedicines* 2022;10:1577. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071577>.
- [46] Almacellas E, Pelletier J, Manzano A, Gentilella A, Ambrosio S, Mauvezin C, et al. Phosphofructokinases Axis Controls Glucose-Dependent mTORC1 Activation Driven by E2F1. *IScience* 2019;20:434–48. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.09.040>.
- [47] Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, et al. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:8516–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210432200>.

Figures

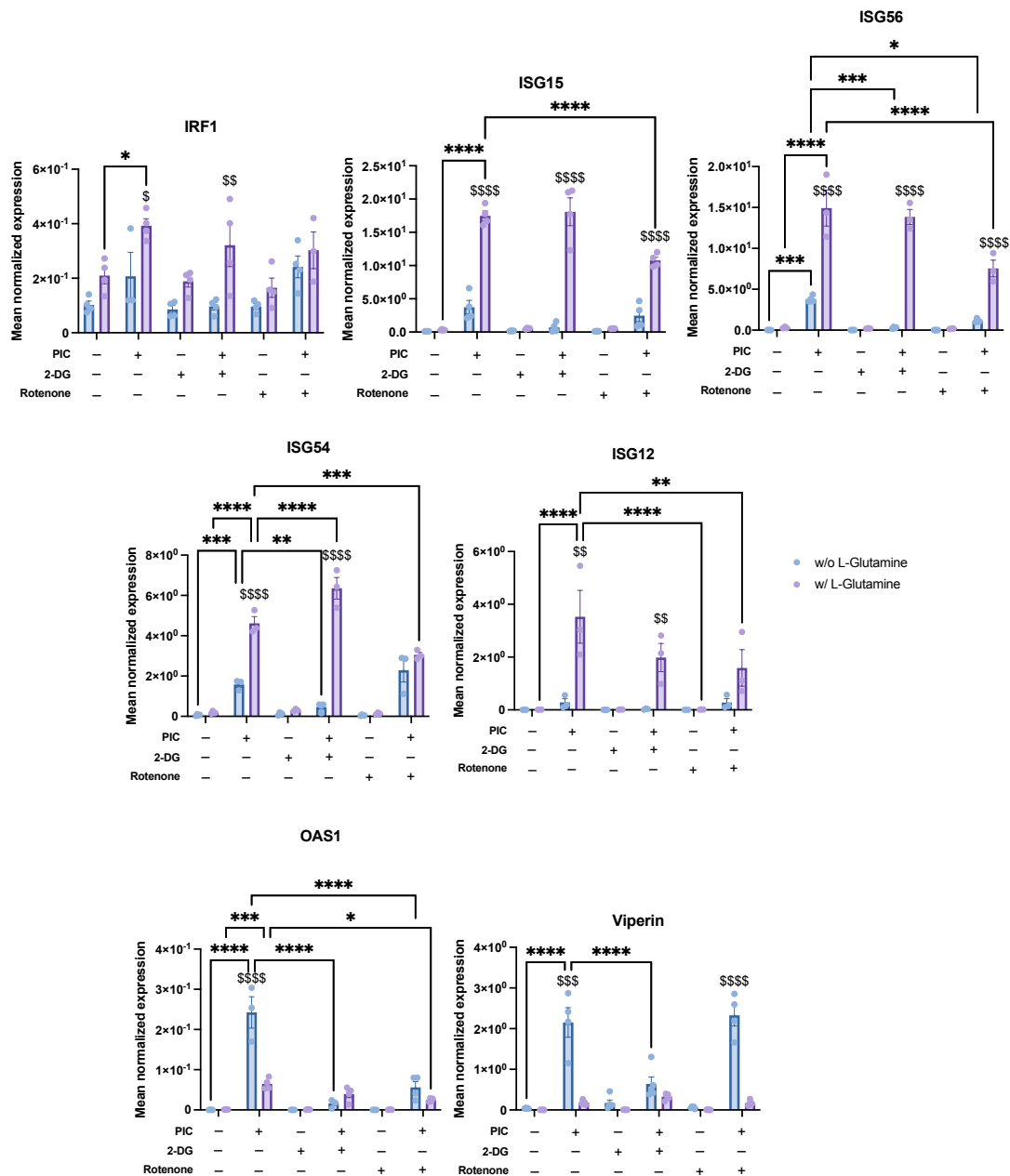


**Figure 1 – OXPHOS is associated with L-glutamine-containing medium.** (A) Comparison of the oxygen consumption rate of A549<sup>Dual</sup> cultured with or without L-glutamine. 5 mM 2-deoxyglucose (2-DG) has been used to inhibit hexokinase activity and glycolysis. 1  $\mu$ M oligomycin (Oligo) has been used to inhibit ATP synthase. 100  $\mu$ M 2,4-dinitrophenol (DNP) has been used as protonophoric uncoupler, allowing maximal respiration. 1  $\mu$ M Rotenone – 1  $\mu$ M Myxothiazol has been used to uncouple both mitochondrial complex I and III, illustrating non mitochondrial respiration. The metabolism of cells grown in RPMI supplemented with 2 mM L-glutamine is more dependent on oxidative phosphorylation. (B) More specifically, cells cultured with L-glutamine have higher basal O<sub>2</sub> consumption flux, associated with higher maximal respiration capacity and consistently lower non mitochondrial respiration. Error bars represent standard errors of three independent experiments. \* $p < 0.0332$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

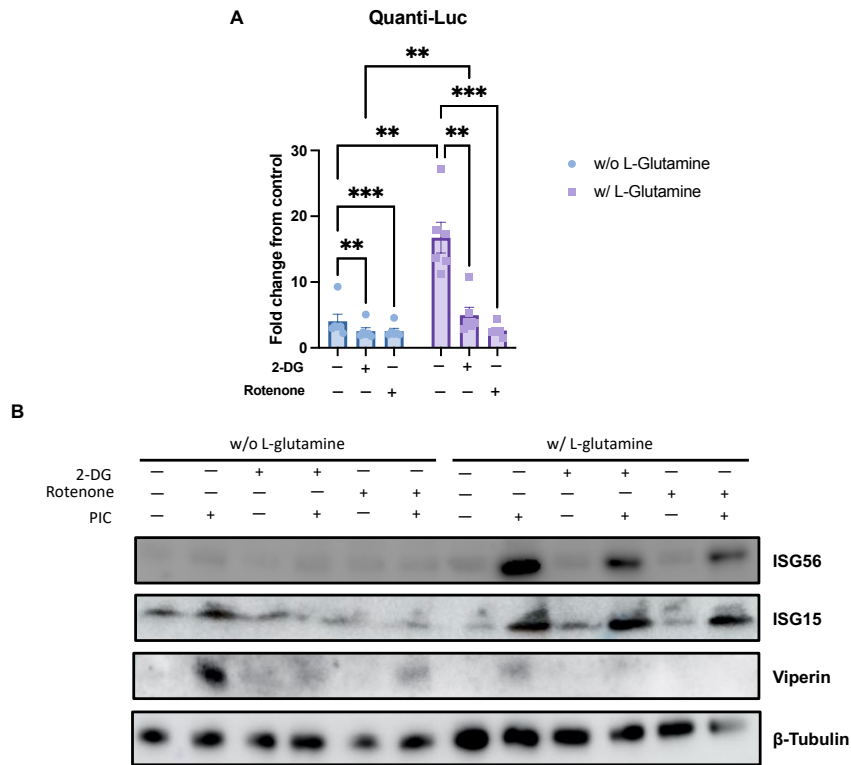




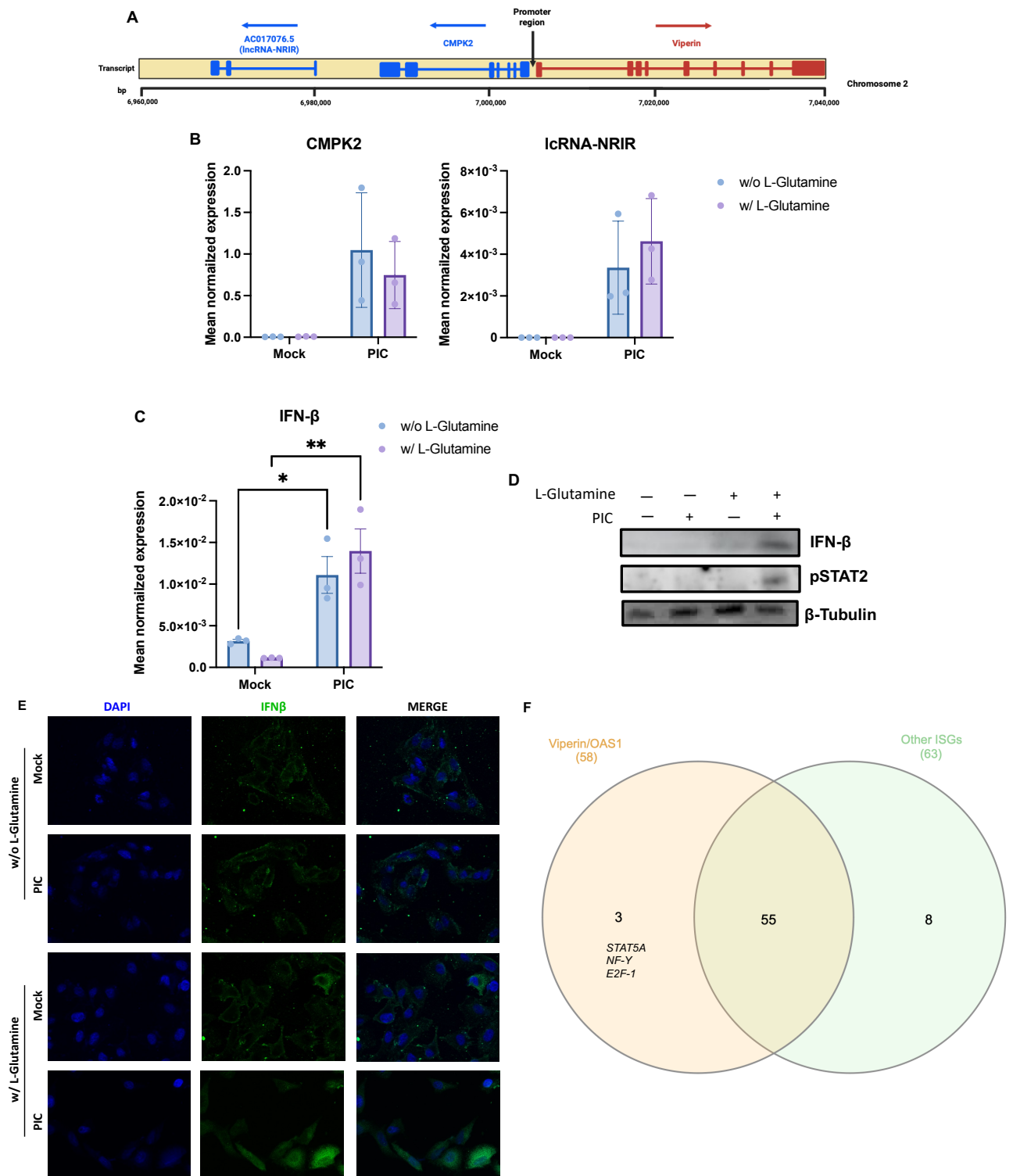
**Figure 3 – Expression of OAS1 and viperin are independent L-glutamine.** Expression of OAS1 and viperin was assessed by RT-qPCR following a 24-hour stimulation of A549<sup>Dual</sup>, grown in RPMI 2 g·L<sup>-1</sup> glucose, supplemented with increasing doses of L-glutamine (0, 0.2, 1 and 2 mM), using PIC 0.25 µg·mL<sup>-1</sup>. Results are expressed as mean normalized expression, following normalization with expression of 18S ribosomal RNA as a housekeeping gene. Error bars represent standard errors of three independent experiments. \*\*\* p<0.0002, \*\*\*\* p<0.0001.



**Figure 4 – Bivalent expression of ISGs is based on glycolysis and OXPHOS.** Expression of several ISGs (IRF1, ISG15, ISG56, ISG54, ISG12, OAS1 and viperin) have been assessed by RT-qPCR following a 24-hour stimulation of A549<sup>Dual</sup>, grown in RPMI 2 g·L<sup>-1</sup> glucose, supplemented or not with 2 mM L-glutamine, using PIC 0.25 µg·mL<sup>-1</sup>. Simultaneously, to evaluate the influence of glycolysis and OXPHOS on the upregulation of ISGs regarding L-glutamine supplementation, 5 mM 2-deoxyglucose (2-DG) and 1 µg·mL<sup>-1</sup> were used to inhibit glycolysis and OXPHOS respectively. Results are expressed as mean normalized expression, following normalization with expression of RNA polymerase II RNA as a housekeeping gene. The error bars represent standard errors of three independent experiments. \*p<0.0332; \*\* p<0.0021; \*\*\* p<0.0002; \*\*\*\* p<0.0001 as compared to PIC. \$ p<0.0332; \$\$ p<0.0021; \$\$\$ p<0.0002; \$\$\$\$ p<0.0001 comparison between without L-glutamine vs. with L-glutamine.



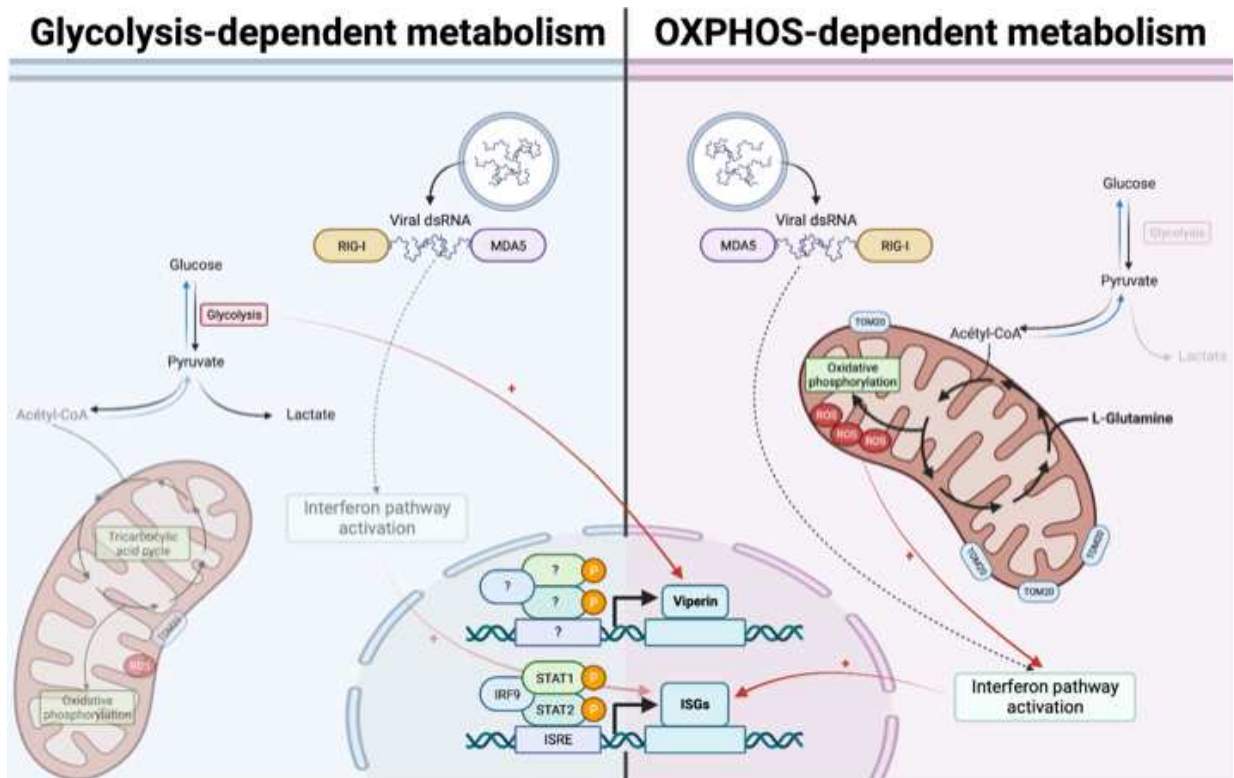
**Figure 5 – Bivalent ISG production depends on glycolysis or OXPHOS.** (A) ISRE-dependent proteins increased production in presence of L-glutamine is linked to OXPHOS. Evaluation of IRF pathway activation in response to PIC  $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  stimulation of A549<sup>Dual</sup> grown in RPMI  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose, supplemented or not with 2 mM L-glutamine, was achieved by measuring activity of secreted Lucia luciferase, using QUANTI-Luc substrate 24 hours after treatment. Concomitantly, to assess the influence of glycolysis and OXPHOS on the upregulation of ISGs with respect to L-glutamine supplementation, 5 mM 2-deoxyglucose (2-DG) and  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  were used to inhibit glycolysis and OXPHOS. Results are expressed as emitted luminescence intensity. Error bars represent standard errors from three independent experiments. \*\*  $p < 0.0021$ ; \*\*\*  $p < 0.0002$ . (B) Bivalent production of ISGs relies on either glycolysis or OXPHOS. ISGs production in response to PIC  $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  stimulation of A549<sup>Dual</sup> grown in RPMI  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose, supplemented or not with 2 mM L-glutamine, was achieved by western blot analysis. Western blot assay was achieved with mouse anti-ISG56, rabbit anti-ISG15, mouse anti-viperin and rabbit anti- $\beta$ -tubulin antibodies. These images are representative of three independent experiments.



**Figure 6 – Differential expression of ISGs correlates with variable IFN-β signaling.** (A) Schematic representation of viperin, CMPK2 and lcr-NRIR loci on chromosome 2. Exon/intron structure of genes is represented, promoter region is annotated and arrows indicate the orientation of transcription for each locus. (B) CMPK2 and lcr-NRIR are expressed in the same manner under glycolytic and OXPHOS conditions. The expression of CMPK2 and lcr-NRIR has been assessed by RT-qPCR after 24-hour stimulation of A549<sup>Dual</sup>, grown in RPMI 2 g·L<sup>-1</sup> glucose, supplemented or not 2 mM L-glutamine, using PIC 0.25 μg·mL<sup>-1</sup>. Results are expressed as mean normalized expression, following normalization with expression of RNA polymerase II RNA as a housekeeping gene. (C) IFN-β mRNA has the same level of expression under glycolytic and OXPHOS conditions. The expression of IFN-β has been assessed by RT-qPCR after 6-hour stimulation of A549<sup>Dual</sup>, grown in RPMI 2 g·L<sup>-1</sup> glucose, supplemented or not with 2 mM L-glutamine, using PIC 0.25 μg·mL<sup>-1</sup>. Results are expressed as mean normalized expression, following normalization with

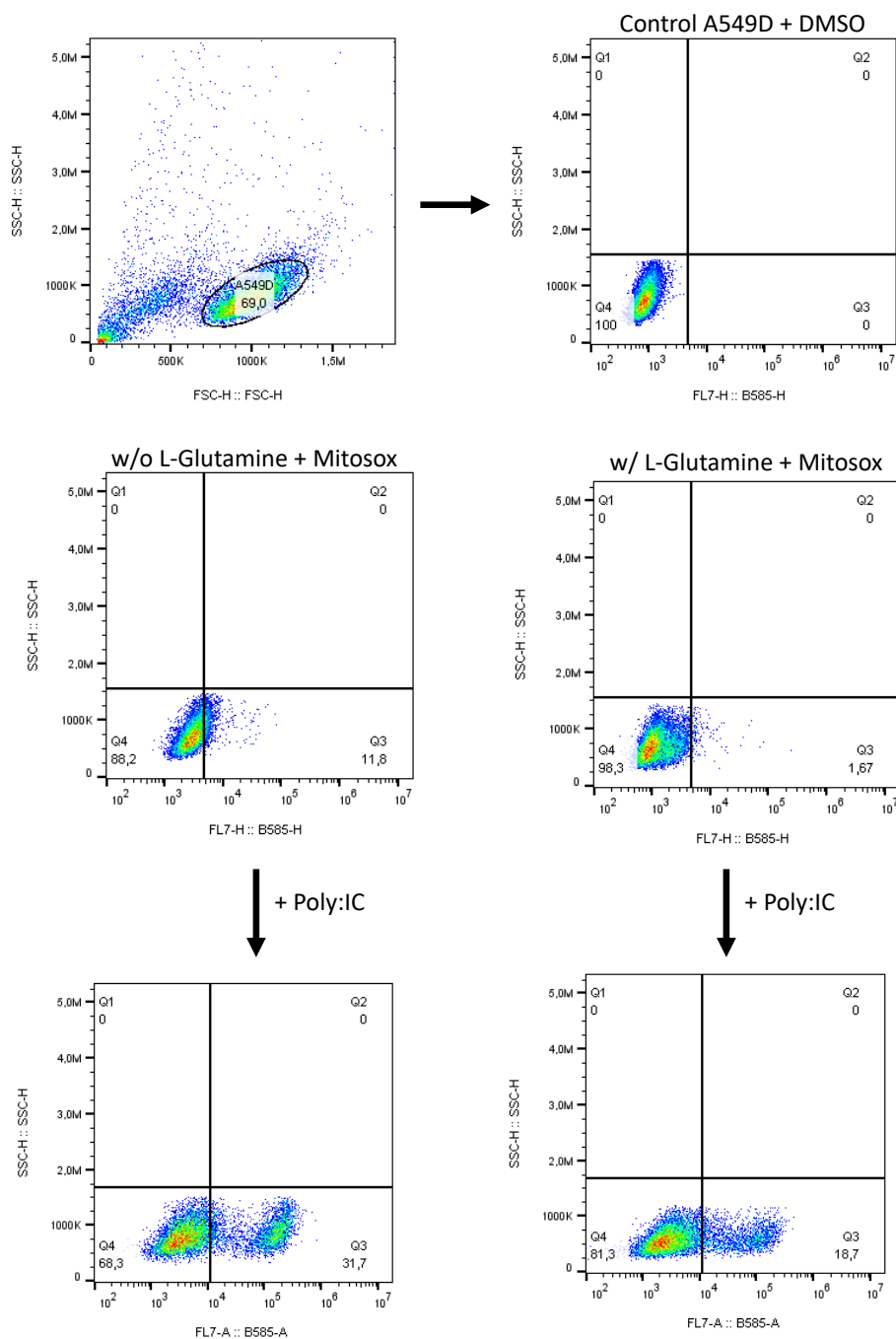


expression of RNA polymerase II RNA as a housekeeping gene. Error bars represent standard errors from three independent experiments. \*  $p < 0.0332$ ; \*\*  $p < 0.0021$ . (D, E) Alternative ISGs expression is related to IFN- $\beta$  production and signaling. IFN- $\beta$  production and phosphorylation of STAT2 in response to PIC stimulation of A549<sup>Dual</sup> grown in RPMI 2 g·L<sup>-1</sup> glucose, supplemented or not with 2 mM L-glutamine, was achieved by western blot analysis and immunofluorescence. Western blot assay was achieved with mouse anti-IFN- $\beta$ , rabbit anti-pSTAT2, and rabbit anti- $\beta$ -tubulin antibodies. Immunofluorescence assay was achieved using mouse anti-IFN- $\beta$ , donkey anti-mouse Alexa 488 and DAPI. These images are representative of three independent experiments. (F) Overexpression of viperin and OAS1 could be related to specific transcription factors activation under glycolytic condition. On one hand, we compared the promoter region, of viperin and OAS1 and on the other hand the promoter region of ISG12, ISG15 and ISG54, using PROMO tool based on TRANSFAC 8.3, looking for potential transcription factor binding sites. As represented, we determine three potential transcription factors that are specific for viperin and OAS1: STAT5A, NF-Y and E2F-1.

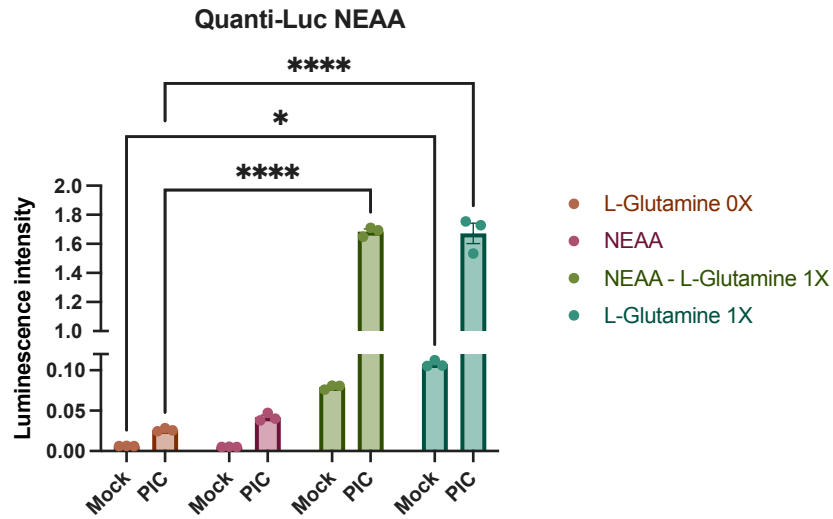


**Figure 7 – Bidirectional ISGs expression is based on differential metabolic states.** In cells relying on OXPHOS, antiviral response mounting is related to more functional mitochondria, leading to higher expression of ISGs. On the contrary, in cells relying on glycolysis, less efficient interferon signaling is associated with less functional mitochondria and consequently lower ISGs expression. Viperin and OAS1 escape this process and are more expressed in glycolysis-dependent cells, independently from interferon  $\beta$ .

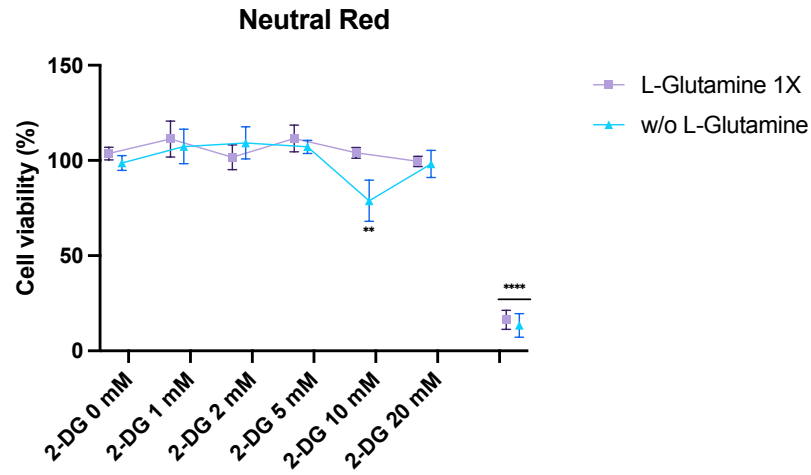
## Supplementary material



**Figure S1 – Gating strategy for flow cytometry-based MitoSOX™ Red assay.** Living A549<sup>Dual</sup> were stained with MitoSOX™ Red at a final concentration of 5  $\mu\text{M}$ , after a stimulation of 6 hour with PIC 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Cells were gated by using forward scatter versus side scatter and mitochondrial ROS induction was assessed based on positive signal in PE channel.



**Figure S2 – Antiviral response upregulation is independent of non-essential amino acids.** Evaluation of IRF pathway activation in response to PIC 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  stimulation of A549<sup>Dual</sup> grown in RPMI 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose supplemented with either or both non-essential amino acids – NEAA and 2 mM L-glutamine, was achieved by measuring activity of secreted Lucia luciferase, using QUANTI-Luc substrate 24 hours after treatment. Results are expressed as emitted luminescence intensity. Error bars represent standard errors of three independent experiments. \* $p < 0.0332$ ; \*\*  $p < 0.0021$ ; \*\*\*  $p < 0.0002$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

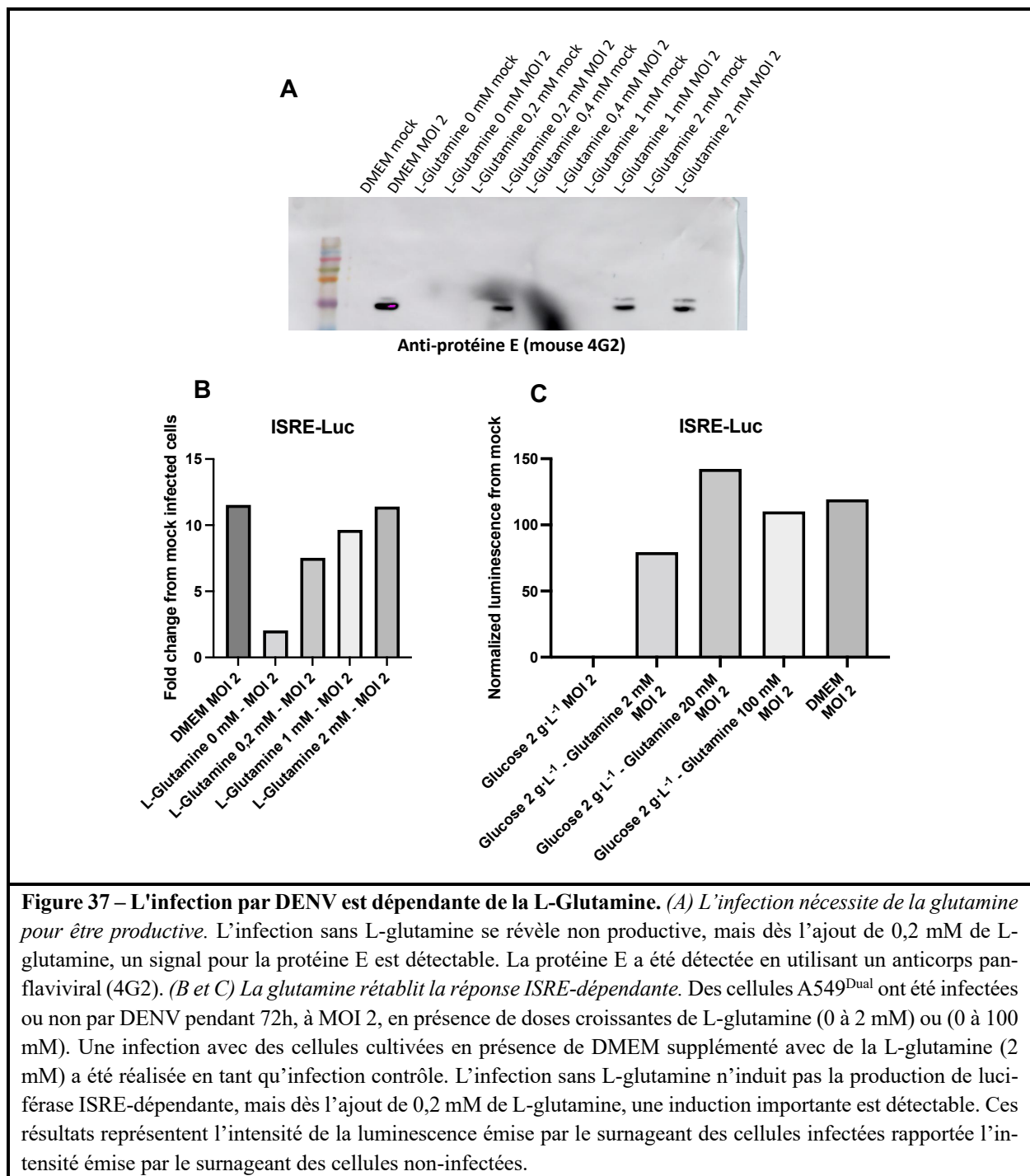


**Figure S3 – 2-deoxyglucose exerts no cytotoxic effect.** We treated A549<sup>Dual</sup> with 2-deoxyglucose with concentrations ranging from 1 mM to 20 mM for 24 hours. We then evaluated the impact of these different concentrations on cell viability by neutral red assay.

### III.1.ii.c. Discussion de l'article 2

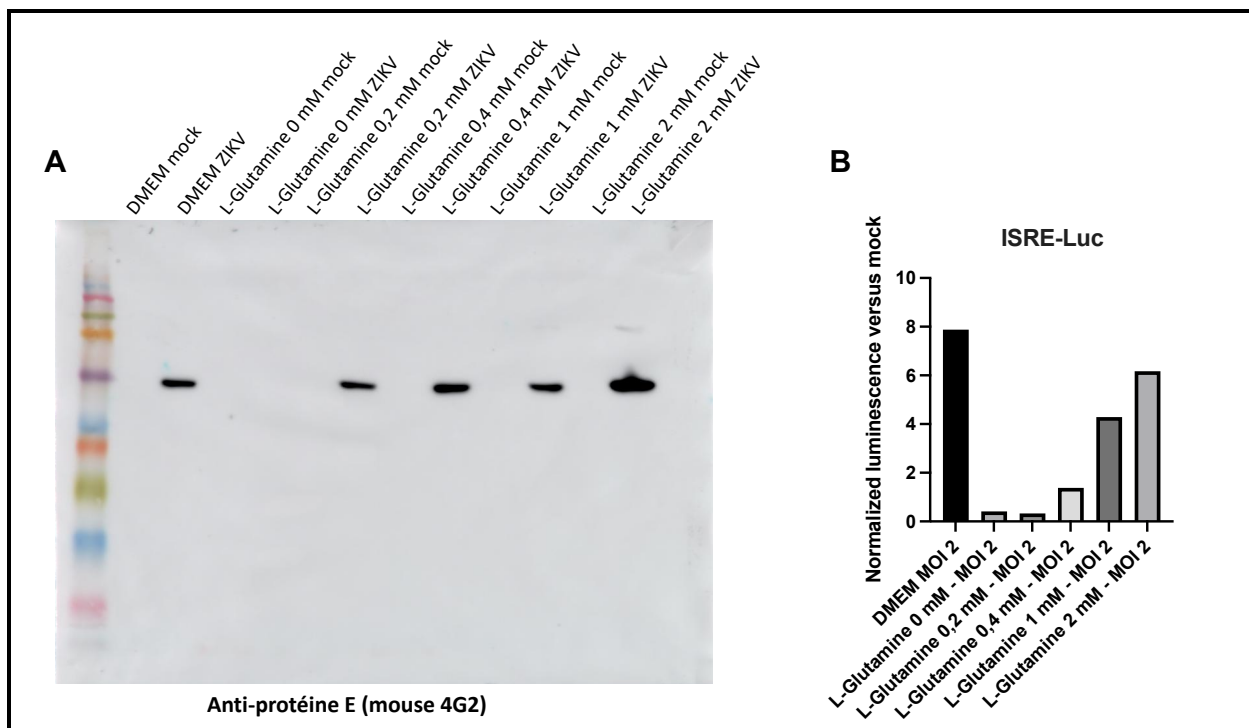
Les résultats compilés ici sous la forme d'une publication me semblent importants. En effet, ils nous permettent de concilier les résultats que nous avons obtenu initialement avec les résultats parus sur la vipérine. Oui, sous un certain angle nous avons raison, la phosphorylation oxydative, ici alimentée par la glutamine, est essentielle à la production d'effecteurs antiviraux. Et oui, nos collègues avaient également une approche intéressante quant à l'étude de la vipérine (Reslan et al., 2022). La production de vipérine (et de certaines ISGs) est augmentée par la glycolyse (Reslan et al., 2022). Et d'ailleurs, il est déjà établi que la vipérine régule à la hausse la glycolyse, elle favoriserait de ce fait sa propre expression et donc son activité antivirale (Choi et al., 2022). Ces travaux nous rappellent que les résultats que nous obtenons doivent être considérés avec précaution, et que la mise en place de modèles adéquats peut permettre de lever certaines ambiguïtés. En effet, ici nous avons mis en avant que la production des effecteurs antiviraux reposait en réalité sur un mécanisme bivalent, qui dépend du métabolisme cellulaire ayant cours au moment de la mise en place de la réponse antivirale. Ainsi, certains effecteurs, comme IFIT1/ISG56 ou IFIT2/ISG54, sont produits en réponse à l'IFN- $\beta$  et à la voie de signalisation JAK / STAT, lorsque la phosphorylation oxydative est active. Alors que d'autres, telles que la vipérine et OAS1, se reposent sur la glycolyse pour être exprimés. Selon nous, la mise au jour d'un tel mode d'expression est un exemple supplémentaire de la course évolutive, théorisée en tant que *'red queen effect'*, et ayant lieu entre les virus et l'hôte infecté (Tenthorey et al., 2022; Van Valen, 1973). En effet, si la phosphorylation oxydative se retrouve limitée lors de l'infection, au profit de la glycolyse, la production des ISGs dépendante de cette voie s'en trouvera réduite. La cellule semble avoir réussi à contourner cette situation en favorisant l'expression de certaines ISGs plutôt en réponse à la glycolyse, permettant quoiqu'il advienne de lutter contre le pathogène. Il faut tout de même tempérer ces propos en rappelant que les virus ont montré à plusieurs reprises la capacité de réguler l'activité d'effecteurs antiviraux, et ce

quel que soit l'état métabolique de la cellule (*I.2.v.c. Reprogrammation métabolique par les virus et évasion immune associée*).



La poursuite de mes travaux a consisté à infecter les A549<sup>Dual</sup> cultivées ou non avec de la L-glutamine. Cette fois-ci, l'infection s'est montrée fructueuse, comme l'illustre la détection de la protéine E en immunoblot, et nous avons d'ailleurs noté plusieurs faits intéressants. Nous aurions pu nous attendre à une infection plus productive en fonction de la dose de L-glutamine

que nous ajoutons, cependant cela n'a pas été le cas, le signal retrouvé pour la protéine E semblant similaire entre la condition avec 0,2 mM de L-glutamine et 2 mM de L-glutamine, 72 heures post-infection (**Figure 37A**). C'est en revanche la mise en place de la réponse IFN qui semble dépendre de la glutamine puisque la luminescence émise via le système ISRE-Luc augmente entre la condition 0,2 mM et 2 mM de L-glutamine (**Figure 37B**). Il semble même qu'il soit possible de potentialiser encore la production des effecteurs antiviraux en augmentant la concentration de la L-glutamine à des doses supérieures à celles utilisées couramment. En effet, en passant la concentration de 2 mM à 20 mM de L-glutamine, la réponse cellulaire face à l'infection virale se trouvait encore améliorée (**Figure 37C**).



**Figure 38 – L'infection par ZIKV est également dépendante de la L-Glutamine.** (A) L'infection par ZIKV est dépendante d'un apport de glutamine exogène. Des cellules A549<sup>Dual</sup> ont été infectées ou non par ZIKV pendant 48h, à MOI 2, en présence de doses croissantes de L-glutamine (0 à 2 mM). Une infection avec des cellules cultivées en présence de DMEM supplémenté avec de la L-glutamine (2 mM) a été réalisée en tant qu'infection contrôle. L'infection sans L-glutamine se révèle non productive, mais dès l'ajout de 0,2 mM de L-glutamine, un signal pour la protéine E est détectable. La protéine E a été détectée en utilisant un anticorps panflaviviral (4G2). (B) La réponse ISRE est également dépendante de la L-glutamine. La mise en place de la réponse antivirale a été évaluée post-infection en mesurant l'activité luciférase dans le surnageant des cellules infectées. La luciférase est sécrétée à des taux importants dès l'ajout de 1 mM de L-glutamine, illustrant une dépendance plus importante de la réponse antivirale impliquant ISRE, vis-à-vis de la L-glutamine. Ces résultats représentent l'intensité de la luminescence émise par le surnageant des cellules infectées rapportée l'intensité émise par le surnageant des cellules non-infectées.



Nous avons décidé de confirmer ces résultats en réalisant une infection par le virus Zika. Comme précédemment, nous avons observé une infection productive dès 0,2 mM de L-glutamine, sans augmentation importante de la progénie en fonction de la concentration (**Figure 38A**). Là encore, la production des effecteurs antiviraux s'est montrée sensible à la glutamine, avec une émission de luminescence qui atteint un niveau conséquent à partir de 1 mM de glutamine (**Figure 38B**). Même si ces données sont encore préliminaires, elles nous permettent d'émettre plusieurs hypothèses quant à la régulation de la réponse IFN par la L-glutamine en condition d'infection virale. Il est en effet possible qu'à faible concentration de L-glutamine, la réponse IFN soit jugulée par les capacités inhibitrices du virus, qui se retrouvent dépassées à une concentration plus élevée. Toutefois, il semble plus probable qu'à faible concentration le pool de L-glutamine soit prioritairement redirigé en tant que biomasse pour la progénie virale, plutôt qu'en tant que substrat pour le métabolisme oxydatif et donc pour la mise en place de la réponse IFN.

Ces données nous permettent de répondre à la question de l'addiction à la L-glutamine. En effet, compte tenu de nos résultats, on pourrait considérer que la réponse antivirale nécessite une concentration de L-glutamine plus importante pour être effective. Cependant, si on garde en mémoire la capacité de la cellule hôte infectée à produire certains effecteurs, comme la viperine ou OAS1, indépendamment de la phosphorylation oxydative et de la disponibilité de L-glutamine, il semble que ce soit plutôt le virus qui présente une addiction à la L-glutamine. En effet, que ce soit le virus de la Dengue ou le virus Zika, l'infection nécessite un seuil limite de 0,2 mM de L-glutamine exogène afin d'être productive.

**PARTIE II :**  
**Le métabolisme oxydatif est régulé lors de  
l'infection par le virus Zika**

## III.2. Le métabolisme oxydatif est régulé lors de l'infection par le virus Zika

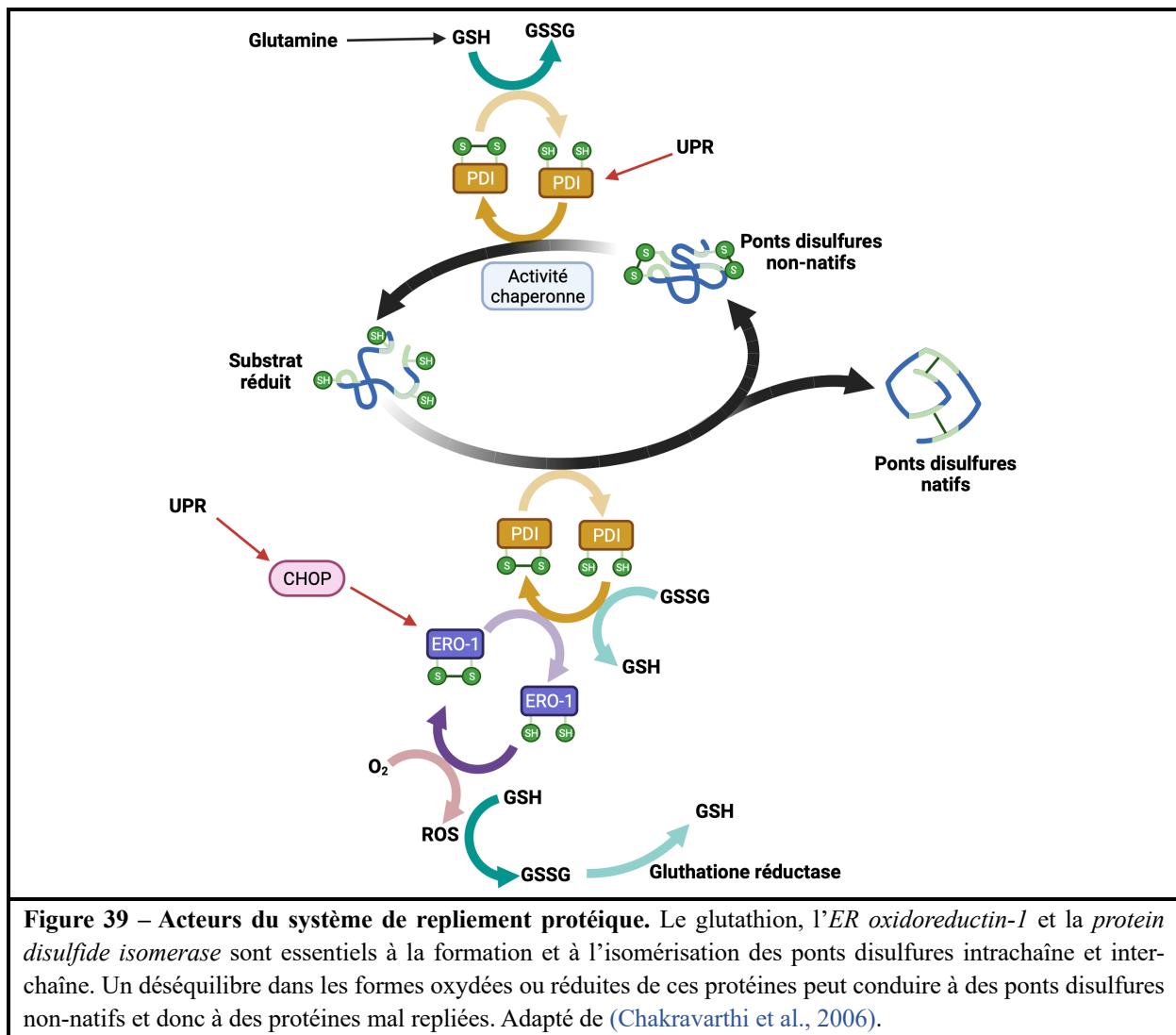
### III.2.i. Le déséquilibre de la balance rédox lors de l'infection par ZIKV est lié à la formation d'agrégats (Article 3)

#### III.2.i.a. Introduction

L'infection par les *Flavivirus* est notoirement connue pour causer une surcharge du réticulum endoplasmique, de par l'affluence massive des protéines virales dans ce compartiment cellulaire (Blázquez et al., 2014). Le RE est l'organite essentiel au repliement des protéines cellulaires de la voie de sécrétion et à leur modification post-traductionnelle. La surcharge intervenant lors de l'infection altère ces fonctions physiologiques, conduisant à l'accumulation de protéines mal repliées et de ce fait à un stress du RE (Blázquez et al., 2014). Le stress du RE est un signal cellulaire pouvant conduire à la mort par apoptose. L'intégration de ce signal se fait par la réponse aux protéines mal repliées (*Unfolded Protein Response*, UPR), qui a pour objectif de résoudre le stress du RE et d'induire l'apoptose, si cela n'est pas possible (Fribley et al., 2009). Les tentatives de résolution consistant à produire des protéines chaperonnes pour aider au repliement des protéines, et à réduire de manière importante la traduction, ce qui pourrait avoir un impact majeur sur la progénie virale. Lors de travaux précédents au laboratoire, nous avons montré que ZIKV était capable de saboter cette réponse cellulaire au travers de l'inhibition de l'activité d'ATF6 et CHOP, deux régulateurs de l'UPR (Turpin et al., 2020, 2021). L'inhibition de ces voies participe au maintien du stress du RE, mais surtout limite la mort associée à ce stress qui serait délétère pour l'infection.

L'avancée de nos travaux sur les relations entre métabolisme oxydatif et infection par les *Flavivirus* nous ont fait nous questionner sur la portée que pouvait avoir des modifications de ce métabolisme sur l'homéostasie cellulaire, notamment concernant le statut oxydo-réducteur des cellules infectées. La fonction du réticulum endoplasmique repose sur un environnement oxydatif finement régulé, qui permet le repliement des protéines via la formation de ponts

disulfures (Chakravarthi et al., 2006). La formation et l'isomérisation des ponts disulfures est un processus réversible assuré par des réactions oxydo-réductrices successives qui impliquent plusieurs acteurs, dont l'*ER oxidoreductin-1* (ERO-1), la *protein disulfide isomerase* (PDI) et le glutathion réduit (GSH) (Chakravarthi et al., 2006) (Figure 39). Un déséquilibre entre les formes réduites et oxydées de ces acteurs peut être la source de la formation de ponts disulfures non-natifs, participant à l'accumulation de protéines mal repliées et donc au stress du RE.



**Figure 39 – Acteurs du système de repliement protéique.** Le glutathion, l'*ER oxidoreductin-1* et la *protein disulfide isomerase* sont essentiels à la formation et à l'isomérisation des ponts disulfures intrachaine et interchaîne. Un déséquilibre dans les formes oxydées ou réduites de ces protéines peut conduire à des ponts disulfures non-natifs et donc à des protéines mal repliées. Adapté de (Chakravarthi et al., 2006).

Or, il est établi que la glutamine participe à la formation de GSH et donc au maintien de l'équilibre entre les formes réduites et oxydées du glutathion. Cependant, le détournement de la glutamine pour la progénie virale pourrait être la cause d'un déficit en GSH et donc induire un déséquilibre de la balance rédox de la cellule, en faveur du glutathion oxydé (GSSG). Partant

de ce constat, nous nous sommes demandés si un défaut de la balance oxydo-réductrice ne pourrait pas être à l'origine de formes protéiques mal repliées et donc au stress du RE retrouvé lors de l'infection par ZIKV.

Comme nous le supposions, lors de l'infection par le virus Zika, nous avons retrouvé une diminution importante du ratio GSH/GSSG, illustrant donc une proportion plus importante de la forme oxydée du glutathion (**Article 3, Figure 1**). De manière intéressante, conjointement nous avons observé la formation d'agrégats dans les cellules infectées grâce à un marquage fluorescence avec de la thioflavine T (**Article 3, Figure 2**). Parmi les protéines pouvant être mal repliées, on peut retrouver les protéines virales qui sont abondantes dans le RE au moment de l'infection. Ainsi nous avons décidé, avec les anticorps que nous avons à notre disposition, de rechercher la formation d'agrégats de la protéine d'enveloppe du virus Zika. En utilisant, l'anticorps monoclonal 4G2, nous avons observé la protéine E sous sa forme monomérique, en condition non-réductrice. Cet anticorps reconnaissant un épitope conformationnel perdu lors de la réduction des ponts disulfures, aucun signal n'a pu être observé pour les échantillons réduits (**Article 3, Figure 3**). Cependant, en utilisant un anticorps polyclonal anti-EDIII, dirigé contre le domaine III de la protéine E, nous avons pu constater en condition non réductrice l'apparition de bandes de haut poids moléculaire, correspondant à des oligomères de protéine E. Nous avons établi que ces oligomères étaient formés par des liaisons covalentes, de type pont disulfure, puisque ces bandes de haut poids moléculaire disparaissent en conditions réductrices (**Article 3, Figure 3**). Ces oligomères s'agrègent et perdent en solubilité, comme en témoigne le fait qu'on les retrouve dans la fraction insoluble en cas de centrifugation (**Article 3, Figure 5**). Nous avons d'ailleurs émis l'hypothèse que la formation de ces oligomères pouvait être permise par une cystéine laissée libre dans la E de ZIKV en comparaison à d'autres *Flavivirus* (**Article 3, Figure 4**).



*viruses*



Article

---

# Evidence of RedOX Imbalance during Zika Virus Infection Promoting the Formation of Disulfide-Bond-Dependent Oligomers of the Envelope Protein

---

Grégorie Lebeau, Jonathan Turpin, Etienne Frumence, Daed El Safadi, Wissal Harrabi, Philippe Desprès, Pascale Krejbich-Trotot and Wildriss Viranaïcken

Special Issue

Zika Virus: An Emerging Flavivirus

Edited by

Dr. Pedro V. Vasconcelos



<https://doi.org/10.3390/v14061131>

## Article

# Evidence of RedOX Imbalance during Zika Virus Infection Promoting the Formation of Disulfide-Bond-Dependent Oligomers of the Envelope Protein

Grégorie Lebeau , Jonathan Turpin , Etienne Frumence <sup>†</sup> , Daed El Safadi, Wissal Harrabi, Philippe Desprès , Pascale Krejbich-Trotot <sup>\*</sup>  and Wildriss Viranaïcken <sup>\*</sup> 

PIMIT, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme CYROI, 97490 Sainte-Clotilde, Ile de La Réunion, France; gregorie.lebeau@univ-reunion.fr (G.L.); jonathan.turpin@univ-reunion.fr (J.T.); etienne.frumence@univ-reunion.fr (E.F.); daedalsafadi@gmail.com (D.E.S.); wissalharrabi500@yahoo.fr (W.H.); philippe.despres@univ-reunion.fr (P.D.)

<sup>\*</sup> Correspondence: pascale.krebich@univ-reunion.fr (P.K.-T.); wildriss.viranaïcken@univ-reunion.fr (W.V.)

<sup>†</sup> Present address: Laboratoire de Microbiologie-CNR Arbovirus CHU de la Réunion-site Félix Guyon, La Réunion Site Félix Guyon, CS11021, 97400 Saint Denis, Ile de La Réunion, France.

**Abstract:** Flaviviruses replicate in membrane factories associated with the endoplasmic reticulum (ER). Significant levels of flavivirus viral protein accumulation contribute to ER stress. As a consequence, the host cell exhibits an Unfolded Protein Response (UPR), subsequently stimulating appropriate cellular responses such as adaptation, autophagy or apoptosis. The correct redox conditions of this compartment are essential to forming native disulfide bonds in proteins. Zika virus (ZIKV) has the ability to induce persistent ER stress leading to the activation of UPR pathways. In this study, we wondered whether ZIKV affects the redox balance and consequently the oxidative protein folding in the ER. We found that ZIKV replication influences the redox state, leading to the aggregation of the viral envelope protein as amyloid-like structures in the infected cells.

**Keywords:** Zika virus; unfolded protein response; ER stress; oligomer; disulfide bond; amyloid aggregates



**Citation:** Lebeau, G.; Turpin, J.; Frumence, E.; El Safadi, D.; Harrabi, W.; Desprès, P.; Krejbich-Trotot, P.; Viranaïcken, W. Evidence of RedOX Imbalance during Zika Virus Infection Promoting the Formation of Disulfide-Bond-Dependent Oligomers of the Envelope Protein. *Viruses* **2022**, *14*, 1131. <https://doi.org/10.3390/v14061131>

Academic Editor: Pedro V. Vasconcelos

Received: 31 March 2022

Accepted: 18 May 2022

Published: 24 May 2022

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



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is a pathogenic single-stranded RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family, together with the Yellow Fever virus (YFV), Dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV) and Japanese Encephalitis virus (JEV). Among the pathogenic *flaviviruses*, ZIKV has gained notoriety in the last ten years due to several outbreaks and serious clinical concerns. Notably, neurological complications have been described, including Guillain-Barré syndrome (GBS) and congenital malformations (Congenital Zika Syndrome—CZS), prompting specific vigilance for pregnant women in the case of the ZIKV epidemic [1,2]. Otherwise, the ability of ZIKV to be transmitted sexually alongside to vector-borne transmission and the evidence of its persistence in some tissues conversely to other *flaviviruses* raised the interest in specific ZIKV–host interactions. This has led to a growing number of studies to decipher these interactions at the cellular and molecular levels. Similar to other *flaviviruses*, ZIKV replication occurs in Endoplasmic Reticulum (ER) invaginations of infected cells and induces an accumulation of viral proteins [3–5]. Genomic RNA translation leads to the viral polyprotein incorporation in the ER membrane, followed by its proteolytic cleavage. Translation of the polyprotein, initially enclosed through the ER membrane, results in three structural (C, prM, and E) and seven non-structural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS) proteins. Six of these proteins remain membrane-bound, as do the prM and E proteins that constitute the future viral envelope.

In addition to its key roles in cell physiology and homeostasis, the ER is an essential cellular component in the execution of the viral cycle. The main function of the ER is the regulation of folding and post-translational modifications of neo-synthesized proteins. Quality control of folding by the ER determines the outcome of proteins destined for centrifugal transport and the secretory pathway. Indeed, protein folding involves N-glycosylation, an oxidative environment favorable to disulfide bridge formation in the ER lumen, and the presence of several Ca<sup>2+</sup>-dependent molecular chaperones (e.g., calreticulin, GRP78/BiP and GRP94) [6,7]. The latter is in particular involved in the stabilization of protein folding intermediates. ER homeostasis can be disrupted by many factors such as glucose deprivation, hypoxia, calcium imbalance or protein accumulation [8]. The resulting ER stress causes cellular adaptive responses, such as the Unfolded Protein Response (UPR), which is activated in an attempt to restore ER homeostasis.

Upon virus infection, the sudden and massive influx of ER-processed viral proteins typically results in ER stress and UPR in infected cells. Such cell responses contribute to several modes of host defense, i.e., antiviral programs, immune responses [9,10] and commitment to autophagy or cell suicide [11,12]. The crosstalk between ER stress, UPR, autophagy and apoptosis is particularly important during infection. Each of these responses can affect cellular homeostasis and consequently the efficiency of viral replication and spread.

The ability of ZIKV to induce UPR in response to ER stress in several cell types has been previously studied [13–19]. The infection was accompanied by morphological changes in cell organelles, including remodeling of the ER into a swollen shape [20,21]. As aforementioned, during viral infection, ER stress is usually the result of an increasing number of viral proteins to be processed by the ER. This influx of proteins disrupting ER homeostasis is likely to trigger UPR and a translational shutdown which will have negative effects on the replicating virus. We have previously shown that ZIKV is able to hijack the ATF6 and CHOP pathways during UPR [18,19]. This control by ZIKV results in persistent unresolved ER stress and delayed induction of cell death, which benefit the virus and may even promote its long-term persistence in the body [22].

Data from the literature indicate that persistent ER stress is associated with a loss of glutathione activity, which, in turn, provokes an imbalance in redox homeostasis [23]. Indeed, the ER provides a relatively oxidizing thiol-disulfide environment suitable for the oxidative folding of co-translationally translocated proteins. Correct folding of proteins is in part dependent on disulfide bond formation, a reversible process that is achieved by a thiol-disulfide exchange reaction [24]. This exchange is mediated by a catalytic redox cycle, which involves ERO-1 (ER oxidoreductin 1), PDI (Protein Disulfide Isomerase) and GSH (reduced glutathione), to ensure the formation and isomerization of disulfide bonds in proteins [25]. The stability of the thiol-disulfide system in the ER relies on the glutathione redox pair, which acts as a powerful guardian of the redox balance. Thus, the ratio of the glutathione reduced form (GSH) to the oxidized glutathione disulfide form (GSSG) in the ER is an indicator of the redox homeostasis [26]. It should be noted that the specific redox conditions in the ER allow the formation of disulfide bonds within the neo-synthesized polypeptides. These covalent bonds are necessary for the functional three-dimensional configurations of proteins in progress in the ER. Due to the importance of an oxidative environment for the correct folding of proteins [27], a redox imbalance could be a trigger for protein misfolding and the formation of non-native disulfide bonds during ER stress [28].

We, therefore, wondered whether, during ZIKV infection, persistent ER stress might be related to an imbalance of the redox status. We questioned to what extent this would contribute to the accumulation of misfolded proteins. Under infection conditions, we examined the GSH/GSSG balance and showed that it significantly decreased, subsequently impairing the redox balance. We showed that in ZIKV-infected cells, the envelope protein (ZIKV-E) could oligomerize in large molecular weight complexes with insoluble characteristics. The presence and accumulation of such oligomers seem to correlate with the decrease in the redox potential of glutathione in infected cells. The redox imbalance generated during



infection could be responsible for the generation of amyloid-like protein structures linked by inappropriate disulfide bonds. This hypothesis would be consistent with fluorescence microscopy observations of thioflavin T labeling, which reveal the presence of protein aggregates that colocalize with the ZIKV-E protein. All of these data suggest a change in oxidative protein folding in the ER due to persistent ER stress and ER redox imbalance during ZIKV infection. Misfolded proteins would cause persistent stress, promoting a spiral in which more inappropriate disulfide bonds would form, promoting protein aggregation.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cells, Virus and Reagents

The clinical isolate PF-25013-18 (PF13) of ZIKV [29] was used for all infections. A549 cells (ATCC, CCL-185) and HEK-293T cells (ATCC, CRL-3216) were cultured at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in Dulbecco's modified eagle medium (P04-3500, PAN-Biotech™) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, P40-37500, PAN-Biotech™). Briefly, A549 cells were infected for 48 h with MOI ranging from 0.5 to 5. HEK-293T cells were transfected with 2.5 µg of plasmid encoding ZIKV prM/E from epidemic BeH819015 (BR15) isolated in Brazil in 2015.

Immunodetection of the viral proteins was performed using the mouse anti-pan flavivirus E protein 4G2 (RD Biotech®, Besançon, France) or with the rabbit anti-EDIII ZIKV, which was described previously [30]. Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 594 IgG antibodies were purchased from Invitrogen (AB\_141607 and AB\_2556547, Thermofisher®, Les Ulis, France). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (ab97051) and anti-mouse (ab6789) antibodies were from Abcam® (Cambridge, UK). Thioflavin T, a benzothiazole dye that increases in fluorescence upon binding to amyloid fibrils and protein aggregates, was purchased from Sigma-Aldrich® (243.003516.10, Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France). GSH/GSSG-Glo™ assay was purchased from Promega (V6611, Charbonnières-les-Bains, France). Tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) is a reducing reagent used at 5 µM and purchased from Sigma-Aldrich® (243.075259.02, Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France). Transfection was achieved using Lipofectamine 3000® (L3000-015, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations.

### 2.2. Cell Fractionation and Western Blot

For fractionation, cells were washed with PBS and lysed at the concentration of  $1 \times 10^4$  cells·µL<sup>-1</sup> in buffer A (0.2% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA) as before [31]. Following lysis, the insoluble fraction was separated by centrifugation at 3400× g for 10 min. Pellets were enriched in non-folded proteins, and the supernatant was enriched in soluble proteins. All fractions were used in corresponding Western blots.

For other Western blot assays, samples were either lysed with TEN buffer (0.1 M Tris-Cl pH 8.0, 0.01 M EDTA pH 9.0 and 1 M NaCl) or RIPA buffer. Cell lysates were then sonicated, treated in Laemmli buffer with or without DTT/TCEP and heat-treated at 95 °C for 5 min. Finally, samples were processed by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane as previously reported [32], and subsequently incubated with the aforementioned antibodies at the following dilutions: 1:1000 for 4G2, rabbit anti-EDIII and β-actin, 1:2000 for HRP-conjugated anti-rabbit and anti-mouse.

### 2.3. Immunofluorescence and Thioflavin T Staining

A549 cells were grown, infected or treated on glass coverslips. They were further fixed with 3.7% formaldehyde at room temperature for 10 min. Fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. Coverslips were incubated with primary antibodies (1:1000 dilution) in 1× PBS 1% BSA for two hours and with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1000, Invitrogen) for 1h. Nucleus morphology was revealed by DAPI staining. According to Beriault and Werstuck [33], after immunodetection of ZIKV EDIII and DAPI staining, amyloid indicator thioflavin-T was added to the coverslips at 5 µM for

10 min before proceeding to mount. The coverslips were mounted with VECTASHIELD® (Clinisciences, Nanterre, France), and fluorescence was observed using a Nikon Eclipse E2000-U microscope. Images were captured and processed using a Hamamatsu ORCA2 ER camera and the imaging software NIS-Element AR (Nikon, Tokyo, Japan).

#### 2.4. Glutathione Abundance Measurement

A549 cells were either infected or not with PF13 at MOI 5. After 48h of infection, the antioxidant capacity of glutathione was assessed in infected cells versus mock infected cells using the luminescence-based GSH/GSSG-Glo™ assay kit following the manufacturer's recommendations. Briefly, after treatment, the cell culture supernatant was removed, and cells were lysed either with Total Glutathione Lysis Reagent or Oxidized Glutathione Lysis Reagent. After 5 min of agitation, Luciferase Generation reagent was added. Thirty minutes after incubation at RT, Luciferin Detection Reagent was added. Luminescence emitted was measured after brief agitation and 15 min of incubation using a microplate reader (Tecan FLUOstar® Omega). The GSH/GSSG ratio for a sample was calculated using the following formula:

$$\frac{\text{Net total glutathione luminescence} - \text{Net oxidized glutathione luminescence}}{\text{Net oxidized glutathione luminescence}/2}$$

#### 2.5. Protein Sequence Alignment

Flavivirus prM/E proteins were aligned using Clustal Omega. Following sequences were used: POLG\_YEFVA—Yellow Fever virus, POLG\_DEN2N—Dengue virus, ARB08102.1—Zika virus PF13.

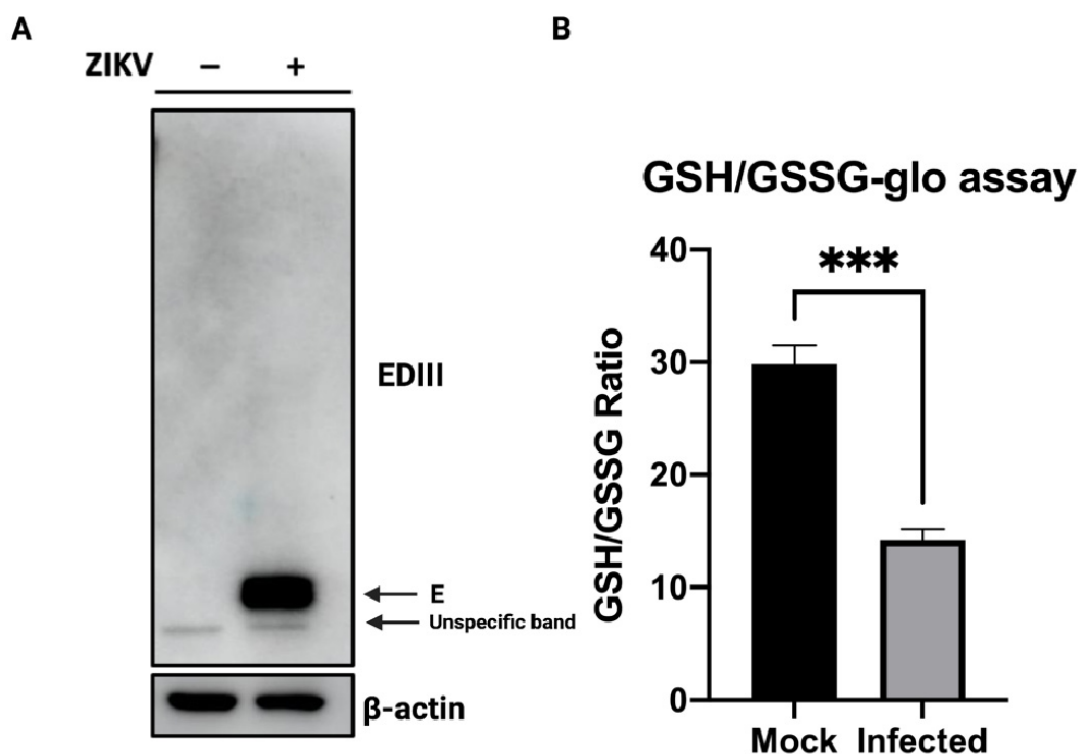
#### 2.6. Statistical Analyses

All values are expressed as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. After normality tests, comparisons between infected and mock infected cells were analyzed using a *t*-test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. All statistical tests were conducted using Graph-Pad Prism version 9 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, Available online: <http://www.graphpad.com>).

### 3. Results

#### 3.1. Glutathione Abundance in the Course of ZIKV Infection

We and others have reported that ZIKV infection, like many other enveloped viruses, can trigger ER stress and UPR in the host cell [13–19]. It is still unknown whether a viral factor is more specifically involved in ZIKV-mediated ER stress. Disruption of ER homeostasis may be followed by an altered redox state and may be associated with impaired glutathione availability and sulfur tripeptide metabolism [23,34]. We wondered whether ZIKV-mediated ER stress could be related to a similar phenomenon. Therefore, we infected A549 cells with ZIKV at MOI 5 for 48h. As shown in Figure 1A, Western blot analysis (in reducing conditions) of cell extracts harvested 48 h post-infection (h.p.i.) shows ZIKV envelope protein (~55 kDa), indicating infection and viral replication in A549 cells. At the same time, infected and mock infected A549 cells were lysed to compare the relative level of oxidized and reduced glutathione under these two conditions. Interestingly, following infection, an approximately three-fold decrease in the GSH/GSSG ratio is observed in infected cells (Figure 1B). The decrease in glutathione reduced form observed presumably relates to a loss of glutathione activity during ZIKV infection.

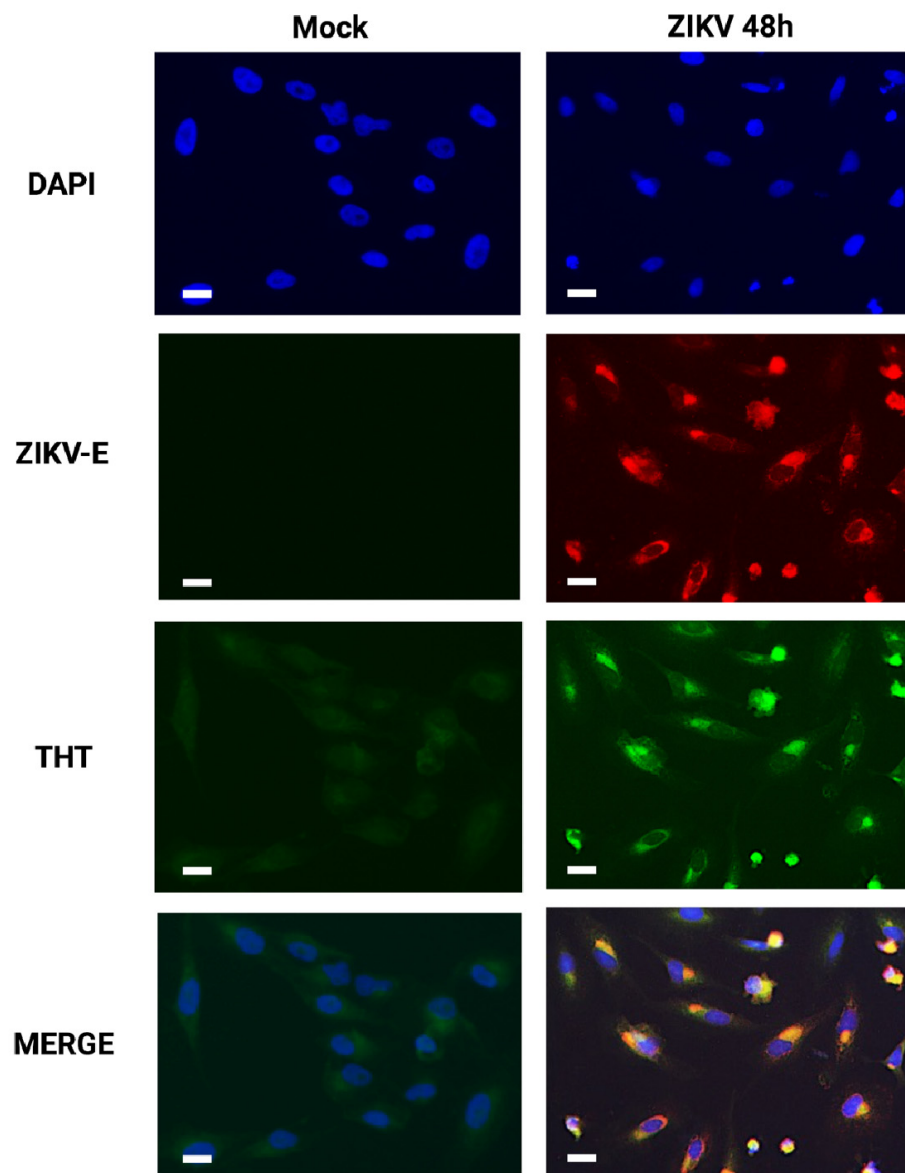


**Figure 1.** ZIKV infection is associated with redox imbalance. (A) ZIKV infection of A549 cells. A549 cells were either mock infected or infected with ZIKV at MOI 5 for 48 h. Cell extracts were reduced using DTT and heat-treated at 95 °C for 5 min. Western blot analysis of cell extracts following infection leads to detection of ZIKV envelope protein (~55 kDa). ZIKV-E protein is detected using rabbit anti-EDIII antibody. This is representative of three independent experiments. (B) ZIKV leads to a decrease in the GSH/GSSG ratio, indicating a loss of glutathione activity in infected A549 cells. 48 h.p.i. glutathione activity was assessed in mock infected vs. infected cells. \*\*\*:  $p < 0.01$ . h.p.i: h post-infection.

### 3.2. Detection of Amyloid-like Structures in ZIKV-Infected Cells

The imbalance in the GSH/GSSG ratio suggests an alteration in the redox state during ZIKV infection. Redox imbalance is known to participate in ER stress [35], which has to be resolved by UPR. However, it has been shown that during ZIKV infection, incomplete UPR results in persistent and poorly resolved ER stress [18,19]. Under these conditions of persistent stress and redox imbalance, the accumulation of oxidized protein could lead to the formation and the aggregation of amyloid-like structures [35].

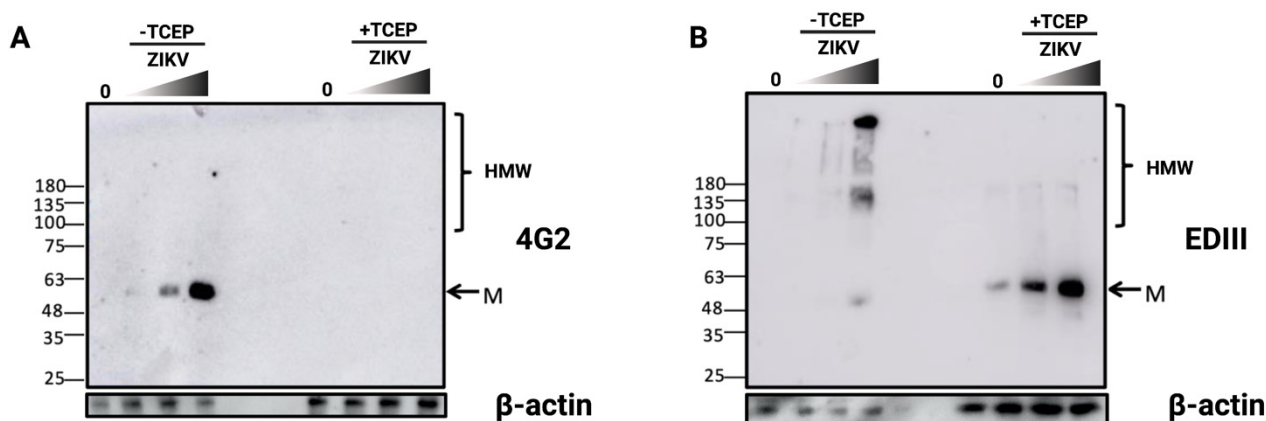
To assess such a hypothesis, we infected A549 cells with ZIKV at MOI 1 for 48 h. Cells were fixed and examined by immunofluorescence. Intracellular virus replication was examined using a monospecific anti-E polyclonal antibody, and fluorescent dye Thioflavin-T (THT) was used to detect protein aggregates and any form of amyloid-like structures [33]. At 48 h.p.i., only A549 cells positively stained for the E protein showed a positive signal for THT as compared to mock-infected cells, suggesting that amyloid-like protein aggregates can occur in ZIKV-infected cells (Figure 2). Interestingly, the staining of amyloid-like structures and the staining of the ZIKV-E protein overlap (Figure 2). We have previously demonstrated that ZIKV-E localizes to the ER by co-immunodetection of calnexin [18], and it is validated that E protein is processed and folded in the ER before the assembly of viral particles in the secretory pathway [36]. Thus, the colocalization of ZIKV-E and THT labeling suggests an accumulation of amyloid-like structures in the stressed ER of infected cells. Furthermore, these amyloid-like structures may be related to misfolding of the viral envelope protein.



**Figure 2.** Amyloid-like protein accumulation during ZIKV infection. A549 cells infected with ZIKV at MOI 1 for 48 h were incubated with Thioflavin-T (THT), a green fluorescent ER stress indicator that binds aggregated proteins. Immunodetection of ZIKV envelope protein confirmed the infection of the cells. Scale bar: 5  $\mu$ m. All images are representative of three independent experiments.

### 3.3. Detection of Disulfide-Bonded E Oligomers in ZIKV-Infected Cells

To determine whether a relationship exists between the expression of the E protein and the formation of amyloid-like structures in infected cells, A549 cells were infected with increasing inputs of ZIKV (Figure 3). Protein extracts were collected 48 h.p.i. and either reduced or not using Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) as a reducing agent. Protein samples were then analyzed by immunoblot assay (Figure 3A). Under non-reducing conditions, we can observe a single band when we use the 4G2, an anti-pan-flavivirus envelope protein antibody. The signal corresponds to the monomeric form of ZIKV-E protein ( $M_r$  ~55 kDa), and it increases in an MOI-dependent manner (Figure 3A). Interestingly, this band is no longer observed when using TCEP (Figure 3A). The lack of recognition of ZIKV-E protein under reducing conditions is consistent with literature data indicating that the 4G2 antibody binds a conserved conformational epitope overlapping the E fusion loop [37]. This suggests that oxidized disulfide bonds may stabilize the tertiary structure of ZIKV-E protein and be necessary for conformational epitope recognition.



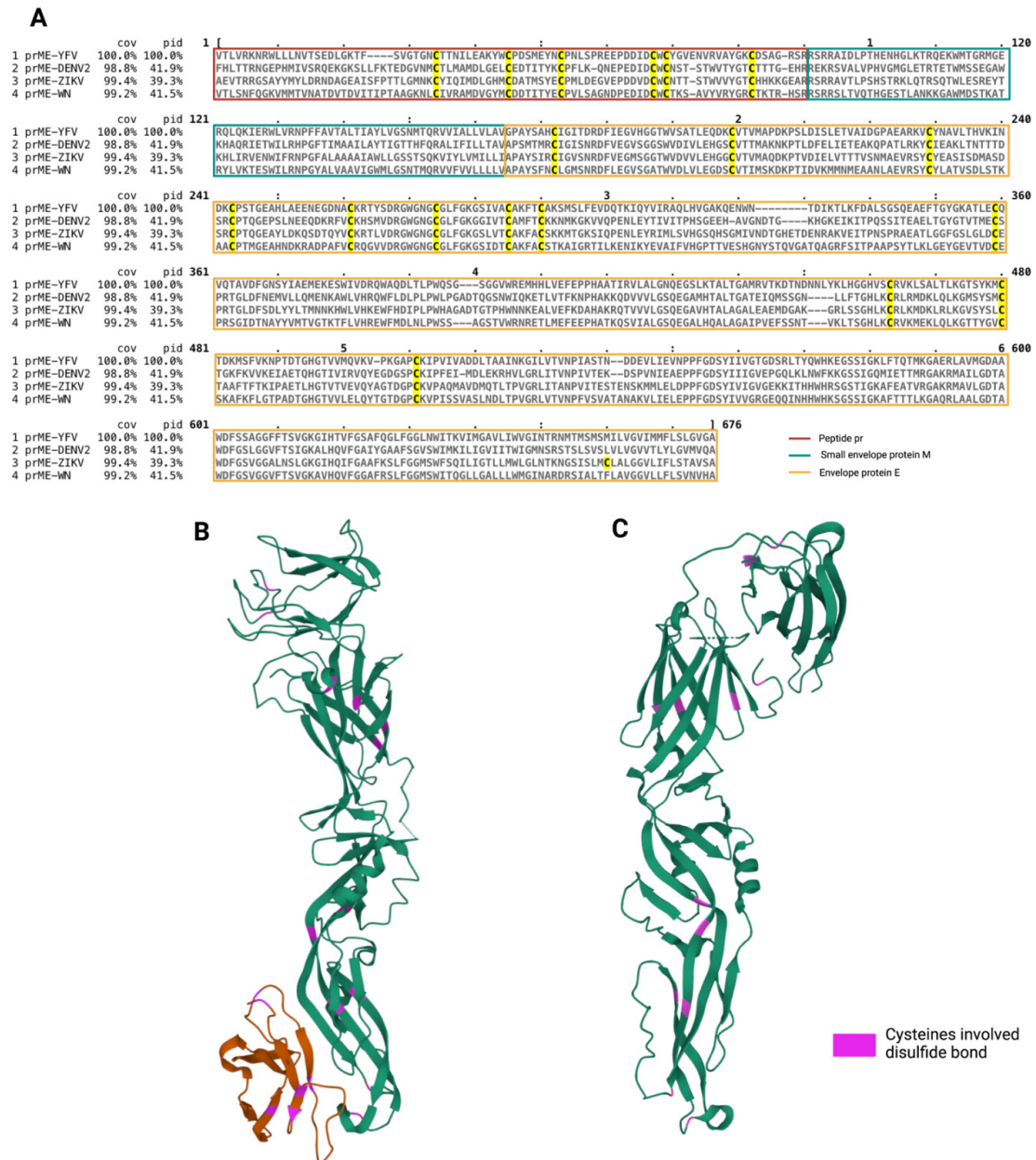
**Figure 3.** ZIKV infection results in the formation of disulfide-crosslinked E oligomers. (A) ZIKV-E in native conformation contains intermolecular disulfide bridges. After infection of A549 cells with ZIKV in a dose-dependent manner (MOI 0.5, 1 and 5), protein extracts were either treated or not with TCEP before SDS-PAGE. Western blot analysis was performed with mouse 4G2 antibody, which recognizes a conformational epitope of the E protein. (B) ZIKV-E protein forms disulfide-cross-linked oligomers. A549 cells were infected with increased quantities of ZIKV (MOI 0, 0.5, 1 and 5), and the total fraction was treated or not with TCEP before Western blotting. Western blot assay was achieved with a rabbit anti-EDIII antibody. M indicates the 55 kDa monomer, and HMW indicates high molecular weight oligomers of ZIKV-E. These images are representative of three independent experiments.

Immunoblotting was repeated in the same conditions as described above but this time using an anti-EDIII antibody. Under non-reducing conditions, the monomeric form of ZIKV-E protein was not predominantly detected. In contrast, high molecular weight (HMW) signals of ZIKV-E protein are detected. These forms of over 100 kDa in size could correspond to oligomers of the E protein (HMW, Figure 3B). Conversely, after TCEP treatment and immunodetection with anti-EDIII antibody, the monomeric form of ZIKV-E (M, Figure 3B) prevails, and the oligomeric forms are no longer detected. These observations suggest that during ZIKV infection, E proteins are produced and accumulated in different forms, including high molecular weight forms that are not detectable when reduced. These oligomeric forms would therefore be stabilized by disulfide bonds. To confirm the possible formation of envelope protein oligomers, we decided to examine the electrophoretic migration patterns under reducing and non-reducing conditions after the overexpression of ZIKV prM/E in HEK-293T cells. Interestingly, the same HMW forms of the E protein were observed under non-reducing conditions (Figure S1).

During infection, the envelope protein of flavivirus is mainly folded in the ER, and its monomeric tertiary structure depends on the generation of intramolecular disulfide bonds that occur in this cellular compartment [38]. Oligomeric forms resulting from weak interactions between the individual monomers have also been described [39]. To the best of our knowledge, we are the first to demonstrate the possibility of E-oligomers formation in the context of ZIKV infection due to disulfide covalent bond formation.

Thus, we wondered whether this ability was a specificity of the ZIKV-E protein among the different flaviviral envelope proteins. We therefore aligned the prM/E amino acid sequences of YFV, DENV, WNV and ZIKV, as shown in Figure 4A. All *flaviviruses* assessed have highly conserved cysteines with six residues belonging to the prM protein and twelve to the E protein. Interestingly, ZIKV-E contains a 13th cysteine residue. As illustrated in Figure 4B for DENV2 or in the literature for WNV, the 12 well-conserved cysteine residues within E protein are all adjacent and involved in disulfide proximity bonds [38,40]. This feature is also found in ZIKV prM/E (Figure 4C), where 12 of the 13 cysteine residues in E are highlighted and form disulfide bonds through their adjacent positions, the thirteenth residue not being accessible for an oxidized bond formation in the native ZIKV-E form. The monomer of ZIKV-E would then be stabilized for its proper folding by 6 disulfide

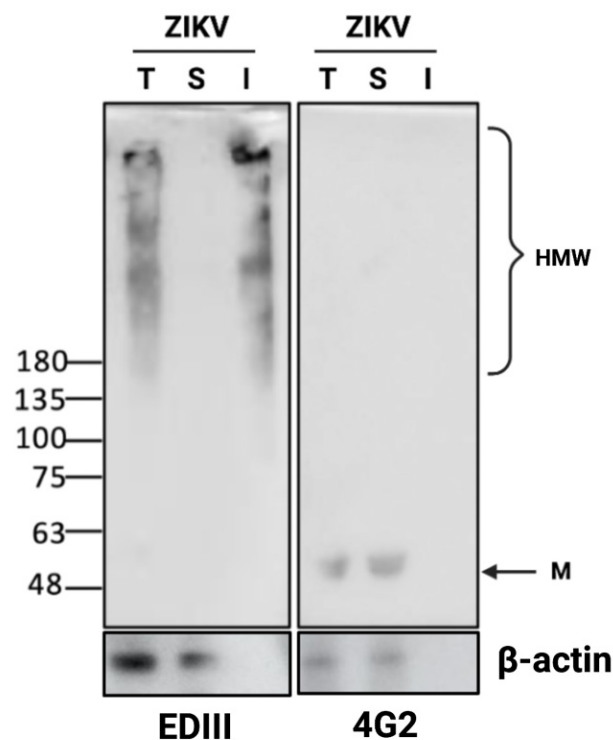
bonds, as are the E proteins of other *flaviviruses*. In contrast, the presence of an additional cysteine specific to ZIKV-E could account for intermolecular disulfide bond formation when the protein incorporated into the stressed ER is misfolded. Here, we propose that the oligomerization of E proteins is the result of misfolding and abnormal conformations due to the formation of the wrong intra- and/or intermolecular disulfide bonds between polypeptides. We hypothesize that persistent ER stress could be a potent initiator of this phenomenon and that the additional cysteine plays a role in increasing the combinatorial possibilities for the formation of these non-native bonds between the cysteine residues implicated in disulfide bonds.



**Figure 4.** Disulfide bonds in *flavivirus* prM/E protein. (A) Alignment of prM/E protein sequence from YFV (POLG\_YEFVA), DENV2 (POLG\_DEN2N), WNV (POLG\_WNV9) and ZIKV (ARB08102.1). The cysteine positions are highlighted in yellow. (B) Crystallography structure of DENV2 prM/E (3C6E), with cysteine positions involved in disulfide bonds formation highlighted in pink. (C) Crystallography structure of ZIKV-E (5JHM), with cysteine positions involved in disulfide bonds formation highlighted in pink.

### 3.4. ZIKV E Protein Forms Insoluble Oligomers during Infection

The oligomerization of proteins due to the cross-linking of non-native disulfide bonds may lead to the formation of protein aggregates, one hallmark of which will be a loss of solubility [41]. As previously stated, we have been able to show that ZIKV induces unresolved ER stress in infected cells that have a prolonged lifespan [18,19]. These conditions, which are combined with the redox imbalance (Figure 1), are likely to influence ER function and protein folding. Indeed, during infection, a large amount of misfolded ZIKV-E protein accumulates in the form of oligomers. In agreement with the results obtained with the THT-amyloid-like imaging (Figure 2), the detection of E-protein oligomers (Figure 3) could be consistent with the formation of insoluble aggregates. To test this hypothesis, we prepared protein extracts from ZIKV infected cells using a buffer that contains a detergent able to solubilize integral membrane proteins. Protein extracts were then fractionated according to their solubility by low-speed centrifugation ( $3400\times g$ ) to prevent microsome sedimentation. Total protein extract, soluble fraction and insoluble fraction were then used for Western blot analysis. Immunoblot using 4G2 antibody shows a unique band at  $\sim 55$  kDa in both the total protein extract and the soluble fraction, corresponding to the monomeric form of the E protein (Figure 5). The anti-EDIII antibody detected the E oligomers in the insoluble fraction (Figure 5), suggesting that ZIKV envelope protein can be engaged in the formation of insoluble aggregates. These latest results confirm that ZIKV infection leads to an accumulation of high molecular weight oligomers of the E protein, in which misfolded polypeptides are associated with each other by disulfide bonds, thus resulting in protein aggregation with insoluble and amyloid features.



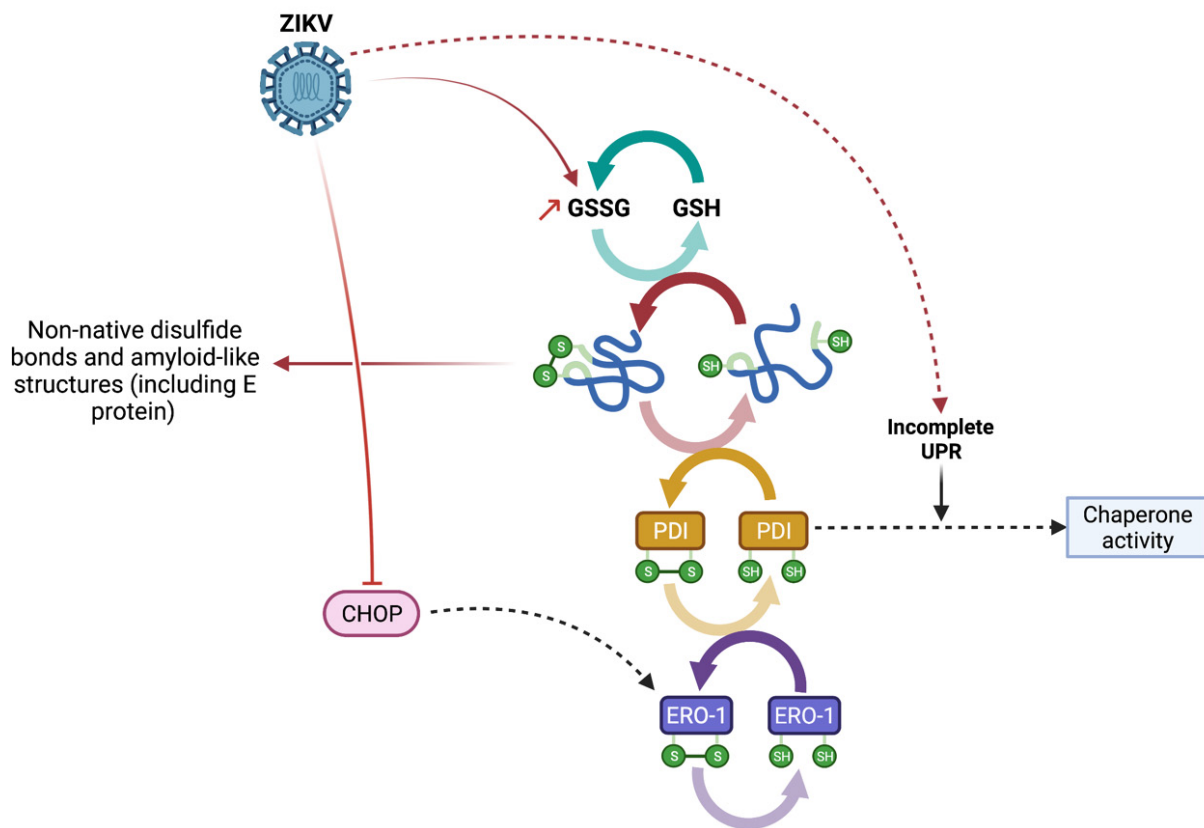
**Figure 5.** ZIKV E disulfide-cross linked oligomers are insoluble. A549 cells were infected with ZIKV at MOI 5. 48 h.p.i. cells were lysed in TX100 buffer A and fractionated by centrifugation at  $3400\times g$ . An equal volume of total (T), soluble (S) and insoluble (I) fractions were separated under non-reducing conditions and immuno-blotted for ZIKV-E with anti-EDIII or 4G2 antibodies. M indicates the 55 kDa monomer, and HMW indicates high molecular weight oligomers of ZIKV-E. This is representative of three independent experiments.

#### 4. Discussion

The shaping of proteins that transit in the ER is a crucial step in their maturation, necessary for them to adopt a native conformation that will condition their future biological functions. This 3D configuration relies on the correct folding of polypeptide chains and involves both weak interactions and the formation of specific covalent bonds between cysteine residues. Disulfide bond formation is a reversible process that is achieved by a thiol-disulfide exchange reaction [24]. This exchange is permitted by a catalytic redox cycle involving ERO-1, PDI and GSH. This phenomenon is ensuring the formation and isomerization of disulfide bonds in proteins [25] (Figure 6). This oxidative protein folding occurs in an oxidized environment to maintain native protein conformation. However, a significant decrease in GSH/GSSG ratio is known to lead to protein misfolding and inappropriate formation of disulfide bonds. In eukaryotic cells, GSH is the most abundant non-protein thiol [42], which is oxidized to glutathione disulfide (GSSG) when it assists in disulfide-bond reduction (Figure 6). Upon ER stress and UPR, ER environment becomes increasingly reduced due to the consumption of GSH [43]. Thus, the ratio change observed during ZIKV infection (Figure 1) can be related to prolonged UPR and unresolved ER stress. During ER stress, ERO-1 and PDI are induced through UPR to favor protein folding as an adaptive response. The induction of ERO-1 during UPR involves the transcription factor CHOP [44]. However, CHOP expression and activity are downregulated during ZIKV infection [19], thus probably affecting ERO-1 expression (Figure 6). In addition, homeostasis impairment imposed by the UPR, such as during ZIKV infection [18,19], is known to be associated with a compromised ER protein oxidation and a PDI chaperone activity rather than a disulfide isomerase activity for PDI [45]. All of these points (ERO-1 downregulation, PDI activity switch and decreased GSH) illustrate that during ZIKV infection, the redox state is affected in relation to a decreased thiol-disulfide exchange reaction (Figure 6). Accordingly, protein misfolding and the formation of non-native disulfide bonds during ZIKV infection can occur. Such changes in ER homeostasis and activities are likely to lead to the formation of aggregates and amyloid-like structures, as shown with THT staining in ER upon ZIKV infection (Figure 2).

During the infection process, viral proteins incorporated into the ER are subject to the same folding and control rules, and the organized formation of disulfide bridges contributes to their functional shaping. ZIKV-E contains cysteine residues that allow the formation of disulfide bonds important for the protein's native conformation. Using the monoclonal pan-flavivirus 4G2 antibody, we were then able to detect a conformational epitope in the monomeric form of the E protein (Figure 3A). Conversely, after treatment with a reducing agent, the epitope became undetectable with the 4G2 antibody. This confirmed that intramolecular disulfide bridges shape the native E protein. These observations are in agreement with data on other *Flavivirus* (e.g., WNV, DENV), indicating that all cysteine in the E protein is engaged in intramolecular disulfide bonds [38,40]. Unexpectedly, the use of a monospecific antibody raised against the antigenic domain III of the E protein (EDIII) allowed us to reveal that the E protein exists in several forms during ZIKV-infection. One is the native monomeric form with intrachain disulfide bonds, and the others are high molecular weight oligomers with unfitted intermolecular disulfide bonds (Figure 3B). The formation of such E-related structures can be related to a change in redox state associated with a thiol-disulfide exchange reaction reduction in link with a persistent ER stress, as described earlier. Sequence analysis of prM/E for cysteine content highlights the presence of an additional cysteine in ZIKV-E compared to other *Flavivirus* (Figure 4). This free cysteine could be related to a greater susceptibility of ZIKV-E protein to form non-native disulfide-bonded oligomers compared to the other *Flavivirus* in the case of redox imbalance and misfolding. Finally, the non-native disulfide-bonded oligomers of E remain in an insoluble fraction (Figure 5), which is consistent with protein aggregation. As THT staining co-localized with ZIKV-E protein (Figure 2), we can therefore argue that these aggregates of ZIKV-E form amyloid-like structures.





**Figure 6.** Graphical overview of the impaired redox cycle and the formation of protein aggregates during ZIKV infection.

The next challenge will be to decipher the pathophysiological impact of these amyloid-like structures during ZIKV infection, especially in microcephaly and other neurological disorders, as these structures are known triggers of apoptosis in the nervous system [41,46]. The consequence of the co-existence of ZIKV-E with intramolecular disulfide bonds and oligomer of E with non-native intermolecular disulfide bonds for virus cycle and particularly for viral egress should be also eluded.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14061131/s1>, Figure S1: ZIKV prM/E overexpression results in the formation of disulfide-crosslinked oligomers.

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

**Funding:** This research was funded by the ZIKAlert project (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0001902). E.F. holds a fellowship from the Regional Council of Reunion Island (European Union-Région Réunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0012406). J.T. has a PhD degree scholarship from La Réunion Island University (Ecole Doctorale STS), funded by the French ministry MEEESR. G.L. and D.E.S. hold a fellowship from the Regional Council of Reunion Island (European Union-Région Réunion), respectively DIREDD/2021-0161 and DIREDD/2021-1115.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

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

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

## Abbreviations

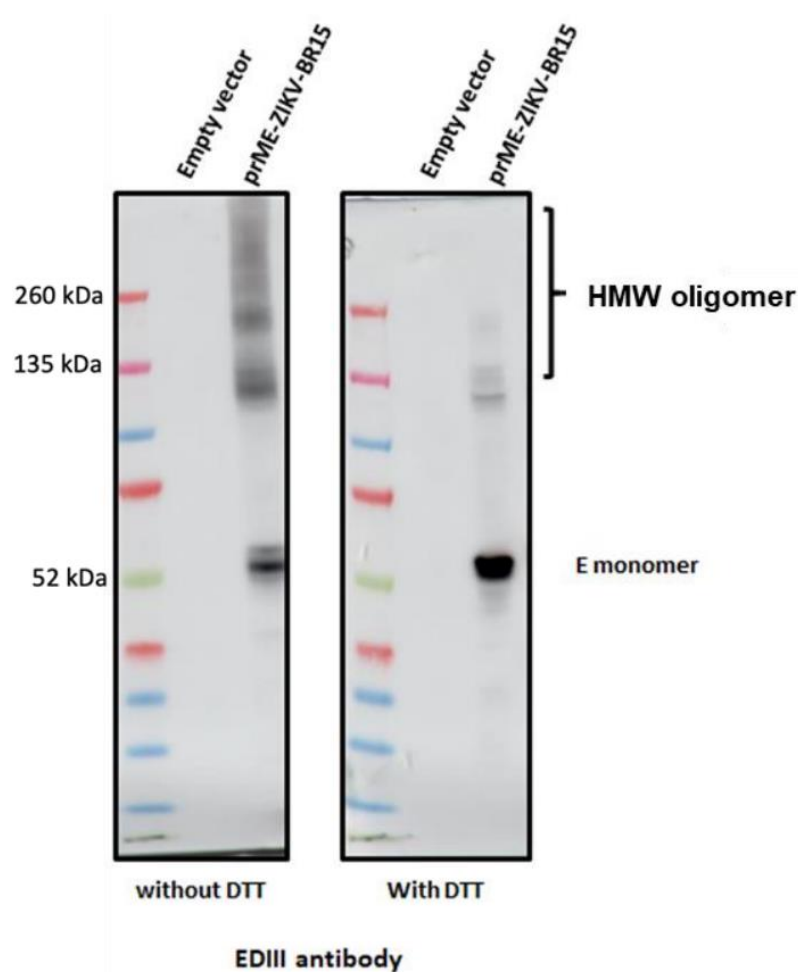
CHOP	C/EBP Homologous Protein
DENV	Dengue Virus
EDIII	Domain III of E protein
ER	Endoplasmic Reticulum
ERO-1	ER oxidoreductin 1
GSH	Reduced glutathione
GSSG	Oxidized glutathione
PDI	Protein Disulfide Isomerase
TCEP	Tris (2-carboxyethyl)phosphine
THT	Thioflavin T
UPR	Unfolded Protein Response
WNV	West Nile Virus
YFV	Yellow
ZIKV	Zika Virus
ZIKV-E	Zika Virus envelope protein

## References

- Wen, Z.; Song, H.; Ming, G. How Does Zika Virus Cause Microcephaly? *Genes Dev.* **2017**, *31*, 849–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Miranda, J.; Martín-Tapia, D.; Valdespino-Vázquez, Y.; Alarcón, L.; Espejel-Núñez, A.; Guzmán-Huerta, M.; Muñoz-Medina, J.E.; Shibayama, M.; Chávez-Munguía, B.; Estrada-Gutiérrez, G.; et al. Syncytiotrophoblast of Placentae from Women with Zika Virus Infection Has Altered Tight Junction Protein Expression and Increased Paracellular Permeability. *Cells* **2019**, *8*, 1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cortese, M.; Goellner, S.; Acosta, E.G.; Neufeldt, C.J.; Oleksiuk, O.; Lampe, M.; Haselmann, U.; Funaya, C.; Schieber, N.; Ronchi, P.; et al. Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 2113–2123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Miorin, L.; Romero-Brey, I.; Maiuri, P.; Hoppe, S.; Krijnse-Locker, J.; Bartenschlager, R.; Marcello, A. Three-Dimensional Architecture of Tick-Borne Encephalitis Virus Replication Sites and Trafficking of the Replicated RNA. *J. Virol.* **2013**, *87*, 6469–6481. [[CrossRef](#)]
- Romero-Brey, I.; Bartenschlager, R. Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses. *Viruses* **2014**, *6*, 2826–2857. [[CrossRef](#)]
- Sun, Z.; Brodsky, J.L. Protein Quality Control in the Secretory Pathway. *J. Cell Biol.* **2019**, *218*, 3171–3187. [[CrossRef](#)]
- Hendershot, L.M. The ER Function BiP Is a Master Regulator of ER Function. *Mt. Sinai J. Med.* **2004**, *71*, 289–297.
- Xu, C.; Bailly-Maitre, B.; Reed, J.C. Endoplasmic Reticulum Stress: Cell Life and Death Decisions. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2656–2664. [[CrossRef](#)]
- Smith, J.A. A New Paradigm: Innate Immune Sensing of Viruses via the Unfolded Protein Response. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 222. [[CrossRef](#)]
- Carletti, T.; Zakaria, M.K.; Faoro, V.; Reale, L.; Kazungu, Y.; Licastro, D.; Marcello, A. Viral Priming of Cell Intrinsic Innate Antiviral Signaling by the Unfolded Protein Response. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3889. [[CrossRef](#)]
- Blázquez, A.-B.; Escribano-Romero, E.; Merino-Ramos, T.; Saiz, J.-C.; Martín-Acebes, M.A. Stress Responses in Fla-Virus-Infected Cells: Activation of Unfolded Protein Response and Autophagy. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sano, R.; Reed, J.C. ER Stress-Induced Cell Death Mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 3460–3470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gladwyn-Ng, I.; Cordon-Barris, L.; Alfano, C.; Creppe, C.; Couderc, T.; Morelli, G.; Thelen, N.; America, M.; Bessières, B.; Encha-Razavi, F.; et al. Stress-Induced Unfolded Protein Response Contributes to Zika Virus-Associated Microcephaly. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 63–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alfano, C.; Gladwyn-Ng, I.; Couderc, T.; Lecuit, M.; Nguyen, L. The Unfolded Protein Response: A Key Player in Zika Virus-Associated Congenital Microcephaly. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 94. [[CrossRef](#)]

15. Hou, S.; Kumar, A.; Xu, Z.; Airo, A.M.; Stryapunina, I.; Wong, C.P.; Branton, W.; Tchesnokov, E.; Götte, M.; Power, C.; et al. Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00474-17. [[CrossRef](#)]
16. Amorim, R.; Temzi, A.; Griffin, B.D.; Moulard, A.J. Zika Virus Inhibits EIF2 $\alpha$ -Dependent Stress Granule Assembly. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005775. [[CrossRef](#)]
17. Bonenfant, G.; Williams, N.; Netzband, R.; Schwarz, M.C.; Evans, M.J.; Pager, C.T. Zika Virus Subverts Stress Granules to Promote and Restrict Viral Gene Expression. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00520-19. [[CrossRef](#)]
18. Turpin, J.; Frumence, E.; Harrabi, W.; Haddad, J.G.; El Kalamouni, C.; Desprès, P.; Krejbich-Trotot, P.; Viranaïcken, W. Zika Virus Subversion of Chaperone GRP78/BiP Expression in A549 Cells during UPR Activation. *Biochimie* **2020**, *175*, 99–105. [[CrossRef](#)]
19. Turpin, J.; El-Safadi, D.; Lebeau, G.; Frumence, E.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. CHOP Pro-Apoptotic Transcriptional Program in Response to ER Stress Is Hacked by Zika Virus. *IJMS* **2021**, *22*, 3750. [[CrossRef](#)]
20. Monel, B.; Compton, A.A.; Bruel, T.; Amraoui, S.; Burlaud-Gaillard, J.; Roy, N.; Guivel-Benhassine, F.; Porrot, F.; Génin, P.; Meertens, L.; et al. Zika Virus Induces Massive Cytoplasmic Vacuolization and Paraptosis-like Death in Infected Cells. *EMBO J.* **2017**, *36*, 1653–1668. [[CrossRef](#)]
21. Ci, Y.; Liu, Z.-Y.; Zhang, N.-N.; Niu, Y.; Yang, Y.; Xu, C.; Yang, W.; Qin, C.-F.; Shi, L. Zika NS1-Induced ER Remodeling Is Essential for Viral Replication. *J. Cell Biol.* **2020**, *219*, e201903062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Turpin, J.; El Safadi, D.; Lebeau, G.; Krejbich, M.; Chatelain, C.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. Apoptosis during ZIKA Virus Infection: Too Soon or Too Late? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kim, S.; Kwon, D.; Kwak, J.-H.; Lee, S.; Lee, Y.-H.; Yun, J.; Son, T.; Jung, Y.-S. Tunicamycin-Induced ER Stress Is Accompanied with Oxidative Stress via Abrogation of Sulfur Amino Acids Metabolism in the Liver. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4114. [[CrossRef](#)]
24. Dickinson, D.A.; Forman, H.J. Glutathione in Defense and Signaling: Lessons from a Small Thiol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *973*, 488–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Grek, C.; Townsend, D.M. Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis.* **2014**, *1*, 4–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Appenzeller-Herzog, C. Glutathione- and Non-Glutathione-Based Oxidant Control in the Endoplasmic Reticulum. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 847–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hwang, C.; Sinskey, A.J.; Lodish, H.F. Oxidized Redox State of Glutathione in the Endoplasmic Reticulum. *Science* **1992**, *257*, 1496–1502. [[CrossRef](#)]
28. Woycechowsky, K.J.; Raines, R.T. Native Disulfide Bond Formation in Proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 533–539. [[CrossRef](#)]
29. Frumence, E.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; El-Kalamouni, C.; Nativel, B.; Rondeau, P.; Missé, D.; Gadea, G.; Viranaïcken, W.; Desprès, P. The South Pacific Epidemic Strain of Zika Virus Replicates Efficiently in Human Epithelial A549 Cells Leading to IFN- $\beta$  Production and Apoptosis Induction. *Virology* **2016**, *493*, 217–226. [[CrossRef](#)]
30. Viranaïcken, W.; Nativel, B.; Krejbich-Trotot, P.; Harrabi, W.; Bos, S.; El Kalamouni, C.; Roche, M.; Gadea, G.; Desprès, P. ClearColi BL21(DE3)-Based Expression of Zika Virus Antigens Illustrates a Rapid Method of Antibody Production against Emerging Pathogens. *Biochimie* **2017**, *142*, 179–182. [[CrossRef](#)]
31. Mattioli, L.; Anelli, T.; Fagioli, C.; Tacchetti, C.; Sitia, R.; Valetti, C. ER Storage Diseases: A Role for ERGIC-53 in Controlling the Formation and Shape of Russell Bodies. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2532–2541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Viranaïcken, W.; Gasmi, L.; Chaumet, A.; Durieux, C.; Georget, V.; Denoulet, P.; Larcher, J.-C. L-Ilf3 and L-NF90 Traffic to the Nucleolus Granular Component: Alternatively-Spliced Exon 3 Encodes a Nucleolar Localization Motif. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Beriault, D.R.; Werstuck, G.H. Detection and Quantification of Endoplasmic Reticulum Stress in Living Cells Using the Fluorescent Compound, Thioflavin, T. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 2293–2301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhang, Z.; Zhang, L.; Zhou, L.; Lei, Y.; Zhang, Y.; Huang, C. Redox Signaling and Unfolded Protein Response Coordinate Cell Fate Decisions under ER Stress. *Redox Biol.* **2019**, *25*, 101047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zeeshan, H.; Lee, G.; Kim, H.-R.; Chae, H.-J. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mackenzie, J.M.; Westaway, E.G. Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear to Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and along the Secretory Pathway, Respectively. *J. Virol.* **2001**, *75*, 10787–10799. [[CrossRef](#)]
37. Costin, J.M.; Zaitseva, E.; Kahle, K.M.; Nicholson, C.O.; Rowe, D.K.; Graham, A.S.; Bazzone, L.E.; Hogancamp, G.; Figueroa Sierra, M.; Fong, R.H.; et al. Mechanistic Study of Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies against Dengue Virus That Target the Fusion Loop. *J. Virol.* **2013**, *87*, 52–66. [[CrossRef](#)]
38. Roehrig, J.T.; Volpe, K.E.; Squires, J.; Hunt, A.R.; Davis, B.S.; Chang, G.-J.J. Contribution of Disulfide Bridging to Epitope Expression of the Dengue Type 2 Virus Envelope Glycoprotein. *J. Virol.* **2004**, *78*, 2648–2652. [[CrossRef](#)]
39. 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](#)]
40. Nowak, T.; Wengler, G. Analysis of Disulfides Present in the Membrane Proteins of the West Nile Flavivirus. *Virology* **1987**, *156*, 127–137. [[CrossRef](#)]
41. Chiti, F.; Dobson, C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 27–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Aoyama, K.; Nakaki, T. Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules* **2015**, *20*, 8742–8758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Merksamer, P.I.; Trusina, A.; Papa, F.R. Real-Time Redox Measurements during Endoplasmic Reticulum Stress Reveal Interlinked Protein Folding Functions. *Cell* **2008**, *135*, 933–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Shergalis, A.G.; Hu, S.; Bankhead, A.; Neamati, N. Role of the ERO1-PDI Interaction in Oxidative Protein Folding and Disease. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *210*, 107525. [[CrossRef](#)]
45. Parakh, S.; Atkin, J.D. Novel Roles for Protein Disulphide Isomerase in Disease States: A Double Edged Sword? *Front. Cell Dev. Biol.* **2015**, *3*, 30. [[CrossRef](#)]
46. Lingel, A.; Lin, H.; Gavriel, Y.; Weaver, E.; Polepole, P.; Lopez, V.; Lei, Y.; Petro, T.M.; Solomon, B.; Zhang, C.; et al. Amyloid Precursor Protein Is a Restriction Factor That Protects against Zika Virus Infection in Mammalian Brains. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 17114–17127. [[CrossRef](#)]



**Figure S1. ZIKV prM/E overexpression results in the formation of disulfide-crosslinked oligomers.** HEK-293T cells were transfected with a plasmid encoding ZIKV prM/E protein. After 24h, protein extracts were harvested and either treated or not with DTT before SDS-PAGE. Western blot assay was achieved with a rabbit anti-EDIII antibody. These images are representative of three independent experiments.

### III.2.i.b. Discussion de l'article 3

Cette publication illustre l'importance que peuvent revêtir les désordres du métabolisme oxydatif lors de l'infection par un *Flavivirus*. Le déséquilibre causé étant à l'origine de la formation d'agrégats, d'un stress du RE et d'une réponse UPR défailante. Le rôle prégnant de la glutamine dans ces désordres reste à établir, puisque le stress oxydant à l'origine de ces observations peut résulter de multiples facteurs, tels qu'une diminution de la production d'ERO-1 ou de PDI, consécutifs à l'altération de la réponse UPR. De plus, il est possible que la protéine prM/E de ZIKV soit prompte à former des agrégats de manière naturelle, sans nécessité d'un environnement oxydatif particulièrement altéré. Puisque la surexpression de cette protéine seule dans des HEK293T conduit à la formation d'agrégats. Toutefois, nous n'avons pas mesuré les changements du statut rédox dans ces conditions, pour investiguer l'action possible de la protéine prM/E de ZIKV directement sur le métabolisme oxydatif. Ces questionnements restent en suspens et devront faire l'objet d'études futures. Par ailleurs, puisque nous supposons que la formation favorisée d'agrégats pour la protéine prM/E de ZIKV découle de la présence d'une cystéine supplémentaire, il est possible de se demander si le virus tire un avantage de cette situation ? D'autant que, comme nous le verrons par la suite, ZIKV est enclin à maintenir ces déséquilibres du statut oxydo-réducteur. En effet, notre laboratoire a déjà démontré la capacité du virus Zika à limiter l'expression de l'hème oxygénase 1 (HO-1) un acteur important de la réponse antioxydante (El Kalamouni et al., 2018).

*III.2.ii. Le statut rédox est régulé lors de l'infection par ZIKV, via le contrôle de l'axe antioxydant (Article 4)*

#### III.2.ii.a. Introduction

L'implication de l'axe antioxydant, représenté d'une part par le couple GSSG/GSH et les cibles transcriptionnelles de NRF2, fait l'objet d'un intérêt certain dans la littérature concernant le virus Zika. Le bénéfice que tire ZIKV d'un déséquilibre de la balance oxydo-réductrice reste

à explorer. Il paraît contre-intuitif, vu les résultats que je présentais précédemment, que le virus s'accommode de la production de ROS importante découlant d'une altération du statut rédox, puisque ceux-ci participent à l'intégration de la réponse antivirale et sont de ce fait favorables à la cellule hôte. Pourtant, dans la littérature, la position face à la production de ROS lors d'une infection virale est divisée. Certains voient un rôle bénéfique aux ROS, via la mise en place de la réponse antivirale, d'autres lui voient des effets délétères de par l'induction d'un stress oxydant. Il est possible que nous ayons là les deux faces d'une même pièce. La production de mROS est physiologique de par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et est nécessaire à la réponse antivirale, mais leur régulation est sensée faire l'objet d'une attention particulière grâce au système antioxydant, dont GSSG/GSH, et les cibles de NRF2, comme HO-1 et la NAD(P)H déshydrogénase [quinone] 1 (NQO1) font partie. Or, il semble que lors de l'infection le virus Zika altère la production de GSH, comme nous l'avons vu précédemment. Ceci limite les capacités antioxydantes de la cellule hôte et donc mène à un stress oxydant et à ses effets délétères, ces faits ont d'ailleurs été confirmés par une autre équipe récemment ([Sahoo et al., 2023](#)). Ainsi, il est possible que le flou qui plane sur le sujet des ROS, lors de l'infection virale, soit en fait lié à un défaut dans la régulation de leur production, leur accumulation étant alors source de toxicité. Nous avons donc, une fois encore, un bel exemple d'hormésis. Sahoo et al. ont également noté la réduction de l'infection lors d'une régulation à la hausse de NRF2 et une infection exacerbée si l'expression de NRF2 était inhibée. Notre équipe avait précédemment rapporté la capacité de ZIKV à inhiber l'expression de HO-1, une cible de NRF2 ([El Kalamouni et al., 2018](#)). Puisque ZIKV est capable de limiter l'effet inhibiteur du glutathion réduit, comme le montre la diminution de cette forme lors de l'infection, il n'est pas forcément étonnant que ce virus ait également dans son arsenal de quoi inhiber l'axe NRF2. Cependant, il restait à élucider par quel moyen le virus Zika contrecarre cette réponse délétère pour lui.

Le virus Zika induit un stress oxydant, illustré par l'accumulation de ROS mitochondriaux et cytosoliques majoritairement 48 à 72 heures post-infection, dont la résolution est altérée (Sahoo et al., 2023). NRF2 qui transactive l'expression d'HO-1, NQO1 et bien d'autres cibles devrait participer à la résolution du stress oxydant induit par l'infection. Cependant, dans la suite de mes travaux, nous avons montré que la protéine NS1 est une protéine virale capable d'inhiber l'expression de HO-1, ce qui avait été rapportée précédemment (El Kalamouni et al., 2018). De plus, nous faisons la preuve ici que d'autres cibles de NRF2 comme NQO1, SQSTM1 et PDK1 présentent une expression altérée en présence de NS1 (**Article 4, Figure 1 et 3**). De manière intéressante, nous avons pu montrer que cet effet sur la balance rédox est uniquement associé à la fraction intracellulaire de la protéine NS1, puisque la stimulation de cellules avec du milieu conditionné provenant de cellules sécrétant la protéine NS1 n'a abouti à aucune modification des cibles de NRF2 (**Article 4, Figure 1 et 3**). Cependant, il se trouve que l'inhibition des cibles de NRF2 n'est pas uniforme, puisque toutes les cibles ne se trouvent pas régulées en présence de NS1. Parmi les cibles ne subissant pas de régulation, nous avons pu montrer qu'au contraire la *NADP-dependent malic enzyme* (ME-1) et la phosphogluconate déshydrogénase (PGD) sont régulées à la hausse (**Article 4, Figure 2**). Ce mode de régulation alternatif excluait selon nous un effet direct sur NRF2 ou sa protéine régulatrice KEAP1. Ce que nous avons confirmé, puisque NRF2 a plutôt une tendance à l'augmentation et KEAP1 semble plutôt diminuer, ce qui devrait favoriser l'expression de cibles telles que HO-1, NQO1 et SQSTM1, au même titre que ME-1 et PGD (**Article 4, Figure 2**). Nous avons eu l'opportunité d'étudier un peu plus en avant la régulation différentielle des cibles de NRF2 par la NS1 de ZIKV, ce qui nous a permis d'établir que la surexpression de NS1 coïncide avec une surexpression de BACH1. BACH1 est un facteur de transcription connu pour entrer en compétition avec NRF2 pour certains gènes ayant un élément de réponse antioxydant (*Antioxidant Responsive Element, ARE*) dans leur promoteur. Parmi les cibles de NRF2 pouvant subir cette compétition on compte



notamment HO-1 et NQO1. Il semble donc que le virus Zika parvienne à inhiber en partie l'axe antioxydant dépendant de NRF2 limitant les effets néfastes de cette réponse lors de l'infection.

# Zika Virus restriction of host antioxidant response is mediated by intracellular NS1, in a BACH1-related manner

## 1. Introduction

Isolated in 1947 from a sentinel rhesus macaque in the Zika forest, the Zika virus (ZIKV) has long remained marginalized, with very few reported cases of human infection [1,2]. ZIKV is an RNA virus belonging to the *flavivirus* genus, and more precisely to the clade transmitted by *Aedes spp.* mosquitoes, in the same way as Dengue (DENV) or Yellow Fever viruses [3]. However, recent years have seen the emergence of this virus following several successive epidemics in the Pacific and Latin America [4–6]. These epidemics brought this virus to the attention of the international community, and it quickly became a major concern for human health. Although ZIKV had long been harmless, outbreaks in Micronesia in 2007 and French Polynesia in 2010 led to the discovery of severe forms of ZIKV infection, as well as rare post-infection complications [4,5]. The majority of ZIKV infection's cases turn out to be asymptomatic, while symptomatic cases are commonly mild, with the development of a flu-like syndrome associating fever, headache, maculopapular rash and sometimes myalgias, arthralgias and conjunctivitis [7]. However, the large-scale epidemics that occurred have highlighted certain specificities of the Zika virus. ZIKV is the first flavivirus to demonstrate a teratogenic effect, in the form of congenital Zika syndrome, the most dramatic disorder of which is microcephaly in newborns from infected mothers, thereby revealing the ability of the virus to be transmitted via the maternal-fetal route (in addition to the sexual route) [8–11].

Like other flaviviruses, Zika virus infection is based on the synthesis of a single polyprotein, subsequently cleaved into structural proteins (capsid - C, membrane - prM and envelope - E) and nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) [12]. These proteins are involved not only in virus replication but also in interactions with the infected host, limiting counteractions such as the antiviral response [13]. Among viral proteins, flavivirus nonstructural protein 1 (NS1) holds a special place and has been particularly well described in the context of DENV infection. This 46-55 kDa glycoprotein, found in dimeric form in the endoplasmic reticulum, is known to be secreted in hexameric form, with circulating levels of approximately  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for DENV versus  $30 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  for ZIKV [14,15]. NS1 has repeatedly been associated with the pathogenesis of DENV infection, notably in the development of hemorrhagic forms [16]. This ability to destabilize the junctional integrity of endothelial cells seems to be shared by ZIKV NS1, as recently demonstrated at the blood-brain barrier [17,18]. The similarities extend even further, as we recently demonstrated a common feature of these two NS1, namely their ability to associate with extracellular vesicles during infection, which can contribute to the pathogenicity of these viruses [19].

The antioxidant response is set up by the cell to face an imbalance of pro- and antioxidant species in favor of pro-oxidant species, which can ultimately have deleterious effects on cellular functions [20]. This imbalance is associated with a ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione (GSSG / GSH) in favor of the oxidized species. The antioxidant response attempts to maintain cellular homeostasis by promoting the expression of phase II enzymes, involved in the detoxification of the reactive oxygen species generally responsible for this imbalance [20]. The antiviral response is triggered by the release of the Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), a transcription factor that is normally maintained in the cytoplasm by its interaction with Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1). NRF2 then translocates

to the nucleus where it interacts with the antioxidant responsive element (ARE), enabling expression of genes such as Heme oxygenase 1 (HO-1), Sequestome-1 (SQSTM1) or NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1) (NQO1) [20].

During viral infection, the redox status of the infected cell is of importance, and the metabolism of reactive oxygen species is often tightly controlled by the virus. Indeed, the cytoprotective effects associated with the antioxidant response have regularly been shown to be counterproductive for viruses during infection. The use of polyphenols to limit viral infection, by enhancing these cytoprotective activities, is indicative of the importance of the antioxidant response in the management of viral infection [21]. We previously showed that ZIKV was able to subvert HO-1 expression, and this cellular protein seems to show promising effects during infection [22]. Control of the redox balance can lead to the appearance of misfolded proteins, as in the case of the ZIKV E protein, thus contributing to the pathogenicity of the virus through endoplasmic reticulum stress [23–26]. Understanding the mechanisms that enable the virus to disrupt this system is therefore particularly relevant, to prevent the emergence of such disorders. However, to date, the viral determinant responsible for this subversion remains unknown. A link does exist between the host antioxidant system and the NS1 protein of flaviviruses, whether DENV or TBEV [27,28]. However, in both cases, NS1 appeared to activate the antioxidant system, in contrast to the effect observed in ZIKV infection. In fact, TBEV NS1 activates the NRF2/ARE axis, leading to the expression of phase II detoxification enzymes [28]. Based on these data, we hypothesize that the negative effect on HO-1 and potentially on the antioxidant system during ZIKV infection could be mediated by the NS1 protein. To test this hypothesis, we decided to evaluate the development of the antioxidant response in the presence of the ZIKV NS1 protein, using a stable line expressing this protein. Thus, we were able to show that intracellular NS1 was able to alter the expression of certain genes under the control of NRF2, but that this effect does not extend to all NRF2 targets. Interestingly, this variation appears to be related to a higher expression of BACH1, a factor that may be involved in the regulation of specific genes under the control of an ARE element.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Cells, plasmids and reagents*

The human embryonic kidney 293A (HEK293A) cells are adherent cells (CVCL\_6910) suitable for establishing a protein expressing cell line. The mammalian codon-optimized sequence coding for the NS1 signal peptide, followed by the amino acids 1 to 352 of NS1 protein from ZIKV strain BeH819015, was synthesized by Genecust (Boynes, France). The synthetic NS1 gene was cloned into *Kpn I* and *Xho I* restriction sites of the pcDNA3.1(+) Neo plasmid (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) to generate pcDNA3/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup>. In this construct, a glycine–serine spacer and a FLAG-tag sequence followed the NS1 sequence. Lipofectamine™ 3000 reagent (L3000-015) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Geneticin (ref. A1720) was obtained from Sigma-Aldrich. Actinomycin D (A9415) was purchased from Sigma-Aldrich.

### *2.2. DNA transfection and stable cell line generation*

For the expression of the recombinant ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup>, the construct was the one we previously designed, characterized, and used [29]. Briefly, in order to generate a HEK293A cell line expressing ZIKV-NS1<sup>FLAG-Tag</sup> (HEK293A-NS1), cells were plated in a 6-well plate. At 70–80% of cell confluence, HEK293A cells were transfected by lipofection using Lipofectamine™ 3000 reagent, according to the manufacturer's recommendations, with 2.5 µg of DNA. Selection of cells expressing ZIKV-NS1<sup>FLAG-Tag</sup> was achieved using geneticin at 1 mg·mL<sup>-1</sup>. Simultaneously, mock-transfected cells were selected, generating an empty vector HEK293A cell line (HEK293A-EV) that served as control for all experiments.

### 2.3. Cell culture and cell stimulation

HEK293A-ZIKV and HEK293A-EV cells were cultured for maintenance at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in 4,5 g·L<sup>-1</sup> glucose Dubecco's Modified Eagle's Medium – DMEM (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Dutscher, Brumath, France), 100 U·mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.5 µg·mL<sup>-1</sup> amphotericin B (PAN Biotech, Dutscher, Brumath, France) and 250 µg·mL<sup>-1</sup> geneticin.

For assessment of paracrine effect of NS1, HEK293T were used. HEK293T were cultured for maintenance at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in 4,5 g·L<sup>-1</sup> glucose Dubecco's Modified Eagle's Medium – DMEM (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Dutscher, Brumath, France), 100 U·mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.5 µg·mL<sup>-1</sup> amphotericin B (PAN Biotech, Dutscher, Brumath, France). Cells were plated in 6-well plate and at 70-80% of confluence cells were stimulated with either cell culture supernatant (CCS) from HEK293A-NS1 or HEK293A-EV, 1:2 diluted in fresh DMEM.

### 2.4. RT-qPCR

Total RNA has been extracted from cell lysates by using the RNeasy Plus Mini Kit (cat. 74136, Qiagen, Hilden, Germany). The total cDNA was obtained by reverse transcription using random primers from Invitrogen (ref. 58875, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) and M-MLV reverse transcriptase enzyme (ref. M1708, Promega, Madison, WI, USA) at 42 °C for 60 minutes. cDNA was then subjected to a quantitative polymerase chain reaction, using a CFX96 Connect™ Real Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For amplification, BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (ref. G892-1, Applied Biological Materials, Vancouver, Canada) and specific primers were used to assess gene transcripts expression for following targets: HO-1, SQSTM1, NQO1, NRF2, ME1, LDHA, GCLM, PGD, PDK1, TXNRD1, and RNA polymerase II. A threshold cycle (Ct) was calculated for each single sample amplification reaction in the exponential phase of amplification, using Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Data obtained were normalized expression versus expression of RNA polymerase II, serving as housekeeping gene and presented as fold change from control using 2<sup>-ΔΔCt</sup> method.

Gene	Forward primer	Reverse primer
RNA polymerase II	5'-GAGAGCGTTGAGTTCCAGAACC-3'	5'-TGGATGTGTGCGTTGCTCAGCA-3'
HO-1	5'-ATGACACCAAGGACCAGAGC-3'	5'-GTGTAAGGACCCATCGGAGA-3'
SQSTM1	5'-AAATGGGTCCACCAGGAACTGGA-3'	5'-TCAACTCAATGCCAGAGGGTTA-3'
NQO1	5'-CGAGAGCCTAGTTCCGGC-3'	5'-CATGGCATAGAGGTCCGACT-3'
NRF2	5'-CCTCAACTATAGCGATGCTGAATCT-3'	5'-AGGAGTTGGGCATGAGTGAGTAG-3'
ME1	5'-CCTGGCCAAGGCAACAATTC-3'	5'-GGAGGATAAAGCCGACCCTC-3'
LDHA	5'-GGATCTCCAACATGGCAGCCTT-3'	5'-AGACGGCTTTCTCCCTCTTGCT-3'
GCLM	5'-TATCAGTGGGCACAGGTA-3'	5'-CACAATGACCGAATACCG-3'
PGD	5'-CATGCAAATCAACCATGCCA-3'	5'-ACAACCAGGTCAGCGTCAGATC-3'
PDK1	5'-CATGTCACGCTGGGTAATGAGG-3'	5'-CTCAACACGAGGTCTTGGTGCA-3'
TXNRD1	5'-GTTACTTGGGCATCCCTGGTGA-3'	5'-CGCACTCCAAAGCGACATAGGA-3'

### 2.5. Western blot

Cells were harvested in TEN buffer (0.1 M Tris-Cl pH 8.0, 0.01 M EDTA pH 9.0, and 1 M NaCl), and lysed by sonication at 0°C for 1 min of pulse at 40% at 0.5 cycle using an Omni-Ruptor 4000 (Omni International, Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France). Proteins from total cell extract were quantified using BCA reagent according to manufacturer instructions (Sigma-Aldrich, Humeau, La Chapelle-Sur-Erdre, France). A standardized amount of protein extracts was treated with Laemmli buffer containing 10 mM DTT and heated at 95 ° C for 5 min. 15 µg of proteins were separated on

SDS-PAGE gel at 150V constant for 1 hour. Transfer was performed on NC Protan supported membrane with 0.45  $\mu$ m pores (Amersham, GE, Buc, France) at 60 mA constant per gel for 2 hours using a semi-dry system. After transfer, the membranes were saturated with 5% nonfat dry milk in PBS – Tween 0.1%. Membranes were then incubated successively with primary antibodies and secondary antibodies diluted in PBS – Tween 0.1% – 1% nonfat dry milk, using the antibodies described below. Blots were revealed with enhanced chemiluminescence, ECL prime detection reagents (GE, Buc, France) using an Amersham Imager 680 (GE, Buc, France).

Target	Reference	Dilution
Mouse anti-HO-1	sc-136960 (Santa Cruz)	1:200
Rabbit anti-SQSTM1	P0067 (Sigma Aldrich)	1:1000
Rabbit anti-KEAP1	FNab04516 (FineTest)	1:1000
Mouse anti-FLAG	sc-166355 (Santa Cruz)	1:200
Mouse anti-BACH1	sc-271211 (Santa Cruz)	1:200
Rabbit anti- $\beta$ -Tubulin	AC008 (ABclonal)	1:1000
Goat anti-rabbit immunoglobulin-HRP	AB_2313567 (Jackson ImmunoResearch)	1:5000
Goat anti-mouse immunoglobulin-HRP	AB_10015289 (Jackson ImmunoResearch)	1:5000

## 2.6. Statistical analyses

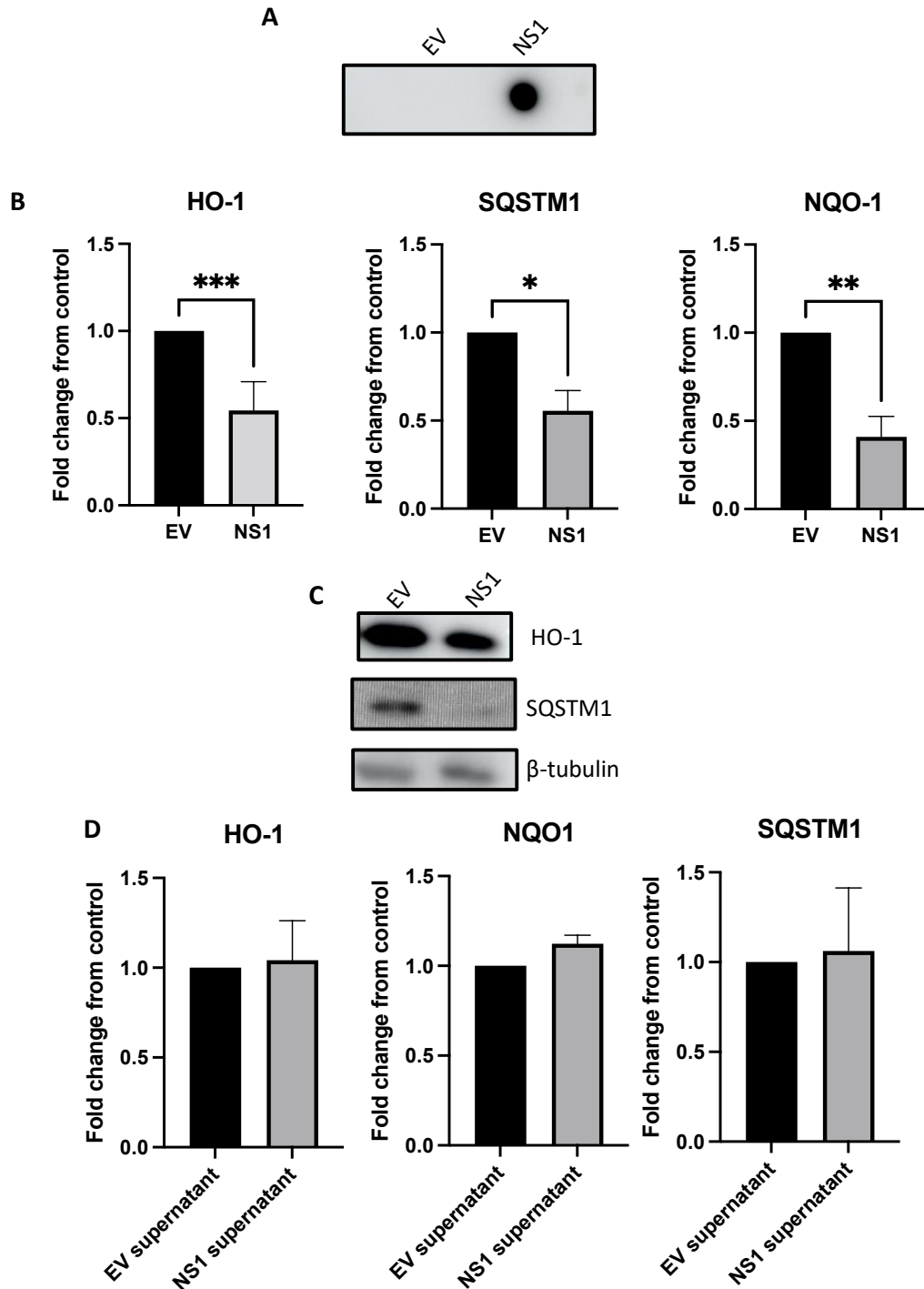
For all figures, statistical analyses were performed by T-test correction using Graph-Pad Prism software version 9. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. The degrees of significance are indicated in the figures captions as follow: \* $p < 0.0332$ ; \*\*  $p < 0.0021$ ; \*\*\*  $p < 0.0002$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 3. Results

### 3.1. NS1 mediates ZIKV-associated subversion of HO-1 axis

We have previously demonstrated the ability of Zika virus to circumvent the antioxidant system of the infected host by altering the expression of heme oxygenase 1. To test the validity of our hypothesis concerning the involvement of NS1 in this previous observation, we decided to use the HEK293A cell line that expresses stably the NS1<sup>FLAG-Tag</sup> protein. We have already used these cells on several occasions and they have been described in detail elsewhere [19,29]. Briefly, they are capable of producing the dimeric form of the ZIKV NS1 protein and secreting it into the culture supernatant [19,29]. Nevertheless, before using these cells to investigate the role of NS1 in HO-1 subversion, we first checked the expression of this protein by Dot Blot in the cell culture supernatant. As shown in **Figure 1A**, using an anti-FLAG antibody, we obtained a strong signal in the supernatant of HEK293A-NS1 cells, in contrast to HEK293A-EV cells, attesting to the expression and secretion of NS1 by these cells.

We then explored the effect of NS1 on the expression of HO-1 and other NRF2 targets, namely SQSTM1 and NQO1. Similar to what was previously observed upon infection with different ZIKV strains, NS1 induced a halving of the number of HO-1 transcripts detectable basally by RT-qPCR. SQSTM1 and NQO1 are similarly down-regulated, with transcriptional levels also reduced by half (**Figure 1B**). The altered expression of HO-1 and SQSTM1 by NS1 is also reflected at the protein level, since we detected a weaker signal for these proteins by Western blot in cells that stably expressed ZIKV-NS1 compared to control cells (**Figure 1C**).



**Figure 1 – Intracellular fraction of Nonstructural protein 1 subverts antioxidant response during ZIKV infection.** (A) ZIKV NS1 is expressed and secreted in the supernatant of HEK293-NS1 cells. Dot blot assay was achieved using mouse anti-FLAG antibody on the supernatant of HEK293A-NS1 versus HEK293A-EV. This image is representative of three independent experiments. (B, C) HO-1 and other antioxidant effectors are repressed by ZIKV NS1. (B) Expression of heme oxygenase 1 (HO-1), sequestome-1 (SQSTM1) and NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1) (NQO1) have been assessed by RT-qPCR in HEK293A-NS1 versus HEK29A-EV. Results are expressed as fold change from HEK293A-EV, following normalization with expression of RNA polymerase II RNA as a housekeeping gene. The error bars represent standard errors of three independent experiments. \* $p < 0.0332$ ; \*\*  $p < 0.0021$ ; \*\*\*  $p < 0.0002$ . (C) HO-1 and SQSTM1 production has been assessed by western blot, using mouse anti-HO-1, rabbit anti-SQSTM1 and rabbit anti- $\beta$ -tubulin. These images are representative of three independent experiments. (D) ZIKV NS1 effect on antioxidant response is limited to the intracellular fraction of NS1. Expression of heme oxygenase 1 (HO-1), sequestome-1 (SQSTM1) and NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1) (NQO1) have been assessed by RT-qPCR in HEK293T stimulated with either conditioned medium from HEK293A-EV or HEK293A-

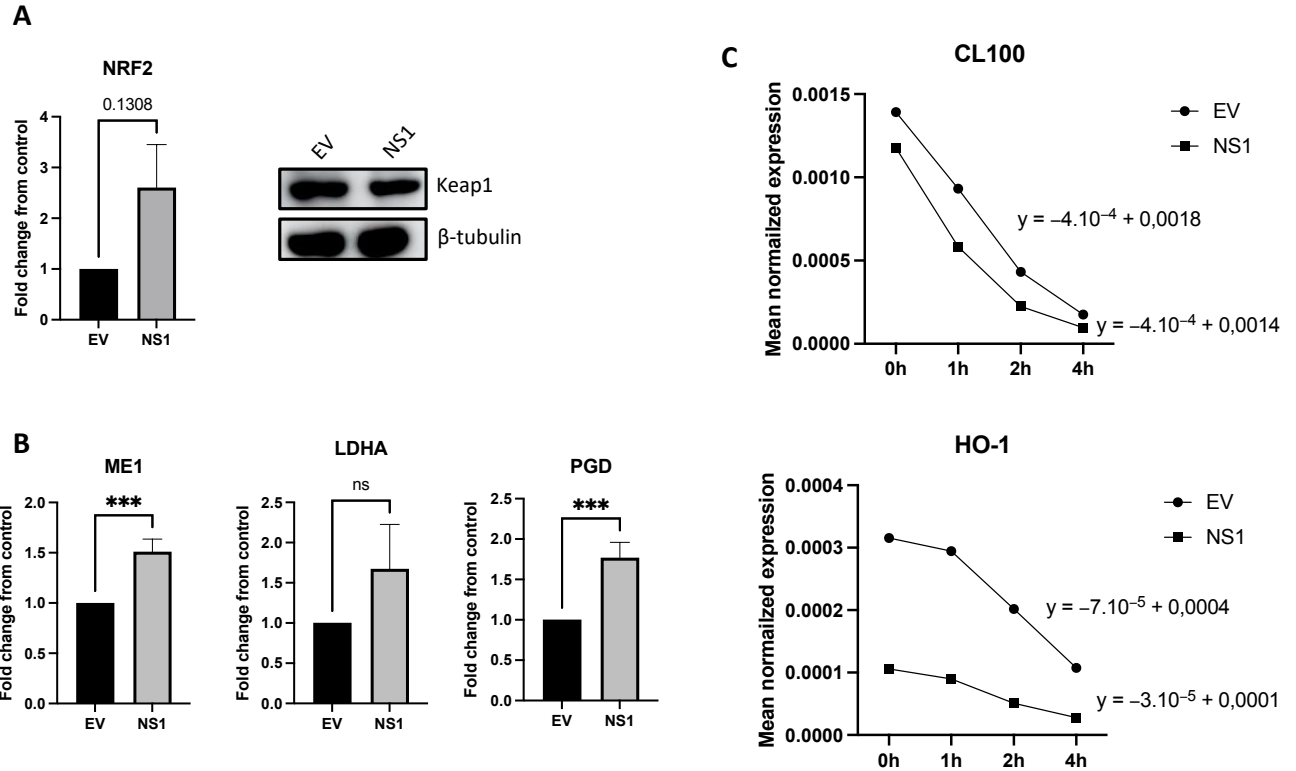
NS1. Results are expressed as fold change from control cells, following normalization with expression of RNA polymerase II RNA as a housekeeping gene. The error bars represent standard errors of three independent experiments.

NS1 is an exceptional viral protein, as it is one of the rare ones to have the ability to be secreted, especially in such large amounts. Since for other flaviviruses (*i.e.*, DENV), the pathogenic effects of NS1 are mediated by the circulating part of the protein, we wondered whether the subversion of the antioxidant system caused by NS1 was mediated by the fraction found in the extracellular compartment. To test this, we decided to culture HEK293T cells with conditioned medium derived from HEK293A-NS1 or HEK293A-EV for 24 hours. By RT-qPCR (**Figure 1D**), we did not detect any differences in the expression of HO-1, NQO1, or SQSTM1 between cells cultured with conditioned medium from HEK293A-NS1 or HEK293A-EV. We were thus able to show that the inhibitory effect of ZIKV NS1 was limited to the pool of proteins found in the intracellular compartment.

### 3.2. Variable effect of NS1 on ARE-dependent genes is related to BACH1 overexpression

We then devoted our efforts to deciphering the mechanism by which NS1 inhibits the establishment of the antioxidant response by the NRF2/ARE axis. NRF2 activity is enabled by its translocation to the nucleus after release by KEAP1. The first hypotheses that we obviously raised were that NS1 would interfere by decreasing NRF2 transcription and protein expression or, on the contrary, by increasing the stability of KEAP1, thus reducing the pool of active NRF2. Unfortunately, as shown in **Figure 2A**, neither of these hypotheses proved to be correct, since NRF2 expression tested by RT-qPCR instead showed an upward trend in HEK293A-NS1 compared to HEK293A-EV, while KEAP1 production tested by Western blot reported a similar level between our two cell types. In corroboration with these results, other NRF2 targets, such as malic enzyme 1 (ME1), lactate dehydrogenase A (LDHA), or phosphogluconate dehydrogenase (PGD), did not show a similar alteration of the antioxidant axis genes, with a similar or even higher expression level in the presence of NS1 (**Figure 2B**).

Since not all NRF2 targets appeared to be affected, we assumed a post-transcriptional effect of NS1. Among the possibilities of post-transcriptional regulation, we retained the idea of destabilization of the mRNAs of certain NRF2 targets, namely HO-1, NQO1, and SQSTM1. To assess this, we decided first to compare the half-life of the HO-1 transcript in HEK293A-NS1 versus HEK293A-EV. To do so, we blocked the transcriptional activity of RNA polymerase II by stimulating cells with  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  actinomycin D. We then monitored HO-1 expression levels at different time points for 4 h, in order to follow the degradation of this transcript. In parallel, we measured CL100 expression as a control, since the transcript of this gene has a short half-life and was found to be sensitive to actinomycin D activity. As shown in **Figure 2C**, while CL100 expression levels were slightly lower in HEK293A-NS1, there was no difference in transcript half-life, as the slope found for the expression of this transcript over time is similar between our two conditions. Regarding HO-1, we found the same difference in basal expression as previously observed. In terms of half-life, we were also able to detect a difference between HEK293A-NS1 and HEK293A-EV after inhibition of transcription by actinomycin D. However, contrary to our assumption, HO-1 transcript degradation appears to be slower in the presence of NS1, with a twofold lower slope in this condition (**Figure 2C**).

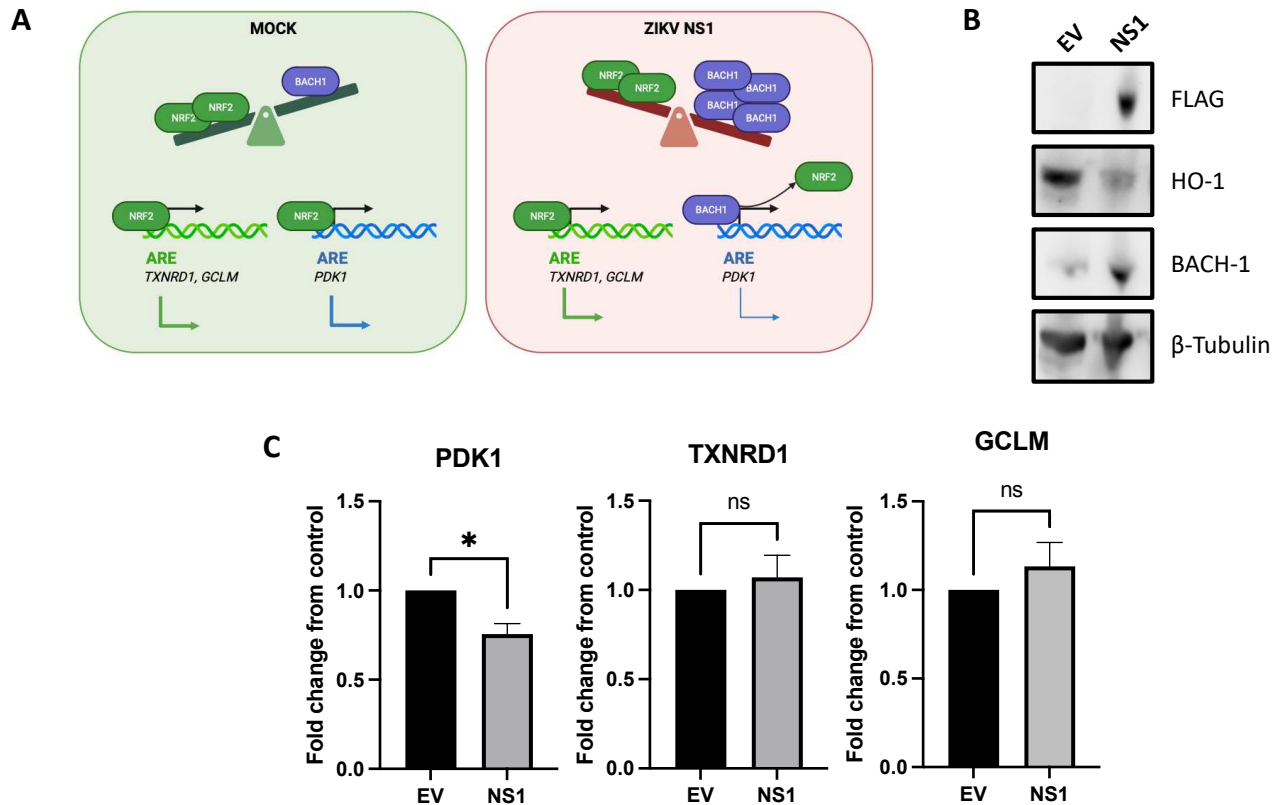


**Figure 2 – Partial effect on NRF2 targets is not related to the NRF2/Keap1 axis nor to the instability of target mRNAs.** (A) NRF2 and Keap1 are not affected by NS1 expression. (Left) Expression of Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) has been assessed by RT-qPCR in HEK293A-NS1 versus HEK29A-EV. Results are expressed as fold change from HEK293A-EV, following normalization with expression of RNA polymerase II RNA as a housekeeping gene. The error bars represent standard errors of three independent experiments. (Right) Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) production has been evaluated by western blot, using rabbit anti-Keap1 and rabbit anti- $\beta$ -tubulin. These images are representative of three independent experiments. (B) Other targets of NRF2 are regulated in an opposite way in presence of NS1. Expression of malic enzyme 1 (ME1), lactate dehydrogenase A (LDHA) and phosphogluconate dehydrogenase (PGD) has been assessed by RT-qPCR in HEK293A-NS1 versus HEK29A-EV. Results are expressed as fold change from HEK293A-EV, following normalization with expression of RNA polymerase II RNA as a housekeeping gene. The error bars represent standard errors of three independent experiments. \*\*\*  $p < 0.0002$ . (C) ZIKV NS1 does not reduce HO-1 mRNA half-life. HEK293A-EV and NS1 were submitted to a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  actinomycin D treatment during a time course of 4h. Inhibition of RNA polymerase II by actinomycin D permitted to follow the dynamic of degradation of mRNA. Expression of heme oxygenase 1 (HO-1) and CL100 (serving as control gene) have been assessed by RT-qPCR in HEK293A-NS1 versus HEK29A-EV, at each hour. Results are expressed as mean normalized results versus RNA polymerase II RNA used as a housekeeping gene.

We then considered the possibility of BTB domain and CNC homolog 1 (BACH1)-dependent regulation of NRF2 targets. Like NRF2, BACH1 is a transcription factor that belongs to the b-Zip family of proteins. BACH1 is able to compete with NRF2 for interaction with the ARE promoter. Thus, it is known that BACH1 can reduce NQO1 expression by limiting NRF2 access to its binding site [30]. This ability to regulate NRF2 targets is not limited to NQO1, and other genes such as HO-1 are also affected [31]. However, this effect is not ubiquitous among ARE promoter-dependent genes and could explain the discrepancies observed in the regulation of NRF2 targets by NS1 (**Figure 3A**). Indeed, while BACH1 regulates HO-1, NQO1, and pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1 (PDK1), no effect has been reported for other genes such as thioredoxin reductase 1 (TXNRD1) or glutamate-cysteine ligase regulatory subunit (GCLM), also dependent on the ARE promoter [31,32]. Therefore, we wanted to determine whether the differential regulation of NRF2 targets in the presence of NS1 could be linked to BACH1. Western blot analysis revealed an increase in the signal for BACH1 in HEK29A-NS1 cells, reflecting a greater quantity of BACH1 in these cells (**Figure 3B**). Furthermore, this increase was accompanied by differential regulation of ARE-dependent genes, as previously PDK1, as well as HO-1, NQO1 and SQSTM1,



suffered a halving of its expression (**Figure 3C**). Whereas TXNRD1 and GCLM, on which BACH1 is known to have no effect, are not regulated (**Figure 3C**). This supports the conclusion that BACH1 expression increases in the presence of NS1. BACH1 therefore competes with NRF2 at its ARE binding site for specific genes, while the initiation of transcription of other genes can be maintained by NRF2.



**Figure 3 – ZIKV NS1 inhibits specific NRF2 targets in a BACH1-related manner.** (A) Hypothesized BACH1-associated regulation of certain ARE dependent genes in presence of ZIKV NS1. BTB domain and CNC homolog 1 (BACH1) is known to compete with NRF2 at the ARE promoter of certain genes. We therefore hypothesize that NS1 affects BACH1 expression, leading to differential regulation of NRF2 targets under ARE control. (B) BACH1 level is higher in cells expressing ZIKV NS1. ZIKV NS1, HO-1 and BACH1 production has been assessed by western blot, using mouse anti-FLAG, mouse anti-HO-1, rabbit anti-BACH1 and rabbit anti- $\beta$ -tubulin. These images are representative of three independent experiments. (C) Genes dependent on ARE are not ubiquitously downregulated in presence of ZIKV NS1. Expression of pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1 (PDK1), thioredoxin reductase 1 (TXNRD1) and glutamate-cysteine ligase regulatory subunit (GCLM) have been assessed by RT-qPCR in HEK293A-NS1 versus HEK293A-EV. Results are expressed as fold change from HEK293A-EV, following normalization with expression of RNA polymerase II RNA as a housekeeping gene. The error bars represent standard errors of three independent experiments. \* $p < 0.0332$ .

#### 4. Discussion

The antiviral response is more than just the measures taken by the immune system to get rid of the pathogen responsible for an infection. It encompasses all host reactions in the case of infection, from the canonical antiviral response, the interferon response, to programmed cell death, which can limit virus dissemination. It also involves the development of an appropriate metabolism with the implementation of these counter-actions. Among the metabolic conditions that can interfere with viral infection, redox status and its regulation by the antioxidant response have regularly shown their relevance [33]. Whether it's mitochondrial ROS promoting the interferon response via MAVS oligomerization, or the antioxidant response for its cytoprotective effects, enhanced by the use of plant-derived polyphenols, we are now focusing on this aspect during viral infection [21,33,34]. Previously, we had concluded that HO-1, which has gained interest as a super cytoprotective agent, could make an ideal candidate for Zika virus restriction,

given the promising effect we had observed [22]. However, we had no choice but to mitigate this enthusiasm, since ZIKV turned out to be able to inhibit HO-1 expression [22].

In the present work, we revealed that the ability of ZIKV to limit HO-1 expression was mediated by the intracellular fraction of the viral protein NS1 (**Figure 1**). We also showed that this effect was not limited to HO-1, but also to certain other NRF2 targets such as NQO1, SQSTM1 and PDK1 (**Figures 1 and 3**). Inhibition of these targets is dependent on the transcription factor BACH1, which competes with NRF2 (**Figure 3**), explaining the limitation of this effect to a few specific ARE-dependent NRF2 targets (**Figures 2 and 3**).

To our knowledge, these data are the first to report that destabilization of the antioxidant system by Zika virus is dependent on NS1 via BACH1. Such regulation appears to be peculiar among flaviviruses, since TBEV and DENV seem to promote the antioxidant response on the contrary [27,28]. Furthermore, NS1 from DENV-1 and DENV-2 does not seem to have the same effect on HO-1, NQO1 and SQSTM1 (data not shown). We consider this discovery to be of great importance in countering the pathogenic effects of ZIKV. Indeed, as we have shown previously, ZIKV induces a destabilization of the redox balance during infection, leading to the accumulation of misfolded proteins in the form of viral protein E aggregates [23]. Aggregate formation seems to be an integral part of the cytotoxicity and hence pathogenesis involved in ZIKV infection, and could be amplified by the control of the unfolded protein response that ZIKV is able to achieve [25]. Thus, counteracting the destabilization of the redox balance, undeniably promoted by the inhibition of the antioxidant system demonstrated here, seems an interesting approach to limiting the deleterious effects of infection.

However, some aspects remain to be elucidated, and it seems that the repression of HO-1 expression observed at protein level in this study appears weaker than previously using either full ZIKV or a ZIKV replicon [22]. At the time, we observed a complete abolition of HO-1 expression during infection, while a residual signal remains present in HEK293A-NS1. However, the level of transcriptional expression is similar between our two studies. It is therefore possible that the inhibition of the antioxidant system is not limited to a transcriptional effect of NS1, but that another non-structural protein of the virus is involved at the translational or post-transcriptional level, since the same effect was found between the complete virus and the replicon. This need to be addressed in further studies.

Furthermore, to certify the link between NS1, BACH1 and regulation of the antioxidant system, a BACH1 inhibitor such as ASP8731 could be applied in our cell model, to confirm that impaired NRF2 targets restore their basal expression levels [35]. These data would make it possible to consider BACH1 as a therapeutic target in the struggle against ZIKV infection. Indeed, in our previous work, we concluded that the use of Hemin, which promotes HO-1, was likely to be limited by ZIKV inhibitory effect on HO-1 [22,36]. Likewise, all therapeutic opportunities involving the use of plants and their cytoprotective effect seem limited [21]. However, if a BACH1 inhibitor was able to counteract the destabilization of the antioxidant system by NS1, all these avenues could once again be of interest in combating the pathogenic effects of ZIKV.

## References

- [1] Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1952;46:509–20. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).
- [2] Buechler CR, Bailey AL, Weiler AM, Barry GL, Breitbart ME, Stewart LM, et al. Seroprevalence of Zika Virus in Wild African Green Monkeys and Baboons. *MSphere* 2017;2:e00392-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00392-16>.
- [3] Grard G, Moureau G, Charrel RN, Holmes EC, Gould EA, De Lamballerie X. Genomics and evolution of Aedes-borne flaviviruses. *Journal of General Virology* 2010;91:87–94. <https://doi.org/10.1099/vir.0.014506-0>.

- dependent genes in human venous and coronary artery endothelial cells adapted to physiological oxygen levels. *Free Radical Biology and Medicine* 2016;92:152–62. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.013>.
- [32] Fischhuber K, Matzinger M, Heiss EH. AMPK Enhances Transcription of Selected Nrf2 Target Genes via Negative Regulation of Bach1. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:628. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00628>.
- [33] Herengt A, Thyrted J, Holm CK. NRF2 in Viral Infection. *Antioxidants* 2021;10:1491. <https://doi.org/10.3390/antiox10091491>.
- [34] Buskiewicz IA, Montgomery T, Yasewicz EC, Huber SA, Murphy MP, Hartley RC, et al. Reactive oxygen species induce virus-independent MAVS oligomerization in systemic lupus erythematosus. *Sci Signal* 2016;9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf1933>.
- [35] Belcher JD, Nataraja S, Abdulla F, Zhang P, Chen C, Nguyen J, et al. The BACH1 inhibitor ASP8731 inhibits inflammation and vaso-occlusion and induces fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Front Med* 2023;10:1101501. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1101501>.
- [36] Huang H, Falgout B, Takeda K, Yamada KM, Dhawan S. Nrf2-dependent induction of innate host defense via heme oxygenase-1 inhibits Zika virus replication. *Virology* 2017;503:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.019>.

### III.2.ii.b. Discussion de l'article 4

La réponse antivirale établie en cas d'infection va au-delà de la réponse IFN canonique que nous avons étudiée. En effet, un nombre insoupçonné de réponses cellulaires, telles que l'apoptose, l'UPR ou la réponse antioxydante peuvent influencer sur le devenir de la progénie virale (Cervantes et al., 2023; Sahoo et al., 2023). Ces réponses sont toutefois souvent atténuées par le pathogène, comme c'est le cas ici. Ces résultats s'inscrivent dans la lignée de travaux qui avaient été déjà initiés dans le laboratoire PIMIT et complètent le mécanisme d'action par lequel ZIKV s'accommode de la réponse antioxydante, particulièrement de l'axe dépendant de NRF2. Nos résultats laissent à penser que la protéine virale NS1 permet une expression plus importante de BACH1 limitant l'expression de certaines cibles de NRF2 qui sont délétères pour le virus. Parmi ces cibles, on peut compter HO-1, dont l'effet sur l'infection par ZIKV s'est déjà montré prometteur. Les résultats sont à corrélérer avec une augmentation de l'expression de Bach1 notée par une étude transcriptomique de cellules infectées par ce virus (K. Singh et al., 2022). Cependant, nous n'avons établi aucun lien de cause à effet entre l'augmentation de l'expression de BACH1 et l'inhibition des cibles de NRF2. Pour ce faire, plusieurs méthodes pourraient être employées, comme l'utilisation d'ARN interférents spécifiques de Bach1 ou encore l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de BACH1 (ASP8731). Ceci afin de vérifier si l'inhibition de BACH1 permet de restaurer l'expression de HO-1 et des autres cibles impactées, rétablissant *de facto* l'effet antiviral de l'axe NRF2 (Cervantes et al., 2023; El Kalamouni et al., 2018). Par ailleurs, BACH1 est une protéine dont la localisation nucléaire est régulée (X. Zhang et al., 2018), nous devrions donc nous assurer que l'augmentation de son expression, que nous avons détecté par Western Blot, est corroborée avec une augmentation de la localisation nucléaire de la protéine. Enfin, ces travaux laissent en suspens le mode d'action de NS1 vis-à-vis de BACH1. En temps normal, l'expression de BACH1 est régulée par les niveaux d'hème intracellulaire. Si ces niveaux sont satisfaisants, BACH1 est retrouvé au niveau nucléaire, où il peut jouer son

rôle inhibiteur. Au contraire, si le niveau de synthèse de l'hème est insuffisant, comme c'est le cas lors d'un stress oxydant, un export nucléaire de BACH1 est réalisé permettant l'expression de protéines aux propriétés antioxydantes (H. Suzuki et al., 2004). Ici, ce que nous observons est une augmentation du pool total de BACH1, signifiant soit une augmentation de son expression, soit une diminution de sa dégradation, le mécanisme restant à élucider. De plus, les données obtenues sur les cibles de NRF2, laissent présager que NS1 permettrait de maintenir la localisation nucléaire de BACH1, peut-être via la même voie de régulation qui implique les niveaux d'hème ? Toutefois, puisqu'il a déjà été démontré que le virus Zika augmente la transcription de Bach1, la théorie du rasoir d'Ockham voudrait que l'effet que nous privilégions dans un premier lieu soit une régulation transcriptionnelle de ce gène par NS1. La surexpression de la protéine BACH1 retrouvée dans notre étude serait alors liée à cette régulation transcriptionnelle et pourrait expliquer l'inhibition des cibles de NRF2. Si et seulement si, l'augmentation de l'expression de BACH1 est associée à une plus grande quantité de protéine importée dans le noyau, ce qui pourrait être évalué par un fractionnement.

**Discussion générale et  
perspectives**

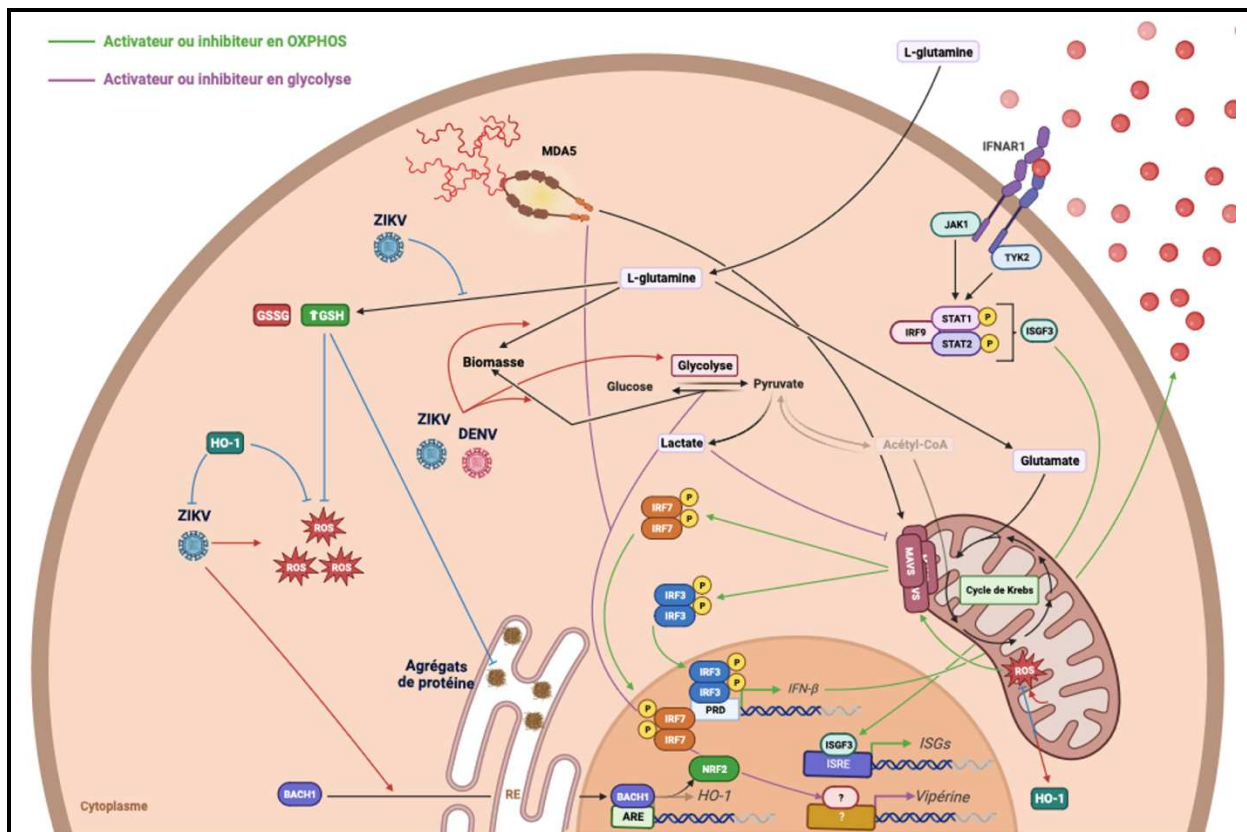
#### **IV. Discussion générale et perspectives**

L'humanité a fait face à sa première pandémie majeure du XXI<sup>ème</sup> siècle à travers la pandémie de SARS-CoV-2 survenue entre 2020 et 2022. Si, plusieurs pathogènes ont sonné comme des coups de semonce marquant peu à peu l'entrée dans l'ère d'émergence des virus, aucun n'avait, jusqu'à l'heure, autant menacé les systèmes de santé et économique à l'échelle mondiale. Parmi les émergences ayant eu lieu en amont de cette épidémie, l'émergence du virus Zika entre 2007 et 2019 a certes été plus discrète, mais a été à l'origine d'une préoccupation internationale de par le développement de formes graves chez les nouveau-nés (Cao-Lormeau et al., 2014; Faria et al., 2016; Lanciotti et al., 2008). Si les *Flavivirus*, comme ZIKV et DENV, semblent présenter un risque moins important pour la dissémination que des pathogènes transmis par voie aérienne, il ne faut pas sous-estimer l'influence qu'aura le réchauffement climatique sur l'expansion du territoire des moustiques vecteurs de ces virus (Yi et al., 2014). Ceci pouvant conduire à l'endémicité de ces virus dans des régions pour l'instant exemptes d'infection. Devant la proportion dramatique que les épidémies d'origine virale peuvent causer, l'accumulation de connaissances sur les interactions entre hôte et pathogène est indispensable pour faire face aux risques d'émergence ou ré-émergence et aux pandémies futures. Parmi les réponses cellulaires et moléculaires déterminantes pour juguler l'infection par le virus, il y a la réponse antivirale, incluant dans notre étude la réponse interférons classique et également comme nous avons pu le voir, la réponse antioxydante, auxquelles j'ai décidé de m'intéresser en démarrant ma thèse. Cependant, la majorité de nos travaux s'est portée sur l'influence du métabolisme cellulaire dans l'établissement de ces réponses. Ceci, en tentant d'évaluer l'effet diaphonique des modulations du métabolisme de l'hôte sur leur mise en place, en cas d'infection. La réponse IFN semble être un exemple concret d'immunométabolisme appliqué à la réponse antivirale. En effet, la détection des motifs moléculaires d'origine virale est dépendante

d'un métabolisme cellulaire adéquat, tout comme la production des effecteurs antiviraux comme nous l'avons vu (Buskiewicz et al., 2016; Cao et al., 2008; W. Zhang et al., 2019).

Nous avons illustré, avec nos modèles, l'importance de la phosphorylation oxydative, via le métabolisme glutaminergique, dans ces mécanismes de réponse cellulaire et les conséquences néfastes de l'accroissement du métabolisme glycolytique lors de l'infection virale (**Figure 40**). Par ailleurs, la glutamine et son rôle dans le métabolisme oxydatif semblent être un point de levier important pendant l'infection par les *Flavivirus*, particulièrement vis-à-vis du système antioxydant, comme le reflète la variation des taux de glutathion lors de l'infection. À cela s'ajoute le contrôle du système antioxydant dépendant de NRF2 par le virus Zika. Cette mainmise sur les acteurs du métabolisme oxydatif confère aux *Flavivirus* la capacité d'assurer un environnement oxydant qui leur est propice et qui pourrait être la source de phénomènes participant à la pathogenèse de l'infection. Ainsi, l'environnement oxydant retrouvé lors de l'infection par ZIKV est à l'origine de la formation d'agrégats protéiques qui pourrait être associés au développement futur de maladies neurodégénératives, le repliement inadéquat et l'agrégation de protéines constituant les mécanismes sous-jacents aux principales maladies de ce genre. La formation des agrégats intervient dans ce cas des années avant le développement de la maladie. Un tel mécanisme semble envisageable, d'autant que des nouveau-nés infectés *in utero* ont développé des atteintes du système nerveux à distance de l'infection (Aragao et al., 2017; Mavigner et al., 2018; Van Der Linden et al., 2016).





**Figure 40 – Schéma récapitulatif de l'influence du métabolisme oxydatif lors de l'infection par DENV et ZIKV.** La détection du génome viral (ou d'un mimétique) par les *RIG-I-like receptors* (RIG-I et MDA5) aboutit classiquement à une signalisation IRF-dépendante et de manière subséquente à la sécrétion d'interférons de type I. Ces interférons une fois sécrétés induisent l'expression et la production d'ISGs, aux propriétés antivirales. La L-glutamine favorise la phosphorylation oxydative et la production de ROS mitochondriaux, qui supportent la signalisation de MAVS et donc de ce fait la production de certaines ISGs. Lors d'une infection virale par DENV et ZIKV, le métabolisme cellulaire est réorienté de l'OXPHOS à la glycolyse aérobie. Or, le passage à la glycolyse aérobie signifie une inhibition de l'OXPHOS, qui conjointement à l'activité inhibitrice du lactate, limite la réponse antivirale IFN-dépendante et la production des ISGs. Cependant, quelques effecteurs, comme la vipérine et OAS1, échappent à cette régulation et représentent une ligne de défense en cas de reprogrammation. L'infection par ZIKV induit un déséquilibre de la balance rédox de la cellule hôte par plusieurs biais. L'utilisation de la L-glutamine pour la formation de biomasse en lieu et place de la formation de glutathion réduit, induit une diminution du ratio GSH/GSSG, favorisant un environnement pro-oxydant prompt à l'agrégation des protéines (dont la protéine d'enveloppe virale). Le maintien de cet environnement pro-oxydant semble nécessaire pour ZIKV, puisque celui-ci via sa protéine NS1 conduit à l'inhibition de certaines cibles de NRF2, par un mécanisme probablement dépendant d'une compétition avec le facteur BACH1. Parmi ces cibles certaines se sont d'ailleurs déjà montrées efficaces contre l'infection par ZIKV. Cependant, la déstabilisation du système antioxydant lors de l'infection conduit à l'accumulation de ROS, notamment mitochondriaux, dont l'absence de régulation à ce stade ferait plutôt pencher la balance vers des effets délétères pour la cellule.

Les résultats obtenus lors de ma thèse sur l'influence de la phosphorylation oxydative dans la production des effecteurs antiviraux sont dans la lignée des données de la littérature établissant que la détection du génome viral et la sécrétion d'interférons de type I sont relatives à des facteurs cellulaires impliqués ou issus de la phosphorylation oxydative (Buskiewicz et al., 2016;

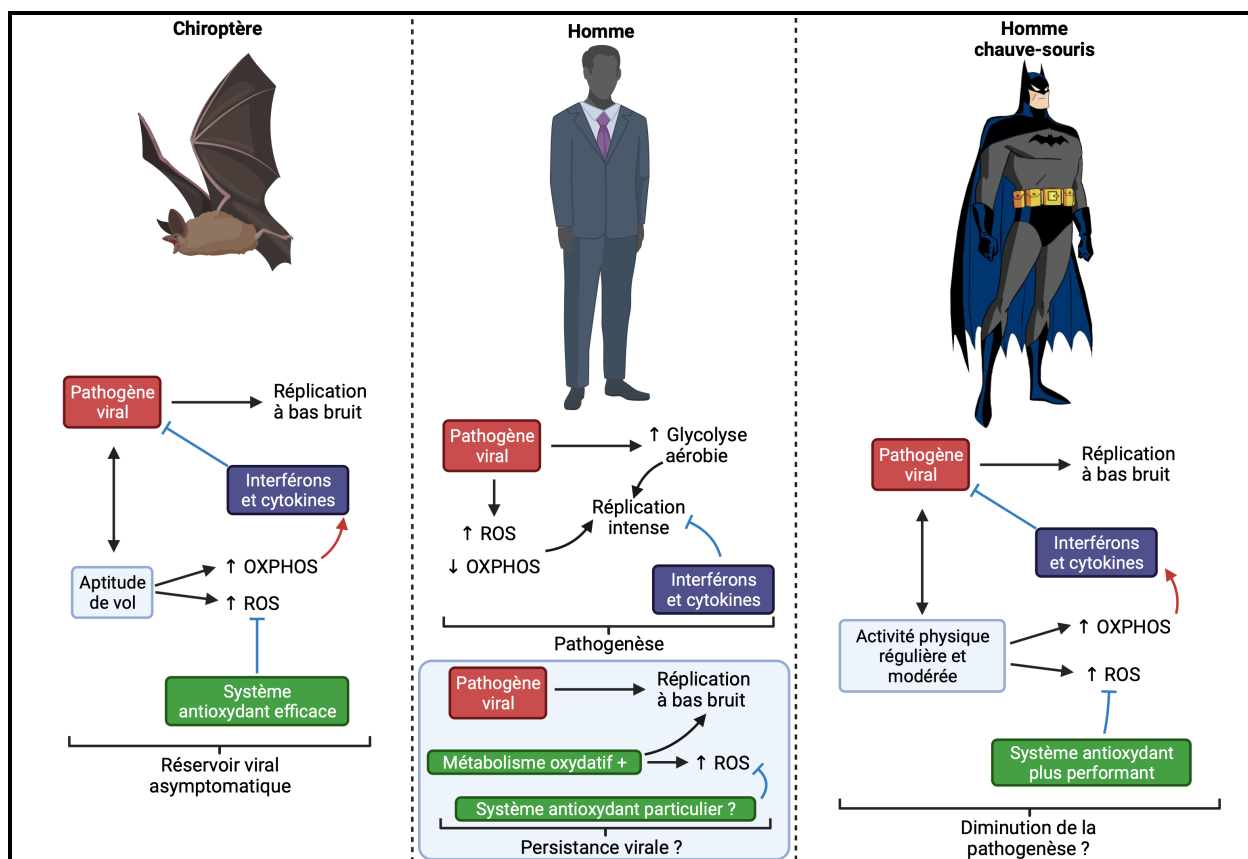
Cao et al., 2008; W. Zhang et al., 2019). Ainsi, il est cohérent que les effecteurs antiviraux qui découlent de ces signaux soient eux aussi sensibles aux variations des flux métaboliques impactant l'OXPPOS. Mais de manière intéressante, notre étude révèle une fois de plus la lutte pour la survie qui existe entre l'hôte et le pathogène en termes d'évolution (Tenthorey et al., 2022). La cellule hôte a en sa possession un mécanisme d'échappement en cas de diminution de son activité mitochondriale lors de l'infection, à savoir la possibilité de s'appuyer sur certains effecteurs à l'expression particulière, dont la vipérine fait partie. Le mode d'expression de ces facteurs, indépendamment de l'interféron, doit encore faire l'objet d'exploration. Est-ce la présence d'un promoteur spécifique à ces gènes contrairement aux autres ISGs, qui permet leur expression par un facteur cellulaire actif en contexte glycolytique ? Est-ce que ces gènes font l'objet de modifications épigénétiques actives uniquement dans ce contexte ? Ce sont des pistes à explorer, tout comme il serait intéressant de mener des études métabolomiques, pour explorer le métabolisme cellulaire et notamment celui de la glutamine, chez des patients infectés présentant différents grades de sévérité. Ces données nous permettraient peut-être d'établir un lien entre une réponse antivirale défaillante, conduisant à des formes sévères, et des altérations du métabolisme glutaminergique. Et permettraient à l'avenir de définir l'atteinte du métabolisme gluaminergique et oxydatif comme facteur prédictif du développement des formes sévères. La disponibilité de la cohorte CARBO à La Réunion, incluant justement des patients atteints par DENV pourrait d'ailleurs permettre de commencer à répondre à une telle question et donner une validité clinique aux résultats obtenus lors de ma thèse (Carras et al., 2023).

Par ailleurs, si nous prenons du recul sur ces résultats et que nous sortons du sacrosaint de la santé humaine, il est possible d'imaginer l'intervention de ces interactions entre virus et métabolisme dans la persistance virale. En effet, certains virus sont connus pour être capable de résider de manière prolongée au sein des tissus, source de maladies chroniques et de réactivations virales (Hawman et al., 2013; Suzich & Cliffe, 2018; C. Yang et al., 2023). Comme évoqué

dans l'introduction, les *Flavivirus* pourraient être à l'origine d'un tel phénomène de persistance, expliquant la détection du virus au long cours dans les fluides du patient en convalescence. Ce phénomène de persistance est probablement en partie associé à un défaut de l'apoptose des cellules infectées par les *Flavivirus*, expliquant la clairance imparfaite et le maintien du virus dans l'organisme (Turpin et al., 2019, 2020, 2021).

Toutefois, si on s'intéresse à la biologie des chauves-souris, il est possible d'émettre une hypothèse complémentaire. En effet, les chauves-souris sont un exemple parfait d'étude de la persistance virale, puisqu'elles représentent un réservoir à long-terme pour de nombreuses espèces virales, notamment la famille des *Coronaviridae*, sans pour autant développer de symptômes (Letko et al., 2020). Ces animaux sont les seuls mammifères à avoir acquis la capacité de voler et il est impressionnant de constater comment l'acquisition du vol a influé sur leurs interactions avec les pathogènes viraux (**Figure 41**). Le vol est associé chez les chauves-souris à une augmentation importante de leur consommation d'oxygène et de leur production de ROS, dont les effets délétères sont limités par la sélection au fil de l'évolution de systèmes antioxydant et anti-inflammatoire particulièrement efficaces (Brook & Dobson, 2015; Kacprzyk et al., 2017; Thomas & Suthers, 1972). Parallèlement, on note une sécrétion basale d'interférons et de cytokines chez ces animaux du fait de leur métabolisme oxydatif particulièrement actif, ce qui limite la portée de l'infection, sans pour autant la juguler complètement (Kacprzyk et al., 2017; Zhou et al., 2016). À y regarder de plus près, on peut y voir une sorte de pacte de non-agression. Les virus continuant à se répliquer à bas bruit sans porter atteinte à l'intégrité cellulaire de l'hôte et ce dernier le tolérant. Est-il possible que chez l'Homme, des niches de persistance soient associées à des conditions métaboliques similaires, permettant le maintien d'une réplication virale, contrôlée par un métabolisme oxydatif efficient dont les effets délétères sont limités par la conservation d'un système antioxydant performant ? De manière intéressante, l'analyse des mécanismes métaboliques mis en place chez les chauves-souris nous a toujours questionné sur

l'effet prophylactique que pourrait avoir une activité physique régulière et modérée, sur la mise en place d'un métabolisme oxydatif plus actif, ou à défaut la mobilisation de ce métabolisme par des approches ciblant le métabolisme glutaminergique. Ceci aboutirait donc comme chez les chauves-souris à une réponse interférons basale pouvant limiter l'infection. Il ne manquerait plus alors qu'à se doter d'un système antioxydant aussi efficace, ou de compenser son absence par l'apport de polyphénols issus de plantes de la biodiversité réunionnaise (Arcambal et al., 2020; Taillé et al., 2020), pour être parés contre les émergences virales à venir (Figure 41) !



**Figure 41 – Impact de la phosphorylation oxydative sur la tolérance virale.** Chez la chauve-souris, le développement de l'aptitude à voler s'est accompagné d'une promotion de la capacité mitochondriale, favorisant une sécrétion d'interférons basale qui permet de limiter la pathogénèse associée aux infections virales, au contraire de ce qui est observé chez l'Homme. De plus, les effets délétères d'un tel métabolisme se retrouvent limités par la sélection d'un système antioxydant particulièrement efficace. La stimulation de l'OXPHOS chez l'homme, concomitante au développement d'un système antioxydant plus performant, pourrait permettre, chez nous également, de contrecarrer la pathogénèse liée aux infections virales.

*Jusqu'à la prochaine adaptation de nos pathogènes préférés...*

# **Bibliographie**

## **Bibliographie**

- A549-Dual<sup>TM</sup> Cells*. (2016, novembre 25). InvivoGen. <https://www.invivogen.com/a549-dual>
- Abbink, P., Larocca, R. A., De La Barrera, R. A., Bricault, C. A., Moseley, E. T., Boyd, M., Kirilova, M., Li, Z., Ng'ang'a, D., Nanayakkara, O., Nityanandam, R., Mercado, N. B., Borducchi, E. N., Agarwal, A., Brinkman, A. L., Cabral, C., Chandrashekar, A., Giglio, P. B., Jetton, D., ... Barouch, D. H. (2016). Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*, 353(6304), 1129-1132. <https://doi.org/10.1126/science.aah6157>
- Adams, G. R., Zaldivar, F. P., Nance, D. M., Kodesh, E., Radom-Aizik, S., & Cooper, D. M. (2011). Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(4), 658-666. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.01.002>
- Aguirre, S., Luthra, P., Sanchez-Aparicio, M. T., Maestre, A. M., Patel, J., Lamothe, F., Fredericks, A. C., Tripathi, S., Zhu, T., Pintado-Silva, J., Webb, L. G., Bernal-Rubio, D., Solovyov, A., Greenbaum, B., Simon, V., Basler, C. F., Mulder, L. C. F., García-Sastre, A., & Fernandez-Sesma, A. (2017). Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. *Nature Microbiology*, 2(5), 17037. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.37>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002934>
- Akey, D. L., Brown, W. C., Dutta, S., Konwerski, J., Jose, J., Jurkiw, T. J., DelProposto, J., Ogata, C. M., Skiniotis, G., Kuhn, R. J., & Smith, J. L. (2014). Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. *Science*, 343(6173), 881-885. <https://doi.org/10.1126/science.1247749>
- Akiyama, B. M., Laurence, H. M., Massey, A. R., Costantino, D. A., Xie, X., Yang, Y., Shi, P.-Y., Nix, J. C., Beckham, J. D., & Kieft, J. S. (2016). Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. *Science*, 354(6316), 1148-1152. <https://doi.org/10.1126/science.aah3963>
- Akkaya, M., Traba, J., Roesler, A. S., Miozzo, P., Akkaya, B., Theall, B. P., Sohn, H., Pena, M., Smelkinson, M., Kabat, J., Dahlstrom, E., Dorward, D. W., Skinner, J., Sack, M. N., & Pierce, S. K. (2018). Second signals rescue B cells from activation-induced mitochondrial dysfunction and death. *Nature Immunology*, 19(8), 871-884. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0156-5>
- Alcendor, D. J. (2018). Zika virus infection and implications for kidney disease. *Journal of Molecular Medicine*, 96(11), 1145-1151. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1692-z>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.02.376-381.2002>
- Alivernini, S., Tolusso, B., Gigante, M. R., Petricca, L., Bui, L., Fedele, A. L., Di Mario, C., Benvenuto, R., Federico, F., Ferraccioli, G., & Gremese, E. (2019). Overweight/obesity affects histological features and inflammatory gene signature of synovial membrane of Rheumatoid Arthritis. *Scientific Reports*, 9(1), 10420. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46927-w>
- Allen, C. N. S., Arjona, S. P., Santerre, M., & Sawaya, B. E. (2022). Hallmarks of Metabolic Reprogramming and Their Role in Viral Pathogenesis. *Viruses*, 14(3), 602. <https://doi.org/10.3390/v14030602>
- Allonso, D., Andrade, I. S., Conde, J. N., Coelho, D. R., Rocha, D. C. P., Da Silva, M. L., Ventura, G. T., Silva, E. M., & Mohana-Borges, R. (2015). Dengue Virus NS1 Protein Modulates Cellular Energy Metabolism by Increasing Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. *Journal of Virology*, 89(23), 11871-11883. <https://doi.org/10.1128/JVI.01342-15>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.009>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6631-6643.2005>
- Angin, M., Volant, S., Passaes, C., Lecuroux, C., Monceaux, V., Dillies, M.-A., Valle-Casuso, J. C., Pancino, G., Vaslin, B., Le Grand, R., Weiss, L., Goujard, C., Meyer, L., Boufassa, F., Müller-Trutwin, M., Lambotte, O., & Sáez-Cirión, A. (2019). Metabolic plasticity of HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection. *Nature Metabolism*, 1(7), 704-716. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0081-4>

- Anzinger, J. J., Butterfield, T. R., Gouillou, M., McCune, J. M., Crowe, S. M., & Palmer, C. S. (2018). Glut1 Expression Level on Inflammatory Monocytes is Associated With Markers of Cardiovascular Disease Risk in HIV-Infected Individuals. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *77*(2), e28-e30. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001559>
- Aragao, M. F. V. V., Holanda, A. C., Brainer-Lima, A. M., Petribu, N. C. L., Castillo, M., Van Der Linden, V., Serpa, S. C., Tenório, A. G., Travassos, P. T. C., Cordeiro, M. T., Sarteschi, C., Valenca, M. M., & Costello, A. (2017). Nonmicrocephalic Infants with Congenital Zika Syndrome Suspected Only after Neuroimaging Evaluation Compared with Those with Microcephaly at Birth and Postnatally : How Large Is the Zika Virus “Iceberg”? *American Journal of Neuroradiology*, *38*(7), 1427-1434. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5216>
- Arcambal, A., Tailé, J., Couret, D., Planesse, C., Veeren, B., Diotel, N., Gauvin-Bialecki, A., Meilhac, O., & Gonthier, M. (2020). Protective Effects of Antioxidant Polyphenols against Hyperglycemia-Mediated Alterations in Cerebral Endothelial Cells and a Mouse Stroke Model. *Molecular Nutrition & Food Research*, *64*(13), 1900779. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900779>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.02188-08>
- Ashour, J., Morrison, J., Laurent-Rolle, M., Belicha-Villanueva, A., Plumlee, C. R., Bernal-Rubio, D., Williams, K. L., Harris, E., Fernandez-Sesma, A., Schindler, C., & García-Sastre, A. (2010). Mouse STAT2 Restricts Early Dengue Virus Replication. *Cell Host & Microbe*, *8*(5), 410-421. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.10.007>
- Assmann, N., O'Brien, K. L., Donnelly, R. P., Dyck, L., Zaiatz-Bittencourt, V., Loftus, R. M., Heinrich, P., Oefner, P. J., Lynch, L., Gardiner, C. M., Dettmer, K., & Finlay, D. K. (2017). Srebp-controlled glucose metabolism is essential for NK cell functional responses. *Nature Immunology*, *18*(11), 1197-1206. <https://doi.org/10.1038/ni.3838>
- Avirutnan, P., Fuchs, A., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Youn, S., Diamond, M. S., & Atkinson, J. P. (2010). Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(4), 793-806. <https://doi.org/10.1084/jem.20092545>
- Avirutnan, P., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Blom, A. M., Diamond, M. S., & Atkinson, J. P. (2011). Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation. *The Journal of Immunology*, *187*(1), 424-433. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100750>
- Avirutnan, P., Mehlhop, E., & Diamond, M. S. (2008). Complement and its role in protection and pathogenesis of flavivirus infections. *Vaccine*, *26*, I100-I107. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.061>
- Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmecca, S., Auethavornanan, K., Jairungsri, A., Kanlaya, R., Tangthawornchaikul, N., Puttikhunt, C., Pattanakitsakul, S., Yenchitsomanus, P., Mongkolsapaya, J., Kasinrer, W., Sittisombut, N., Husmann, M., Blettner, M., Vasanawathana, S., Bhakdi, S., & Malasit, P. (2006). Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections : A Potential Role for the Non-structural Viral Protein NS1 and Complement. *The Journal of Infectious Diseases*, *193*(8), 1078-1088. <https://doi.org/10.1086/500949>
- Avirutnan, P., Zhang, L., Punyadee, N., Manuyakorn, A., Puttikhunt, C., Kasinrer, W., Malasit, P., Atkinson, J. P., & Diamond, M. S. (2007). Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. *PLoS Pathogens*, *3*(11), e183. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030183>
- Azevedo, E. P., Rocha, N. C., Guimarães-Costa, A. B., De Souza-Vieira, T. S., Ganilho, J., Saraiva, E. M., Palhano, F. L., & Foguel, D. (2015). A Metabolic Shift toward Pentose Phosphate Pathway Is Necessary for Amyloid Fibril- and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(36), 22174-22183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.640094>
- Baardman, J., Verberk, S. G. S., Prange, K. H. M., Van Weeghel, M., Van Der Velden, S., Ryan, D. G., Wüst, R. C. I., Neele, A. E., Speijer, D., Denis, S. W., Witte, M. E., Houtkooper, R. H., O'Neill, L. A., Knatko, E. V., Dinkova-Kostova, A. T., Lutgens, E., De Winther, M. P. J., & Van Den Bossche, J. (2018). A Defective Pentose Phosphate Pathway Reduces Inflammatory Macrophage Responses during Hypercholesterolemia. *Cell Reports*, *25*(8), 2044-2052.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.092>
- Baldwin, W. R., Livengood, J. A., Giebler, H. A., Stovall, J. L., Boroughs, K. L., Sonnberg, S., Bohning, K. J., Dietrich, E. A., Ong, Y. T., Danh, H. K., Patel, H. K., Huang, C. Y.-H., & Dean, H. J. (2018). Purified Inactivated Zika Vaccine Candidates Afford Protection against Lethal Challenge in Mice. *Scientific Reports*, *8*(1), 16509. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34735-7>
- Bao, Y., Ledderose, C., Graf, A. F., Brix, B., Birsak, T., Lee, A., Zhang, J., & Junger, W. G. (2015). mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis. *Journal of Cell Biology*, *210*(7), 1153-1164. <https://doi.org/10.1083/jcb.201503066>

- Barbosa, S., Kay, K., Chitnis, N., & Hastings, I. M. (2018). Modelling the impact of insecticide-based control interventions on the evolution of insecticide resistance and disease transmission. *Parasites & Vectors*, *11*(1), 482. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3025-z>
- Barton, W., Penney, N. C., Cronin, O., Garcia-Perez, I., Molloy, M. G., Holmes, E., Shanahan, F., Cotter, P. D., & O'Sullivan, O. (2017). The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. *Gut*, *gutjnl-2016-313627*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313627>
- Bashyam, H. S., Green, S., & Rothman, A. L. (2006). Dengue Virus-Reactive CD8<sup>+</sup> T Cells Display Quantitative and Qualitative Differences in Their Response to Variant Epitopes of Heterologous Viral Serotypes. *The Journal of Immunology*, *176*(5), 2817-2824. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.2817>
- Beatty, P. R., Puerta-Guardo, H., Killingbeck, S. S., Glasner, D. R., Hopkins, K., & Harris, E. (2015). Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Science Translational Medicine*, *7*(304). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3787>
- Beaumier, C. M., & Rothman, A. L. (2009). Cross-Reactive Memory CD4<sup>+</sup> T Cells Alter the CD8<sup>+</sup> T-Cell Response to Heterologous Secondary Dengue Virus Infections in Mice in a Sequence-Specific Manner. *Viral Immunology*, *22*(3), 215-219. <https://doi.org/10.1089/vim.2008.0089>
- Beck, S., Zhu, Z., Oliveira, M. F., Smith, D. M., Rich, J. N., Bernatchez, J. A., & Siqueira-Neto, J. L. (2019). Mechanism of Action of Methotrexate Against Zika Virus. *Viruses*, *11*(4), 338. <https://doi.org/10.3390/v11040338>
- Begum, F., Das, S., Mukherjee, D., & Ray, U. (2019). Hijacking the Host Immune Cells by Dengue Virus : Molecular Interplay of Receptors and Dengue Virus Envelope. *Microorganisms*, *7*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090323>
- Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., & Carrieri, M. (2013). Pilot Field Trials With *Aedes albopictus* Irradiated Sterile Males in Italian Urban Areas. *Journal of Medical Entomology*, *50*(2), 317-325. <https://doi.org/10.1603/ME12048>
- Benfrid, S., Park, K.-H., Dellarole, M., Voss, J. E., Tamietti, C., Pehau-Arnaudet, G., Raynal, B., Brûlé, S., England, P., Zhang, X., Mikhailova, A., Hasan, M., Ungeheuer, M.-N., Petres, S., Biering, S. B., Harris, E., Sakuntabhai, A., Buchy, P., Duong, V., ... Flamand, M. (2022). Dengue virus NS1 protein conveys pro-inflammatory signals by docking onto high-density lipoproteins. *EMBO reports*, *23*(7), e53600. <https://doi.org/10.15252/embr.202153600>
- Berbudi, A., Rahmadika, N., Tjahjadi, A. I., & Ruslami, R. (2020). Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. *Current Diabetes Reviews*, *16*(5), 442-449. <https://doi.org/10.2174/1573399815666191024085838>
- Berrou, J., Fougeray, S., Venot, M., Chardiny, V., Gautier, J.-F., Dulphy, N., Toubert, A., & Peraldi, M.-N. (2013). Natural Killer Cell Function, an Important Target for Infection and Tumor Protection, Is Impaired in Type 2 Diabetes. *PLoS ONE*, *8*(4), e62418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062418>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bidet, K., Dadlani, D., & Garcia-Blanco, M. A. (2014). G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 Are Required for Translation of Interferon Stimulated mRNAs and Are Targeted by a Dengue Virus Non-coding RNA. *PLoS Pathogens*, *10*(7), e1004242. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004242>
- Bifani, A. M., Chan, K. W. K., Borrenberghs, D., Tan, M. J. A., Phoo, W. W., Watanabe, S., Goethals, O., Vasudevan, S. G., & Choy, M. M. (2023). Therapeutics for flaviviral infections. *Antiviral Research*, *210*, 105517. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105517>
- Blackwell, J. L., & Brinton, M. A. (1997). Translation elongation factor-1 alpha interacts with the 3' stem-loop region of West Nile virus genomic RNA. *Journal of Virology*, *71*(9), 6433-6444. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.9.6433-6444.1997>
- Blair, D., Dufort, F. J., & Chiles, T. C. (2012). Protein kinase C $\beta$  is critical for the metabolic switch to glycolysis following B-cell antigen receptor engagement. *Biochemical Journal*, *448*(1), 165-169. <https://doi.org/10.1042/BJ20121225>
- Blázquez, A.-B., Escribano-Romero, E., Merino-Ramos, T., Saiz, J.-C., & Martín-Acebes, M. A. (2014). Stress responses in flavivirus-infected cells : Activation of unfolded protein response and autophagy. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00266>
- Bokisch, V. A., Top, F. H., Russell, P. K., Dixon, F. J., & Müller-Eberhard, H. J. (1973). The Potential Pathogenic Role of Complement in Dengue Hemorrhagic Shock Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *289*(19), 996-1000. <https://doi.org/10.1056/NEJM197311082891902>



- Boothby, M. R., Brookens, S. K., Raybuck, A. L., & Cho, S. H. (2022). Supplying the trip to antibody production—Nutrients, signaling, and the programming of cellular metabolism in the mature B lineage. *Cellular & Molecular Immunology*, 19(3), 352-369. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00782-w>
- Bordier, B. B., Marion, P. L., Ohashi, K., Kay, M. A., Greenberg, H. B., Casey, J. L., & Glenn, J. S. (2002). A Prenylation Inhibitor Prevents Production of Infectious Hepatitis Delta Virus Particles. *Journal of Virology*, 76(20), 10465-10472. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.20.10465-10472.2002>
- Bordier, B. B., Ohkanda, J., Liu, P., Lee, S.-Y., Salazar, F. H., Marion, P. L., Ohashi, K., Meuse, L., Kay, M. A., Casey, J. L., Sebti, S. M., Hamilton, A. D., & Glenn, J. S. (2003). In vivo antiviral efficacy of prenylation inhibitors against hepatitis delta virus. *Journal of Clinical Investigation*, 112(3), 407-414. <https://doi.org/10.1172/JCI17704>
- 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. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.444>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.06.023>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
- Brook, C. E., & Dobson, A. P. (2015). Bats as ‘special’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends in Microbiology*, 23(3), 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004>
- Brotfain, E., Hadad, N., Shapira, Y., Avinoah, E., Zlotnik, A., Raichel, L., & Levy, R. (2015). Neutrophil functions in morbidly obese subjects. *Clinical and Experimental Immunology*, 181(1), 156-163. <https://doi.org/10.1111/cei.12631>
- Brühl, C. A., Desprès, L., Frör, O., Patil, C. D., Poulin, B., Tetreau, G., & Allgeier, S. (2020). Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). *Science of The Total Environment*, 724, 137800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137800>
- Buechler, C. R., Bailey, A. L., Weiler, A. M., Barry, G. L., Breitbach, M. E., Stewart, L. M., Jasinska, A. J., Freimer, N. B., Apetrei, C., Phillips-Conroy, J. E., Jolly, C. J., Rogers, J., Friedrich, T. C., & O'Connor, D. H. (2017). Seroprevalence of Zika Virus in Wild African Green Monkeys and Baboons. *mSphere*, 2(2), e00392-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00392-16>
- Bullard, B. L., Corder, B. N., Gorman, M. J., Diamond, M. S., & Weaver, E. A. (2018). Efficacy of a T Cell-Biased Adenovirus Vector as a Zika Virus Vaccine. *Scientific Reports*, 8(1), 18017. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35755-z>
- Burke, D. S., Scott, R. McN., Johnson, D. E., & Nisalak, A. (1988). A Prospective Study of Dengue Infections in Bangkok. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38(1), 172-180. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.38.172>
- Buskiewicz, I. A., Montgomery, T., Yasewicz, E. C., Huber, S. A., Murphy, M. P., Hartley, R. C., Kelly, R., Crow, M. K., Perl, A., Budd, R. C., & Koenig, A. (2016). Reactive oxygen species induce virus-independent MAVS oligomerization in systemic lupus erythematosus. *Science Signaling*, 9(456). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf1933>
- Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso, A., Minutti, C. M., Pereira Da Costa, M., & Reis E Sousa, C. (2021). Dendritic Cells Revisited. *Annual Review of Immunology*, 39(1), 131-166. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053707>
- Cabezas, S., Bracho, G., Aloia, A. L., Adamson, P. J., Bonder, C. S., Smith, J. R., Gordon, D. L., & Carr, J. M. (2018). Dengue Virus Induces Increased Activity of the Complement Alternative Pathway in Infected Cells. *Journal of Virology*, 92(14), e00633-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00633-18>
- 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. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-1-37>
- Campbell, K. S., & Hasegawa, J. (2013). Natural killer cell biology : An update and future directions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(3), 536-544. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.006>
- Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1885-1886. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>
- Cao, W., Manicassamy, S., Tang, H., Kasturi, S. P., Pirani, A., Murthy, N., & Pulendran, B. (2008). Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nature Immunology*, 9(10), 1157-1164. <https://doi.org/10.1038/ni.1645>

- 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. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140138>
- 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., ... Bouckenooghe, 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61060-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61060-6)
- Carey, I. M., Critchley, J. A., DeWilde, S., Harris, T., Hosking, F. J., & Cook, D. G. (2018). Risk of Infection in Type 1 and Type 2 Diabetes Compared With the General Population : A Matched Cohort Study. *Diabetes Care*, *41*(3), 513-521. <https://doi.org/10.2337/dc17-2131>
- Carras, M., Maillard, O., Cousty, J., Gérardin, P., Boukerrou, M., Raffray, L., Mavingui, P., Poubeau, P., Cabie, A., & Bertolotti, A. (2023). Associated risk factors of severe dengue in Reunion Island : A prospective cohort study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *17*(4), e0011260. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011260>
- Carroll, K. C., Viollet, B., & Suttles, J. (2013). AMPK $\alpha$ 1 deficiency amplifies proinflammatory myeloid APC activity and CD40 signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, *94*(6), 1113-1121. <https://doi.org/10.1189/jlb.0313157>
- Carteaux, G., Maquart, M., Bedet, A., Contou, D., Brugières, P., Fourati, S., Cleret de Langavant, L., de Broucker, T., Brun-Buisson, C., Leparac-Goffart, I., & Mekontso Dessap, A. (2016). Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *New England Journal of Medicine*, *374*(16), Article 16. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1602964>
- Cervantes, M. A. V., Martinez, J. A. V., García, L. D. G., Ortega, O. L., Romero, H. A., Estrada, A. M., Castillo, M. M., Pliego, A. F., Reyes, G. L., Repetto, A. C. H., Cordero, J. G., & Juárez, M. L. (2023). Zika virus infection induces expression of NRF2 and antioxidant systems in trophoblast cells. *Virus Genes*, *59*(5), 781-785. <https://doi.org/10.1007/s11262-023-02014-x>
- Cerwenka, A., & Lanier, L. L. (2016). Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nature Reviews Immunology*, *16*(2), 112-123. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.9>
- Chakravarthi, S., Jessop, C. E., & Bulleid, N. J. (2006). The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Reports*, *7*(3), 271-275. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400645>
- Chan, Y. K., & Gack, M. U. (2016). A phosphomimetic-based mechanism of dengue virus to antagonize innate immunity. *Nature Immunology*, *17*(5), 523-530. <https://doi.org/10.1038/ni.3393>
- Chang, C.-H., Curtis, J. D., Maggi, L. B., Faubert, B., Villarino, A. V., O'Sullivan, D., Huang, S. C.-C., van der Windt, G. J. W., Blagih, J., Qiu, J., Weber, J. D., Pearce, E. J., Jones, R. G., & Pearce, E. L. (2013). Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell*, *153*(6), 1239-1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.016>
- Chang, C.-H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M. D., Noguchi, T., Curtis, J. D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M. M., van der Windt, G. J. W., Tonc, E., Schreiber, R. D., Pearce, E. J., & Pearce, E. L. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*, *162*(6), 1229-1241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.016>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.09.022>
- Chang, T. Y., & Limanek, J. S. (1980). Regulation of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-hydroxycholesterol in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*, *255*(16), 7787-7795. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43901-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43901-X)
- Chao, W.-C., Yen, C.-L., Wu, Y.-H., Chen, S.-Y., Hsieh, C.-Y., Chang, T.-C., Ou, H.-Y., & Shieh, C.-C. (2015). Increased resistin may suppress reactive oxygen species production and inflammasome activation in type 2 diabetic patients with pulmonary tuberculosis infection. *Microbes and Infection*, *17*(3), 195-204. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.11.009>
- Chapman, E. G., Costantino, D. A., Rabe, J. L., Moon, S. L., Wilusz, J., Nix, J. C., & Kieft, J. S. (2014). The Structural Basis of Pathogenic Subgenomic Flavivirus RNA (sfRNA) Production. *Science*, *344*(6181), 307-310. <https://doi.org/10.1126/science.1250897>
- Chapman, N. M., Boothby, M. R., & Chi, H. (2020). Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nature Reviews Immunology*, *20*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0203-y>
- Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C. J., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., Ruggieri, A., & Bartenschlager, R. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial

- Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host & Microbe*, 20(3), 342-356. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.008>
- Chazal, M., Beauclair, G., Gracias, S., Najburg, V., Simon-Lorière, E., Tangy, F., Komarova, A. V., & Jouvenet, N. (2018). RIG-I Recognizes the 5' Region of Dengue and Zika Virus Genomes. *Cell Reports*, 24(2), 320-328. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.047>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.009>
- Chen, H.-R., Chuang, Y.-C., Lin, Y.-S., Liu, H.-S., Liu, C.-C., Perng, G.-C., & Yeh, T.-M. (2016). Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Induces Vascular Leakage through Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), e0004828. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004828>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nm0897-866>
- Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R., & Tian, Z. (2013). NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 10(3), 230-252. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.10>
- Chiu, H., Jackson, L. V., Oh, K. I., Mai, A., Ronai, Z. A., Ruggero, D., & Fruman, D. A. (2019). The mTORC1/4E-BP/eIF4E Axis Promotes Antibody Class Switching in B Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 202(2), 579-590. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800602>
- Cho, S. H., Raybuck, A. L., Stengel, K., Wei, M., Beck, T. C., Volanakis, E., Thomas, J. W., Hiebert, S., Haase, V. H., & Boothby, M. R. (2016). Germinal centre hypoxia and regulation of antibody qualities by a hypoxia response system. *Nature*, 537(7619), 234-238. <https://doi.org/10.1038/nature19334>
- Choi, K. M., Kim, J. J., Yoo, J., Kim, K. S., Gu, Y., Eom, J., Jeong, H., Kim, K., Nam, K. T., Park, Y. S., Chung, J.-Y., & Seo, J.-Y. (2022). The interferon-inducible protein viperin controls cancer metabolic reprogramming to enhance cancer progression. *Journal of Clinical Investigation*, 132(24), e157302. <https://doi.org/10.1172/JCI157302>
- Chouin-Carneiro, T., & Dos Santos, F. B. (2017). Transmission of Major Arboviruses in Brazil : The Role of Aedes aegypti and Aedes albopictus Vectors. In V. D. C. Shields (Ed.), *Biological Control of Pest and Vector Insects*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66946>
- Chow, K. T., Gale, M., & Loo, Y.-M. (2018). RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 667-694. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053309>
- Churdboonchart, V., Futrakul, P., & Bhamarapravati, N. (1983). Crossed Immunoelectrophoresis for the Detection of Split Products of the Third Complement in Dengue Hemorrhagic Fever : I. Observations in Patients' Plasma\*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(3), 569-576. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.569>
- Cichocki, F., Valamehr, B., Bjordahl, R., Zhang, B., Rezner, B., Rogers, P., Gaidarova, S., Moreno, S., Tuininga, K., Dougherty, P., McCullar, V., Howard, P., Sarhan, D., Taras, E., Schlums, H., Abbot, S., Shoemaker, D., Bryceson, Y. T., Blazar, B. R., ... Miller, J. S. (2017). GSK3 Inhibition Drives Maturation of NK Cells and Enhances Their Antitumor Activity. *Cancer Research*, 77(20), 5664-5675. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0799>
- Cichocki, F., Wu, C.-Y., Zhang, B., Felices, M., Tesi, B., Tuininga, K., Dougherty, P., Taras, E., Hinderlie, P., Blazar, B. R., Bryceson, Y. T., & Miller, J. S. (2018). ARID5B regulates metabolic programming in human adaptive NK cells. *Journal of Experimental Medicine*, 215(9), 2379-2395. <https://doi.org/10.1084/jem.20172168>
- Clain, Haddad, Koishi, Sinigaglia, Rachidi, Desprès, Duarte Dos Santos, Guiraud, Jouvenet, & El Kalamouni. (2019). The Polyphenol-Rich Extract from Psiloxylon mauritanum, 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. <https://doi.org/10.3390/ijms20081860>
- Clancy, R. L. (2006). Reversal in fatigued athletes of a defect in interferon secretion after administration of *Lactobacillus acidophilus*. *British Journal of Sports Medicine*, 40(4), 351-354. <https://doi.org/10.1136/bjism.2005.024364>
- Clarke, B. D., Roby, J. A., Slonchak, A., & Khromykh, A. A. (2015). Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Research*, 206, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.026>
- Conde, J. N., Da Silva, E. M., Allonso, D., Coelho, D. R., Andrade, I. D. S., De Medeiros, L. N., Menezes, J. L., Barbosa, A. S., & Mohana-Borges, R. (2016). Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. *Journal of Virology*, 90(21), 9570-9581. <https://doi.org/10.1128/JVI.00912-16>
- Cordes, T., Wallace, M., Michelucci, A., Divakaruni, A. S., Sapcariu, S. C., Sousa, C., Koseki, H., Cabrales, P., Murphy, A. N., Hiller, K., & Metallo, C. M. (2016). Immunoresponsive Gene 1 and Itaconate Inhibit

- Succinate Dehydrogenase to Modulate Intracellular Succinate Levels. *Journal of Biological Chemistry*, 291(27), 14274-14284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685792>
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., Neufeldt, C. J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P., Schorb, M., Pruunsild, P., Schwab, Y., Chatel-Chaix, L., Ruggieri, A., & Bartschlager, R. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports*, 18(9), 2113-2123. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>
- Counotte, M. J., Kim, C. R., Wang, J., Bernstein, K., Deal, C. D., Broutet, N. J. N., & Low, N. (2018). Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses : A living systematic review. *PLOS Medicine*, 15(7), e1002611. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002611>
- Crill, W. D., Hughes, H. R., Delorey, M. J., & Chang, G.-J. J. (2009). Humoral Immune Responses of Dengue Fever Patients Using Epitope-Specific Serotype-2 Virus-Like Particle Antigens. *PLoS ONE*, 4(4), e4991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004991>
- Critchley, J. A., Carey, I. M., Harris, T., DeWilde, S., Hosking, F. J., & Cook, D. G. (2018). Glycemic Control and Risk of Infections Among People With Type 1 or Type 2 Diabetes in a Large Primary Care Cohort Study. *Diabetes Care*, 41(10), 2127-2135. <https://doi.org/10.2337/dc18-0287>
- Dagan, N., Barda, N., Kepten, E., Miron, O., Perchik, S., Katz, M. A., Hernán, M. A., Lipsitch, M., Reis, B., & Balicer, R. D. (2021). BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. *New England Journal of Medicine*, 384(15), 1412-1423. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101765>
- Dai, J., Pan, W., & Wang, P. (2011). ISG15 facilitates cellular antiviral response to dengue and west nile virus infection in vitro. *Virology Journal*, 8(1), 468. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-468>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013>
- 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. <https://doi.org/10.1128/mBio.00553-15>
- De Souza Pereira, B. B., Darrigo Junior, L. G., De Mello Costa, T. C., Felix, A. C., Simoes, B. P., Stracieri, A. B., Da Silva, P. M., Mauad, M., & Machado, C. M. (2017). Prolonged viremia in dengue virus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients and patients with hematological malignancies. *Transplant Infectious Disease*, 19(4), e12721. <https://doi.org/10.1111/tid.12721>
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirakul, N., Fitton, P., Vasanaathana, S., Limpitikul, W., Puttikhunt, C., Edwards, C., Duangchinda, T., Supasa, S., Chawansuntati, K., Malasit, P., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. (2010). Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science*, 328(5979), 745-748. <https://doi.org/10.1126/science.1185181>
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., Sakuntabhai, A., Cao-Lormeau, V.-M., Malasit, P., Rey, F. A., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature Immunology*, 17(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>
- Delfin-Riela, T., Rossotti, M., Alvez-Rosado, R., Leizagoyen, C., & González-Sapienza, G. (2020). Highly Sensitive Detection of Zika Virus Nonstructural Protein 1 in Serum Samples by a Two-Site Nanobody ELISA. *Biomolecules*, 10(12), 1652. <https://doi.org/10.3390/biom10121652>
- Després, J.-P. (2012). Body Fat Distribution and Risk of Cardiovascular Disease : An Update. *Circulation*, 126(10), 1301-1313. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067264>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Ding, Q., Gaska, J. M., Douam, F., Wei, L., Kim, D., Balev, M., Heller, B., & Ploss, A. (2018). Species-specific disruption of STING-dependent antiviral cellular defenses by the Zika virus NS2B3 protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1803406115>
- Donnelly, R. P., Loftus, R. M., Keating, S. E., Liou, K. T., Biron, C. A., Gardiner, C. M., & Finlay, D. K. (2014). mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Is a Prerequisite for NK Cell Effector Function. *The Journal of Immunology*, 193(9), 4477-4484. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401558>
- Doughty, C. A., Bleiman, B. F., Wagner, D. J., Dufort, F. J., Mataraza, J. M., Roberts, M. F., & Chiles, T. C. (2006). Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes : Role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood*, 107(11), 4458-4465. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4788>
- Driggers, R. W., Ho, C.-Y., Korhonen, E. M., Kuivanen, S., Jääskeläinen, A. J., Smura, T., Rosenberg, A., Hill, D. A., DeBiasi, R. L., Vezina, G., Timofeev, J., Rodriguez, F. J., Levantov, L., Razak, J., Iyengar, P., Hennent, A., Kennedy, R., Lanciotti, R., du Plessis, A., & Vapalahti, O. (2016). Zika Virus Infection with

- Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *New England Journal of Medicine*, 374(22), Article 22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1601824>
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., & Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536-2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Durfee, L. A., Lyon, N., Seo, K., & Huibregtse, J. M. (2010). The ISG15 Conjugation System Broadly Targets Newly Synthesized Proteins : Implications for the Antiviral Function of ISG15. *Molecular Cell*, 38(5), 722-732. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.002>
- Eagle, H., & Habel, K. (1956). THE NUTRITIONAL REQUIREMENTS FOR THE PROPAGATION OF POLIOMYELITIS VIRUS BY THE H E L A CELL. *The Journal of Experimental Medicine*, 104(2), 271-287. <https://doi.org/10.1084/jem.104.2.271>
- El Kalamouni, C., Frumence, E., Bos, S., Turpin, J., Nativel, B., Harrabi, W., Wilkinson, D., Meilhac, O., Gadea, G., Desprès, P., Krejbich-Trotot, P., & Viranaïcken, W. (2018). Subversion of the Heme Oxygenase-1 Antiviral Activity by Zika Virus. *Viruses*, 11(1), 2. <https://doi.org/10.3390/v11010002>
- Elong Ngonu, A., Chen, H.-W., Tang, W. W., Joo, Y., King, K., Weiskopf, D., Sidney, J., Sette, A., & Shresta, S. (2016). Protective Role of Cross-Reactive CD8 T Cells Against Dengue Virus Infection. *EBioMedicine*, 13, 284-293. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.006>
- Elong Ngonu, A., Vizcarra, E. A., Tang, W. W., Sheets, N., Joo, Y., Kim, K., Gorman, M. J., Diamond, M. S., & Shresta, S. (2017). Mapping and Role of the CD8 + T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host & Microbe*, 21(1), 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.010>
- Elsinga, J., Van Der Veen, H. T., Gerstenbluth, I., Burgerhof, J. G. M., Dijkstra, A., Grobusch, M. P., Tami, A., & Bailey, A. (2017). Community participation in mosquito breeding site control : An interdisciplinary mixed methods study in Curaçao. *Parasites & Vectors*, 10(1), 434. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2371-6>
- Elsterova, J., Palus, M., Sirmarova, J., Kopecky, J., Niller, H. H., & Ruzek, D. (2017). Tick-borne encephalitis virus neutralization by high dose intravenous immunoglobulin. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(2), 253-258. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.007>
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., & Rousset, D. (2016). Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*, 387(10015), 227-228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00003-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00003-9)
- Everts, B., Amiel, E., Huang, S. C.-C., Smith, A. M., Chang, C.-H., Lam, W. Y., Redmann, V., Freitas, T. C., Blagih, J., Van Der Windt, G. J. W., Artyomov, M. N., Jones, R. G., Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2014). TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKε supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nature Immunology*, 15(4), 323-332. <https://doi.org/10.1038/ni.2833>
- Falgout, B., & Markoff, L. (1995). Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 69(11), 7232-7243. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.11.7232-7243.1995>
- Faria, N. R., Azevedo, R. D. S. D. S., Kraemer, M. U. G., Souza, R., Cunha, M. S., Hill, S. C., Thézé, J., Bonsall, M. B., Bowden, T. A., Rissanen, I., Rocco, I. M., Nogueira, J. S., Maeda, A. Y., Vasami, F. G. D. S., Macedo, F. L. D. L., Suzuki, A., Rodrigues, S. G., Cruz, A. C. R., Nunes, B. T., ... Vasconcelos, P. F. C. (2016). Zika virus in the Americas : Early epidemiological and genetic findings. *Science*, 352(6283), 345-349. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5036>
- Faria, N. R., Quick, J., Claro, I. M., Thézé, J., De Jesus, J. G., Giovanetti, M., Kraemer, M. U. G., Hill, S. C., Black, A., Da Costa, A. C., Franco, L. C., Silva, S. P., Wu, C.-H., Raghwani, J., Cauchemez, S., Du Plessis, L., Verotti, M. P., De Oliveira, W. K., Carmo, E. H., ... Pybus, O. G. (2017). Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*, 546(7658), 406-410. <https://doi.org/10.1038/nature22401>
- Feeley, E. M., Sims, J. S., John, S. P., Chin, C. R., Pertel, T., Chen, L.-M., Gaiha, G. D., Ryan, B. J., Donis, R. O., Elledge, S. J., & Brass, A. L. (2011). IFITM3 Inhibits Influenza A Virus Infection by Preventing Cytosolic Entry. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002337. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002337>
- Ferguson, N. M., Rodríguez-Barrquer, I., Dorigatti, I., Mier-y-Teran-Romero, L., Laydon, D. J., & Cummings, D. A. T. (2016). Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine : Modeling optimal deployment. *Science*, 353(6303), 1033-1036. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9590>
- Fernández-Lázaro, D., González-Bernal, J. J., Sánchez-Serrano, N., Navascués, L. J., Ascaso-del-Río, A., & Mielgo-Ayuso, J. (2020). Physical Exercise as a Multimodal Tool for COVID-19 : Could It Be Used as a Preventive Strategy? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228496>
- Fibriansah, G., Ibarra, K. D., Ng, T.-S., Smith, S. A., Tan, J. L., Lim, X.-N., Ooi, J. S. G., Kostyuchenko, V. A., Wang, J., De Silva, A. M., Harris, E., Crowe, J. E., & Lok, S.-M. (2015). Cryo-EM structure of an antibody

- that neutralizes dengue virus type 2 by locking E protein dimers. *Science*, 349(6243), 88-91. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8651>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00757-13>
- Fibriansah, G., Tan, J. L., Smith, S. A., De Alwis, R., Ng, T.-S., Kostyuchenko, V. A., Jadi, R. S., Kukkaro, P., De Silva, A. M., Crowe, J. E., & Lok, S.-M. (2015). A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins. *Nature Communications*, 6(1), 6341. <https://doi.org/10.1038/ncomms7341>
- 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. <https://doi.org/10.1101/gad.1444206>
- Fleith, R. C., Mears, H. V., Leong, X. Y., Sanford, T. J., Emmott, E., Graham, S. C., Mansur, D. S., & Sweeney, T. R. (2018). IFIT3 and IFIT2/3 promote IFIT1-mediated translation inhibition by enhancing binding to non-self RNA. *Nucleic Acids Research*, 46(10), 5269-5285. <https://doi.org/10.1093/nar/gky191>
- Fondell, E., Lagerros, Y. T., Sundberg, C. J., Lekander, M., Bälter, O., Rothman, K. J., & Bälter, K. (2011). Physical Activity, Stress, and Self-Reported Upper Respiratory Tract Infection. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 43(2), 272-279. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181edf108>
- Fontaine, K. A., Sanchez, E. L., Camarda, R., & Lagunoff, M. (2015). Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. *Journal of Virology*, 89(4), 2358-2366. <https://doi.org/10.1128/JVI.02309-14>
- Fossati, G., Moulding, D. A., Spiller, D. G., Moots, R. J., White, M. R. H., & Edwards, S. W. (2003). The Mitochondrial Network of Human Neutrophils : Role in Chemotaxis, Phagocytosis, Respiratory Burst Activation, and Commitment to Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 170(4), 1964-1972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.1964>
- Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Foy, J. L. C., 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. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101939>
- Fradin, M. S., & Day, J. F. (2002). Comparative Efficacy of Insect Repellents against Mosquito Bites. *New England Journal of Medicine*, 347(1), 13-18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011699>
- França, G. V. A., Schuler-Faccini, L., Oliveira, W. K., Henriques, C. M. P., Carmo, E. H., Pedi, V. D., Nunes, M. L., Castro, M. C., Serruya, S., Silveira, M. F., Barros, F. C., & Victora, C. G. (2016). Congenital Zika virus syndrome in Brazil : A case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *The Lancet*, 388(10047), 891-897. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30902-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30902-3)
- Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., Macintyre, A. N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J. C., & Makowski, L. (2014). Metabolic Reprogramming of Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 289(11), 7884-7896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522037>
- Fribley, A., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2009). Regulation of Apoptosis by the Unfolded Protein Response. In P. Erhardt & A. Toth (Éds.), *Apoptosis* (Vol. 559, p. 191-204). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-017-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-017-5_14)
- Fuchs, A., Lin, T.-Y., Beasley, D. W., Stover, C. M., Schwaeble, W. J., Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2010). Direct Complement Restriction of Flavivirus Infection Requires Glycan Recognition by Mannose-Binding Lectin. *Cell Host & Microbe*, 8(2), 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.07.007>
- Funk, A., Truong, K., Nagasaki, T., Torres, S., Floden, N., Balmori Melian, E., Edmonds, J., Dong, H., Shi, P.-Y., & Khromykh, A. A. (2010). RNA Structures Required for Production of Subgenomic Flavivirus RNA. *Journal of Virology*, 84(21), 11407-11417. <https://doi.org/10.1128/JVI.01159-10>
- Gebiola, M., Giorgini, M., Kelly, S. E., Doremus, M. R., Ferree, P. M., & Hunter, M. S. (2017). Cytological analysis of cytoplasmic incompatibility induced by *Cardinium* suggests convergent evolution with its distant cousin *Wolbachia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1862), 20171433. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1433>
- Geerling, E., Stone, E. T., Steffen, T. L., Hassert, M., Brien, J. D., & Pinto, A. K. (2021). Obesity Enhances Disease Severity in Female Mice Following West Nile Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, 12, 739025. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.739025>
- George, S. L., Wong, M. A., Dube, T. J. T., Boroughs, K. L., Stovall, J. L., Luy, B. E., Haller, A. A., Osorio, J. E., Eggemeyer, L. M., Irby-Moore, S., Frey, S. E., Huang, C. Y.-H., & Stinchcomb, D. T. (2015). Safety and Immunogenicity of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Flavivirus-Naive Adults : A Randomized, Double-Blinded Phase 1 Clinical Trial. *Journal of Infectious Diseases*, 212(7), 1032-1041. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv179>
- Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S., & Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and

- encephalomyocarditis picornavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(22), 8459-8464. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603082103>
- Glasner, A., Oiknine-Djian, E., Weisblum, Y., Diab, M., Panet, A., Wolf, D. G., & Mandelboim, O. (2017). Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *Journal of Virology*, 91(22), e00785-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00785-17>
- Glasner, D. R., Puerta-Guardo, H., Beatty, P. R., & Harris, E. (2018). The Good, the Bad, and the Shocking : The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis. *Annual Review of Virology*, 5(1), 227-253. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041848>
- Glasner, D. R., Ratnasiri, K., Puerta-Guardo, H., Espinosa, D. A., Beatty, P. R., & Harris, E. (2017). Dengue virus NS1 cytokine-independent vascular leak is dependent on endothelial glycocalyx components. *PLOS Pathogens*, 13(11), e1006673. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006673>
- Gleeson, M., Pyne, D. B., P. Austin, J., Lynn Francis, J., Clancy, R. L., McDonald, W. A., & Fricker, P. A. (2002). Epstein-Barr virus reactivation and upper-respiratory illness in elite swimmers. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 34(3), 411-417. <https://doi.org/10.1097/00005768-200203000-00005>
- Göertz, G. P., Abbo, S. R., Fros, J. J., & Pijlman, G. P. (2018). Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Research*, 254, 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.015>
- Goethals, O., Kaptein, S. J. F., Kesteleyn, B., Bonfanti, J.-F., Van Wesenbeeck, L., Bardiot, D., Verschoor, E. J., Verstrepen, B. E., Fagrouch, Z., Putnak, J. R., Kiemel, D., Ackaert, O., Straetemans, R., Lachau-Durand, S., Geluykens, P., Crabbe, M., Thys, K., Stoops, B., Lenz, O., ... Van Loock, M. (2023). Blocking NS3-NS4B interaction inhibits dengue virus in non-human primates. *Nature*, 615(7953), 678-686. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05790-6>
- Goyal, P., & Rajala, M. S. (2023). Reprogramming of glucose metabolism in virus infected cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04669-4>
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., Schwarz, M. C., Sánchez-Seco, M. P., Evans, M. J., Best, S. M., & García-Sastre, A. (2016). Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host & Microbe*, 19(6), 882-890. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009>
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Holmes, E. C., Gould, E. A., & De Lamballerie, X. (2010). Genomics and evolution of Aedes-borne flaviviruses. *Journal of General Virology*, 91(1), 87-94. <https://doi.org/10.1099/vir.0.014506-0>
- Guirakhoo, F., Bolin, R. A., & Roehrig, J. T. (1992). The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology*, 191(2), 921-931. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90267-S](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90267-S)
- Guo, J. (2000). A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *The EMBO Journal*, 19(24), 6891-6899. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.24.6891>
- Guo, Q., Chan, J. F.-W., Poon, V. K.-M., Wu, S., Chan, C. C.-S., Hou, L., Yip, C. C.-Y., Ren, C., Cai, J.-P., Zhao, M., Zhang, A. J., Song, X., Chan, K.-H., Wang, B., Kok, K.-H., Wen, Y., Yuen, K.-Y., & Chen, W. (2018). Immunization With a Novel Human Type 5 Adenovirus-Vectored Vaccine Expressing the Premembrane and Envelope Proteins of Zika Virus Provides Consistent and Sterilizing Protection in Multiple Immunocompetent and Immunocompromised Animal Models. *The Journal of Infectious Diseases*, 218(3), 365-377. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy187>
- Gupta, S., Maratha, A., Siednienko, J., Natarajan, A., Gajanayake, T., Hoashi, S., & Miggin, S. (2017). Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications. *Scientific Reports*, 7(1), 7633. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07230-8>
- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J. E., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M., Larquet, E., Charneau, P., Krey, T., Mégret, F., Guittet, E., Rey, F. A., & Flamand, M. (2011). Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), 8003-8008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017338108>
- Guy, B., Guirakhoo, F., Barban, V., Higgs, S., Monath, T. P., & Lang, J. (2010). Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine*, 28(3), 632-649. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.098>
- Guzman, M. G., Gubler, D. J., Izquierdo, A., Martinez, E., & Halstead, S. B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16055. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Halstead, S. B. (1979). In Vivo Enhancement of Dengue Virus Infection in Rhesus Monkeys by Passively Transferred Antibody. *Journal of Infectious Diseases*, 140(4), 527-533. <https://doi.org/10.1093/infdis/140.4.527>
- Halstead, S. B. (2003). Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses. In *Advances in Virus Research* (Vol. 60, p. 421-467). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)60011-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)60011-4)
- Halstead, S. B. (2007). Dengue. *The Lancet*, 370(9599), 1644-1652. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61687-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61687-0)

- Halstead, S. B. (2017). Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine*, 35(47), 6355-6358. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.089>
- Halstead, S. B., Nimmannitya, S., & Cohen, S. N. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 42(5), 311-328.
- Halstead, S., & O'Rourke, E. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *The Journal of Experimental Medicine*, 146(1), 201-217. <https://doi.org/10.1084/jem.146.1.201>
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., Perera-Lecoin, M., Surasombattapattana, 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), Article 17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>
- Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1), 13-20. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>
- Hastings, A. K., Yockey, L. J., Jagger, B. W., Hwang, J., Uraki, R., Gaitsch, H. F., Parnell, L. A., Cao, B., Mysorekar, I. U., Rothlin, C. V., Fikrig, E., Diamond, M. S., & Iwasaki, A. (2017). TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Reports*, 19(3), 558-568. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.058>
- Hawman, D. W., Stoermer, K. A., Montgomery, S. A., Pal, P., Oko, L., Diamond, M. S., & Morrison, T. E. (2013). Chronic Joint Disease Caused by Persistent Chikungunya Virus Infection Is Controlled by the Adaptive Immune Response. *Journal of Virology*, 87(24), 13878-13888. <https://doi.org/10.1128/JVI.02666-13>
- He, R.-T., Wang, S., Anderson, R., Innis, B. L., Nisalak, A., Usawattanakul, W., & And, S. K. (1995). Antibodies that block virus attachment to vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. *Journal of Medical Virology*, 45(4), 451-461. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890450417>
- Heaton, N. S., Perera, R., Berger, K. L., Khadka, S., LaCount, D. J., Kuhn, R. J., & Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17345-17350. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010811107>
- Hegedus, A., Kavanagh Williamson, M., Khan, M. B., Dias Zeidler, J., Da Poian, A. T., El-Bacha, T., Struys, E. A., & Huthoff, H. (2017). Evidence for Altered Glutamine Metabolism in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infected Primary Human CD4<sup>+</sup> T Cells. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 33(12), 1236-1247. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0165>
- Helbig, K. J., & Beard, M. R. (2014). The Role of Viperin in the Innate Antiviral Response. *Journal of Molecular Biology*, 426(6), 1210-1219. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.019>
- Helbig, K. J., Carr, J. M., Calvert, J. K., Wati, S., Clarke, J. N., Eyre, N. S., Narayana, S. K., Fiches, G. N., McCartney, E. M., & Beard, M. R. (2013). Viperin Is Induced following Dengue Virus Type-2 (DENV-2) Infection and Has Anti-viral Actions Requiring the C-terminal End of Viperin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), e2178. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002178>
- Herrera, B. B., Chang, C. A., Hamel, D. J., Mboup, S., Ndiaye, D., Imade, G., Okpokwu, J., Agbaji, O., Bei, A. K., & Kanki, P. J. (2017). Continued Transmission of Zika Virus in Humans in West Africa, 1992–2016. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(10), 1546-1550. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix182>
- Hershkovitz, O., Rosental, B., Rosenberg, L. A., Navarro-Sanchez, M. E., Jivov, S., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Brient-Litzler, E., Bedouelle, H., Ho, J. W., Campbell, K. S., Rager-Zisman, B., Despres, P., & Porgador, A. (2009). NKp44 Receptor Mediates Interaction of the Envelope Glycoproteins from the West Nile and Dengue Viruses with NK Cells. *The Journal of Immunology*, 183(4), 2610-2621. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802806>
- Hershkovitz, O., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Abutbul, S., Davidson, A., Mazzon, M., Kümmerer, B. M., Monsoengo, A., Jacobs, M., & Porgador, A. (2008). Dengue Virus Replicon Expressing the Nonstructural Proteins Suffices To Enhance Membrane Expression of HLA Class I and Inhibit Lysis by Human NK Cells. *Journal of Virology*, 82(15), 7666-7676. <https://doi.org/10.1128/JVI.02274-07>
- Hilgard, P. (2000). Heparan Sulfate Proteoglycans Initiate Dengue Virus Infection of Hepatocytes. *Hepatology*, 32(5), 1069-1077. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.18713>
- Hirsch, A. J., Roberts, V. H. J., Grigsby, P. L., Haese, N., Schabel, M. C., Wang, X., Lo, J. O., Liu, Z., Kroenke, C. D., Smith, J. L., Kelleher, M., Broeckel, R., Kreklywich, C. N., Parkins, C. J., Denton, M., Smith, P., DeFilippis, V., Messer, W., Nelson, J. A., ... Streblow, D. N. (2018). Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nature Communications*, 9(1), 263. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02499-9>



- Hirsch, A. J., Smith, J. L., Haese, N. N., Broeckel, R. M., Parkins, C. J., Kreklywich, C., DeFilippis, V. R., Denton, M., Smith, P. P., Messer, W. B., Colgin, L. M. A., Ducore, R. M., Grigsby, P. L., Hennebold, J. D., Swanson, T., Legasse, A. W., Axthelm, M. K., MacAllister, R., Wiley, C. A., ... Streblow, D. N. (2017). Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLOS Pathogens*, *13*(3), e1006219. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006219>
- Ho, P.-C., Bihuniak, J. D., Macintyre, A. N., Staron, M., Liu, X., Amezcuita, R., Tsui, Y.-C., Cui, G., Micevic, G., Perales, J. C., Kleinstein, S. H., Abel, E. D., Insogna, K. L., Feske, S., Locasale, J. W., Bosenberg, M. W., Rathmell, J. C., & Kaech, S. M. (2015). Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. *Cell*, *162*(6), 1217-1228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.012>
- Ho, Z. J. M., Hapuarachchi, H. C., Barkham, T., Chow, A., Ng, L. C., Lee, J. M. V., Leo, Y. S., Prem, K., Lim, Y. H. G., De Sessions, P. F., Rabaa, M. A., Chong, C. S., Tan, C. H., Rajarethinam, J., Tan, J., Anderson, D. E., Ong, X., Cook, A. R., Chong, C. Y., ... Sessions, O. M. (2017). Outbreak of Zika virus infection in Singapore : An epidemiological, entomological, virological, and clinical analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(8), 813-821. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30249-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30249-9)
- Hodgson, K., Morris, J., Bridson, T., Govan, B., Rush, C., & Ketheesan, N. (2015). Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology*, *144*(2), 171-185. <https://doi.org/10.1111/imm.12394>
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S., & Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science*, *314*(5801), 994-997. <https://doi.org/10.1126/science.1132505>
- Howley, P. M., Knipe, D. M., & Whelan, S. P. J. (Éds.). (2021). *Fields virology. Volume 1 : Emerging viruses* (Seventh edition). Wolters Kluwer.
- Htun, N. S. N., Odermatt, P., Eze, I. C., Boillat-Blanco, N., D'Acremont, V., & Probst-Hensch, N. (2015). Is Diabetes a Risk Factor for a Severe Clinical Presentation of Dengue? - Review and Meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *9*(4), e0003741. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003741>
- Hu, R., Xia, C.-Q., Butfiloski, E., & Clare-Salzler, M. (2018). Effect of high glucose on cytokine production by human peripheral blood immune cells and type I interferon signaling in monocytes : Implications for the role of hyperglycemia in the diabetes inflammatory process and host defense against infection. *Clinical Immunology*, *195*, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.06.003>
- Huang, C. Y.-H., Kinney, R. M., Livengood, J. A., Bolling, B., Arguello, J. J., Luy, B. E., Silengo, S. J., Boroughs, K. L., Stovall, J. L., Kalanidhi, A. P., Brault, A. C., Osorio, J. E., & Stinchcomb, D. T. (2013). Genetic and Phenotypic Characterization of Manufacturing Seeds for a Tetravalent Dengue Vaccine (DENVax). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(5), e2243. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002243>
- Huang, I.-C., Bailey, C. C., Weyer, J. L., Radoshitzky, S. R., Becker, M. M., Chiang, J. J., Brass, A. L., Ahmed, A. A., Chi, X., Dong, L., Longobardi, L. E., Boltz, D., Kuhn, J. H., Elledge, S. J., Bavari, S., Denison, M. R., Choe, H., & Farzan, M. (2011). Distinct Patterns of IFITM-Mediated Restriction of Filoviruses, SARS Coronavirus, and Influenza A Virus. *PLoS Pathogens*, *7*(1), e1001258. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001258>
- Huang, S. C.-C., Everts, B., Ivanova, Y., O'Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A. M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W. Y., O'Neill, C. M., Yan, C., Du, H., Abumrad, N. A., Urban, J. F., Artyomov, M. N., Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nature Immunology*, *15*(9), 846-855. <https://doi.org/10.1038/ni.2956>
- Huang, S. C.-C., Smith, A. M., Everts, B., Colonna, M., Pearce, E. L., Schilling, J. D., & Pearce, E. J. (2016). Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation. *Immunity*, *45*(4), 817-830. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.016>
- Hui, D. J., Bhasker, C. R., Merrick, W. C., & Sen, G. C. (2003). Viral Stress-inducible Protein p56 Inhibits Translation by Blocking the Interaction of eIF3 with the Ternary Complex eIF2·GTP·Met-tRNAi. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(41), 39477-39482. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305038200>
- Imanishi, T., Unno, M., Kobayashi, W., Yoneda, N., Matsuda, S., Ikeda, K., Hoshii, T., Hirao, A., Miyake, K., Barber, G. N., Arita, M., Ishii, K. J., Akira, S., & Saito, T. (2019). Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function. *Life Science Alliance*, *2*(1), e201800282. <https://doi.org/10.26508/lsa.201800282>
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., & O'Neill, S. L. (2011). *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Reports*, *12*(6), 508-518. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>
- Jacobs, M. G., Robinson, P. J., Bletchly, C., Mackenzie, J. M., & Young, P. R. (2000). Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *The FASEB Journal*, *14*(11), 1603-1610. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0829com>
- Jacobs, S. R., Herman, C. E., MacIver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L., Hammen, J. J., & Rathmell, J. C. (2008). Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent

- and Independent Pathways. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4476-4486. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4476>
- Jacque, E., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V. L. J., & Ley, S. C. (2015). BAFF activation of the ERK5 MAP kinase pathway regulates B cell survival. *Journal of Experimental Medicine*, 212(6), 883-892. <https://doi.org/10.1084/jem.20142127>
- Jantsch, J., Chakravorty, D., Turza, N., Prechtel, A. T., Buchholz, B., Gerlach, R. G., Volke, M., Gläsner, J., Warnecke, C., Wiesener, M. S., Eckardt, K.-U., Steinkasserer, A., Hensel, M., & Willam, C. (2008). Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Modulate Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cell Activation and Function. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4697-4705. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4697>
- Joshi, M. B., Lad, A., Bharath Prasad, A. S., Balakrishnan, A., Ramachandra, L., & Satyamoorthy, K. (2013). High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Letters*, 587(14), 2241-2246. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.053>
- Kacprzyk, J., Hughes, G. M., Palsson-McDermott, E. M., Quinn, S. R., Puechmaille, S. J., O'Neill, L. A. J., & Teeling, E. C. (2017). A Potent Anti-Inflammatory Response in Bat Macrophages May Be Linked to Extended Longevity and Viral Tolerance. *Acta Chiropterologica*, 19(2), 219-228. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2017.19.2.001>
- Kandutsch, A. A., Chen, H. W., & Heiniger, H.-J. (1978). Biological Activity of Some Oxygenated Sterols. *Science*, 201(4355), 498-501. <https://doi.org/10.1126/science.663671>
- Kane, M., Yadav, S. S., Bitzegeio, J., Kutluay, S. B., Zang, T., Wilson, S. J., Schoggins, J. W., Rice, C. M., Yamashita, M., Hatzioannou, T., & Bieniasz, P. D. (2013). MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*, 502(7472), 563-566. <https://doi.org/10.1038/nature12653>
- Kangwanpong, D., Bhamarapavati, N., & Lucia, H. L. (1995). Diagnosing dengue virus infection in archived autopsy tissues by means of the in situ PCR method : A case report. *Clinical and Diagnostic Virology*, 3(2), 165-172. [https://doi.org/10.1016/0928-0197\(94\)00032-P](https://doi.org/10.1016/0928-0197(94)00032-P)
- Kanneganti, T.-D., & Dixit, V. D. (2012). Immunological complications of obesity. *Nature Immunology*, 13(8), 707-712. <https://doi.org/10.1038/ni.2343>
- Karlsson, E. A., Sheridan, P. A., & Beck, M. A. (2010). Diet-Induced Obesity Impairs the T Cell Memory Response to Influenza Virus Infection. *The Journal of Immunology*, 184(6), 3127-3133. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903220>
- Kaspersen, K. A., Pedersen, O. B., Petersen, M. S., Hjalgrim, H., Rostgaard, K., Møller, B. K., Juul-Sørensen, C., Kotzé, S., Dinh, K. M., Erikstrup, L. T., Sørensen, E., Thøner, L. W., Burgdorf, K. S., Ullum, H., & Erikstrup, C. (2015). Obesity and Risk of Infection : Results from the Danish Blood Donor Study. *Epidemiology*, 26(4), 580-589. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000301>
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.-S., Reis E Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101-105. <https://doi.org/10.1038/nature04734>
- Katzelnick, L. C., Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, 358(6365), 929-932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Kaufusi, P. H., Kelley, J. F., Yanagihara, R., & Nerurkar, V. R. (2014). Induction of Endoplasmic Reticulum-Derived Replication-Competent Membrane Structures by West Nile Virus Non-Structural Protein 4B. *PLoS ONE*, 9(1), e84040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084040>
- Keating, S. E., Zaiatz-Bittencourt, V., Loftus, R. M., Keane, C., Brennan, K., Finlay, D. K., & Gardiner, C. M. (2016). Metabolic Reprogramming Supports IFN- $\gamma$  Production by CD56bright NK Cells. *The Journal of Immunology*, 196(6), 2552-2560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501783>
- Keeffe, J. R., Van Rompay, K. K. A., Olsen, P. C., Wang, Q., Gazumyan, A., Azzopardi, S. A., Schaefer-Babajew, D., Lee, Y. E., Stuart, J. B., Singapuri, A., Watanabe, J., Usachenko, J., Ardeshir, A., Saeed, M., Agudelo, M., Eisenreich, T., Bournazos, S., Oliveira, T. Y., Rice, C. M., ... Robbiani, D. F. (2018). A Combination of Two Human Monoclonal Antibodies Prevents Zika Virus Escape Mutations in Non-human Primates. *Cell Reports*, 25(6), 1385-1394.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.031>
- Keppel, M. P., Saucier, N., Mah, A. Y., Vogel, T. P., & Cooper, M. A. (2015). Activation-Specific Metabolic Requirements for NK Cell IFN- $\gamma$  Production. *The Journal of Immunology*, 194(4), 1954-1962. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402099>
- Kerdiles, Y. M., Beisner, D. R., Tinoco, R., Dejean, A. S., Castrillon, D. H., DePinho, R. A., & Hedrick, S. M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nature Immunology*, 10(2), 176-184. <https://doi.org/10.1038/ni.1689>
- Kershaw, E. E., & Flier, J. S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548-2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>

- Kieft, J. S., Rabe, J. L., & Chapman, E. G. (2015). New hypotheses derived from the structure of a flaviviral Xrn1-resistant RNA: Conservation, folding, and host adaptation. *RNA Biology*, *12*(11), 1169-1177. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1094599>
- Kiermayr, S., Kofler, R. M., Mandl, C. W., Messner, P., & Heinz, F. X. (2004). Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles. *Journal of Virology*, *78*(15), 8078-8084. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8078-8084.2004>
- Kim, Y.-H., Kim, J.-K., Kim, D.-J., Nam, J.-H., Shim, S.-M., Choi, Y.-K., Lee, C.-H., & Poo, H. (2012). Diet-Induced Obesity Dramatically Reduces the Efficacy of a 2009 Pandemic H1N1 Vaccine in a Mouse Model. *The Journal of Infectious Diseases*, *205*(2), 244-251. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir731>
- Kirkpatrick, B. D., Durbin, A. P., Pierce, K. K., Carmolli, M. P., Tibery, C. M., Grier, P. L., Hynes, N., Diehl, S. A., Elwood, D., Jarvis, A. P., Sabundayo, B. P., Lyon, C. E., Larsson, C. J., Jo, M., Lovchik, J. M., Luke, C. J., Walsh, M. C., Fraser, E. A., Subbarao, K., & Whitehead, S. S. (2015). Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy, Flavivirus-Naive Adults. *Journal of Infectious Diseases*, *212*(5), 702-710. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv082>
- Kitchen, A., Shackelton, L. A., & Holmes, E. C. (2011). Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(1), 238-243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011090108>
- Klein Geltink, R. I., Kyle, R. L., & Pearce, E. L. (2018). Unraveling the Complex Interplay Between T Cell Metabolism and Function. *Annual Review of Immunology*, *36*(1), 461-488. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053019>
- Kochs, G., Janzen, C., Hohenberg, H., & Haller, O. (2002). Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(5), 3153-3158. <https://doi.org/10.1073/pnas.052430399>
- Koufaris, C., & Nicolaidou, V. (2021). Glutamine addiction in virus-infected mammalian cells: A target of the innate immune system? *Medical Hypotheses*, *153*, 110620. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2021.110620>
- Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A. A., Louber, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D., & Cusack, S. (2011). Structural Basis for the Activation of Innate Immune Pattern-Recognition Receptor RIG-I by Viral RNA. *Cell*, *147*(2), 423-435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.039>
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H.-J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife*, *4*, e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z.-E., Kang, D.-W., & DiBaise, J. K. (2012). Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. *Nutrition in Clinical Practice*, *27*(2), 201-214. <https://doi.org/10.1177/0884533611436116>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8)
- Kularatne, S. A. M. (2015). Dengue fever. *BMJ*, h4661. <https://doi.org/10.1136/bmj.h4661>
- Kulcsar, K. A., Coleman, C. M., Beck, S. E., & Frieman, M. B. (2019). Comorbid diabetes results in immune dysregulation and enhanced disease severity following MERS-CoV infection. *JCI Insight*, *4*(20), e131774. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131774>
- Kumar, M., Roe, K., Nerurkar, P. V., Orillo, B., Thompson, K. S., Verma, S., & Nerurkar, V. R. (2014). Reduced immune cell infiltration and increased pro-inflammatory mediators in the brain of Type 2 diabetic mouse model infected with West Nile virus. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(1), 80. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-80>
- Kumar, P., Sweeney, T. R., Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2014). Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Research*, *42*(5), 3228-3245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1321>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.73-83.1998>
- Kurane, I., Kontny, U., Janus, J., & Ennis, F. A. (1990). Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. *Archives of Virology*, *110*(1-2), 91-101. <https://doi.org/10.1007/BF01310705>
- Kyle, J. L., & Harris, E. (2008). Global Spread and Persistence of Dengue. *Annual Review of Microbiology*, *62*(1), 71-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163005>

- Lai, C.-Y., Williams, K. L., Wu, Y.-C., Knight, S., Balmaseda, A., Harris, E., & Wang, W.-K. (2013). Analysis of Cross-Reactive Antibodies Recognizing the Fusion Loop of Envelope Protein and Correlation with Neutralizing Antibody Titers in Nicaraguan Dengue Cases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9), e2451. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002451>
- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., Stanfield, S. M., & Duffy, M. R. (2008). Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232-1239. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- Las Heras, V., Clooney, A. G., Ryan, F. J., Cabrera-Rubio, R., Casey, P. G., Hueston, C. M., Pinheiro, J., Rudkin, J. K., Melgar, S., Cotter, P. D., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2019). Short-term consumption of a high-fat diet increases host susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiome*, 7(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0621-x>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02180>
- Lauterbach, M. A., Hanke, J. E., Serefidou, M., Mangan, M. S. J., Kolbe, C.-C., Hess, T., Rothe, M., Kaiser, R., Hoss, F., Gehlen, J., Engels, G., Kreutzenbeck, M., Schmidt, S. V., Christ, A., Imhof, A., Hiller, K., & Latz, E. (2019). Toll-like Receptor Signaling Rewires Macrophage Metabolism and Promotes Histone Acetylation via ATP-Citrate Lyase. *Immunity*, 51(6), 997-1011.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.11.009>
- Lazear, H. M., Schoggins, J. W., & Diamond, M. S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, 50(4), 907-923. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
- Lebeau, G., Lagrave, A., Ogire, E., Grondin, L., Seriacaroupin, S., Moutoussamy, C., Mavingui, P., Hoarau, J.-J., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., Desprès, P., & Viranaicken, W. (2021). Viral Toxin NS1 Implication in Dengue Pathogenesis Making It a Pivotal Target in Development of Efficient Vaccine. *Vaccines*, 9(9), 946. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090946>
- Lecube, A., Pachón, G., Petriz, J., Hernández, C., & Simó, R. (2011). Phagocytic Activity Is Impaired in Type 2 Diabetes Mellitus and Increases after Metabolic Improvement. *PLoS ONE*, 6(8), e23366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023366>
- Ledur, P. F., Karmirian, K., Pedrosa, C. D. S. G., Souza, L. R. Q., Assis-de-Lemos, G., Martins, T. M., Ferreira, J. D. C. C. G., De Azevedo Reis, G. F., Silva, E. S., Silva, D., Salerno, J. A., Ornelas, I. M., Devalle, S., Madeiro Da Costa, R. F., Goto-Silva, L., Higa, L. M., Melo, A., Tanuri, A., Chimelli, L., ... Rehen, S. K. (2020). Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. *Scientific Reports*, 10(1), 1218. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57914-x>
- Lee, B.-C., Kim, M.-S., Pae, M., Yamamoto, Y., Eberlé, D., Shimada, T., Kamei, N., Park, H.-S., Sasorith, S., Woo, J. R., You, J., Mosher, W., Brady, H. J. M., Shoelson, S. E., & Lee, J. (2016). Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metabolism*, 23(4), 685-698. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.002>
- Leone, R. D., & Powell, J. D. (2020). Metabolism of immune cells in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 20(9), 516-531. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0273-y>
- Letko, M., Seifert, S. N., Olival, K. J., Plowright, R. K., & Munster, V. J. (2020). Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews Microbiology*, 18(8), 461-471. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0394-z>
- Li, C., Deng, Y.-Q., Wang, S., Ma, F., Aliyari, R., Huang, X.-Y., Zhang, N.-N., Watanabe, M., Dong, H.-L., Liu, P., Li, X.-F., Ye, Q., Tian, M., Hong, S., Fan, J., Zhao, H., Li, L., Vishlaghi, N., Buth, J. E., ... Cheng, G. (2017). 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model. *Immunity*, 46(3), 446-456. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.012>
- Li, G.-H., Ning, Z.-J., Liu, Y.-M., & Li, X.-H. (2017). Neurological Manifestations of Dengue Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 449. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00449>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00242>
- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S.-S., Lee, S.-A., Ge, J., Wang, S., Goldman, S. A., Zlokovic, B. V., Zhao, Z., & Jung, J. U. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*, 19(5), 663-671. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>
- Lim, W., Mathur, R., Koh, A., Yeoh, R., & Chee, S. (2004). Ocular manifestations of dengue fever. *Ophthalmology*, 111(11), 2057-2064. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2004.03.038>

- Lin, K.-C., Chang, H.-L., & Chang, R.-Y. (2004). Accumulation of a 3'-Terminal Genome Fragment in Japanese Encephalitis Virus-Infected Mammalian and Mosquito Cells. *Journal of Virology*, *78*(10), 5133-5138. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.10.5133-5138.2004>
- 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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902728>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1997). Trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *Journal of Virology*, *71*(12), 9608-9617. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9608-9617.1997>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1999). Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. *Journal of Virology*, *73*(6), 4611-4621. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.4611-4621.1999>
- Liu, L. L., Landskron, J., Ask, E. H., Enqvist, M., Sohlberg, E., Traherne, J. A., Hammer, Q., Goodridge, J. P., Larsson, S., Jayaraman, J., Oei, V. Y. S., Schaffer, M., Taskén, K., Ljunggren, H.-G., Romagnani, C., Trowsdale, J., Malmberg, K.-J., & Béziat, V. (2016). Critical Role of CD2 Co-stimulation in Adaptive Natural Killer Cell Responses Revealed in NKG2C-Deficient Humans. *Cell Reports*, *15*(5), 1088-1099. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.005>
- Liu, P.-S., Wang, H., Li, X., Chao, T., Teav, T., Christen, S., Di Conza, G., Cheng, W.-C., Chou, C.-H., Vavakova, M., Muret, C., Debackere, K., Mazzone, M., Huang, H.-D., Fendt, S.-M., Ivanisevic, J., & Ho, P.-C. (2017).  $\alpha$ -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nature Immunology*, *18*(9), 985-994. <https://doi.org/10.1038/ni.3796>
- Liu, S.-Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, M. D., Smith, J. K., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, J. A., Freiberg, A. N., Su, L., Lee, B., & Cheng, G. (2013). Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity*, *38*(1), 92-105. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.005>
- Liu, Z.-Y., Li, X.-F., Jiang, T., Deng, Y.-Q., Ye, Q., Zhao, H., Yu, J.-Y., & Qin, C.-F. (2016). Viral RNA switch mediates the dynamic control of flavivirus replicase recruitment by genome cyclization. *eLife*, *5*, e17636. <https://doi.org/10.7554/eLife.17636>
- Lo, Y.-L., Liou, G.-G., Lyu, J.-H., Hsiao, M., Hsu, T.-L., & Wong, C.-H. (2016). Dengue Virus Infection Is through a Cooperative Interaction between a Mannose Receptor and CLEC5A on Macrophage as a Multivalent Hetero-Complex. *PLOS ONE*, *11*(11), e0166474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166474>
- Loftus, R. M., Assmann, N., Kedia-Mehta, N., O'Brien, K. L., Garcia, A., Gillespie, C., Hukelmann, J. L., Oefner, P. J., Lamond, A. I., Gardiner, C. M., Dettmer, K., Cantrell, D. A., Sinclair, L. V., & Finlay, D. K. (2018). Amino acid-dependent cMyc expression is essential for NK cell metabolic and functional responses in mice. *Nature Communications*, *9*(1), 2341. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04719-2>
- Loisel-Meyer, S., Swainson, L., Craveiro, M., Oburoglu, L., Mongellaz, C., Costa, C., Martinez, M., Cosset, F.-L., Battini, J.-L., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A., Atkuri, K. R., Sitbon, M., Kinet, S., Verhoeven, E., & Taylor, N. (2012). Glut1-mediated glucose transport regulates HIV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(7), 2549-2554. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121427109>
- Louie, J. K., Acosta, M., Samuel, M. C., Schechter, R., Vugia, D. J., Harriman, K., Matyas, B. T., & the California Pandemic (H1N1) Working Group. (2011). A Novel Risk Factor for a Novel Virus: Obesity and 2009 Pandemic Influenza A (H1N1). *Clinical Infectious Diseases*, *52*(3), 301-312. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq152>
- Low, J. G. H., Ooi, E. E., & Vasudevan, S. G. (2017). Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. *The Journal of Infectious Diseases*, *215*(suppl\_2), S96-S102. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw423>
- Lucas, C. G. O., Kitoko, J. Z., Ferreira, F. M., Suzart, V. G., Papa, M. P., Coelho, S. V. A., Cavazzoni, C. B., Paulaneto, H. A., Olsen, P. C., Iwasaki, A., Pereira, R. M., Pimentel-Coelho, P. M., Vale, A. M., De Arruda, L. B., & Bozza, M. T. (2018). Critical role of CD4+ T cells and IFN $\gamma$  signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. *Nature Communications*, *9*(1), 3136. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05519-4>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>
- Malekshahi, Z., Schiela, B., Bernklau, S., Banki, Z., Würzner, R., & Stoiber, H. (2020). Interference of the Zika Virus E-Protein With the Membrane Attack Complex of the Complement System. *Frontiers in Immunology*, *11*, 569549. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.569549>
- Man, K., Miasari, M., Shi, W., Xin, A., Henstridge, D. C., Preston, S., Pellegrini, M., Belz, G. T., Smyth, G. K., Febbraio, M. A., Nutt, S. L., & Kallies, A. (2013). The transcription factor IRF4 is essential for TCR

- affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nature Immunology*, 14(11), 1155-1165. <https://doi.org/10.1038/ni.2710>
- Mancuso, P., Gottschalk, A., Phare, S. M., Peters-Golden, M., Lukacs, N. W., & Huffnagle, G. B. (2002). Leptin-Deficient Mice Exhibit Impaired Host Defense in Gram-Negative Pneumonia. *The Journal of Immunology*, 168(8), 4018-4024. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.4018>
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E. Z., Tan, H. C., Sessions, O. M., Ward, A. M., Gubler, D. J., Harris, E., Garcia-Blanco, M. A., & Ooi, E. E. (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*, 350(6257), 217-221. <https://doi.org/10.1126/science.aab3369>
- Marianneau, P., Steffan, A.-M., Royer, C., Drouet, M.-T., Jaeck, D., Kirn, A., & Deubel, V. (1999). Infection of Primary Cultures of Human Kupffer Cells by Dengue Virus : No Viral Progeny Synthesis, but Cytokine Production Is Evident. *Journal of Virology*, 73(6), 5201-5206. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.5201-5206.1999>
- Martinez, N., Ketheesan, N., Martens, G. W., West, K., Lien, E., & Kornfeld, H. (2016). Defects in early cell recruitment contribute to the increased susceptibility to respiratory *Klebsiella pneumoniae* infection in diabetic mice. *Microbes and Infection*, 18(10), 649-655. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.05.007>
- Mateo, R., Nagamine, C. M., & Kirkegaard, K. (2015). Suppression of Drug Resistance in Dengue Virus. *mBio*, 6(6), e01960-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01960-15>
- Mauriello, C. T., Hair, P. S., Rohn, R. D., Rister, N. S., Krishna, N. K., & Cunnion, K. M. (2014). Hyperglycemia Inhibits Complement-Mediated Immunological Control of *S. aureus* in a Rat Model of Peritonitis. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/762051>
- Mavigner, M., Raper, J., Kovacs-Balint, Z., Gumber, S., O'Neal, J. T., Bhaumik, S. K., Zhang, X., Habib, J., Mattingly, C., McDonald, C. E., Avanzato, V., Burke, M. W., Magnani, D. M., Bailey, V. K., Watkins, D. I., Vanderford, T. H., Fair, D., Earl, E., Feczko, E., ... Chahroudi, A. (2018). Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure, function, and behavior in infant macaques. *Science Translational Medicine*, 10(435), eaao6975. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao6975>
- Mbu-Nyamsi, D., Vincent, M., Perez-Fontana, M., Best, A.-L., Mesnard, C., Villeroy, F., Foucher, A., Raffray, L., Terrier, C. S.-P., & Bertolotti, A. (2023). Ophthalmic complications during the dengue epidemic in Reunion Island in 2020 : A case series and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, 23(1), 506. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08432-4>
- Mead, P. S., Duggal, N. K., Hook, S. A., Delorey, M., Fischer, M., Olzenak McGuire, D., Becksted, H., Max, R. J., Anishchenko, M., Schwartz, A. M., Tzeng, W.-P., Nelson, C. A., McDonald, E. M., Brooks, J. T., Brault, A. C., & Hinckley, A. F. (2018). Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *New England Journal of Medicine*, 378(15), 1377-1385. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1711038>
- Meade, N., Furey, C., Li, H., Verma, R., Chai, Q., Rollins, M. G., DiGiuseppe, S., Naghavi, M. H., & Walsh, D. (2018). Poxviruses Evade Cytosolic Sensing through Disruption of an mTORC1-mTORC2 Regulatory Circuit. *Cell*, 174(5), 1143-1157.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.053>
- Meditis, I., Vaney, M., Rouvinski, A., Rey, M., Chamot-Rooke, J., Rey, F. A., Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2020). Extensive flavivirus E trimer breathing accompanies stem zippering of the post-fusion hairpin. *EMBO Reports*, 21(8), e50069. <https://doi.org/10.15252/embr.202050069>
- 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 Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host & Microbe*, 12(4), 544-557. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.009>
- Mehlhop, E., Nelson, S., Jost, C. A., Gorlatov, S., Johnson, S., Fremont, D. H., Diamond, M. S., & Pierson, T. C. (2009). Complement Protein C1q Reduces the Stoichiometric Threshold for Antibody-Mediated Neutralization of West Nile Virus. *Cell Host & Microbe*, 6(4), 381-391. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.003>
- Meiser, J., Krämer, L., Sapcariu, S. C., Battello, N., Ghelfi, J., D'Herouel, A. F., Skupin, A., & Hiller, K. (2016). Pro-inflammatory Macrophages Sustain Pyruvate Oxidation through Pyruvate Dehydrogenase for the Synthesis of Itaconate and to Enable Cytokine Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), 3932-3946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.676817>
- Mendoza, A., Fang, V., Chen, C., Serasinghe, M., Verma, A., Muller, J., Chaluvadi, V. S., Dustin, M. L., Hla, T., Elemento, O., Chipuk, J. E., & Schwab, S. R. (2017). Lymphatic endothelial S1P promotes mitochondrial function and survival in naive T cells. *Nature*, 546(7656), 158-161. <https://doi.org/10.1038/nature22352>
- Michlmayr, D., Andrade, P., Gonzalez, K., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nature Microbiology*, 2(11), 1462-1470. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0035-0>
- Mier-y-Teran-Romero, L., Delorey, M. J., Sejvar, J. J., & Johansson, M. A. (2018). Guillain-Barré syndrome risk among individuals infected with Zika virus : A multi-country assessment. *BMC Medicine*, 16(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1052-4>

- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609919200>
- Mills, E. L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A. S. H., Varma, M., Bryant, C. E., Tourlomousis, P., Däbritz, J. H. M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S. C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H. T., Szibor, M., Xavier, R. J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M. P., & O'Neill, L. A. (2016). Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*, 167(2), 457-470.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.064>
- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host & Microbe*, 21(2), 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Mitchell, P. K., Mier-y-Teran-Romero, L., Biggerstaff, B. J., Delorey, M. J., Aubry, M., Cao-Lormeau, V.-M., Lozier, M. J., Cauchemez, S., & Johansson, M. A. (2019). Reassessing Serosurvey-Based Estimates of the Symptomatic Proportion of Zika Virus Infections. *American Journal of Epidemiology*, 188(1), 206-213. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy189>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature02165>
- Modjarrad, K., Lin, L., George, S. L., Stephenson, K. E., Eckels, K. H., De La Barrera, R. A., Jarman, R. G., Sondergaard, E., Tennant, J., Ansel, J. L., Mills, K., Koren, M., Robb, M. L., Barrett, J., Thompson, J., Kosel, A. E., Dawson, P., Hale, A., Tan, C. S., ... Michael, N. L. (2018). Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate : Phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *The Lancet*, 391(10120), 563-571. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33106-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33106-9)
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., Yenchitsomanus, P., McMichael, A., Malasit, P., & Screaton, G. (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature Medicine*, 9(7), 921-927. <https://doi.org/10.1038/nm887>
- 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. <https://doi.org/10.1261/rna.034330.112>
- Moon, S. L., Dodd, B. J. T., Brackney, D. E., Wilusz, C. J., Ebel, G. D., & Wilusz, J. (2015). Flavivirus sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery. *Virology*, 485, 322-329. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.009>
- Mooradian, A. D., Reed, R. L., Meredith, K. E., & Scuderi, P. (1991). Serum Levels of Tumor Necrosis Factor and IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in Diabetic Patients. *Diabetes Care*, 14(1), 63-65. <https://doi.org/10.2337/diabetes.14.1.63>
- Moquin, S. A., Simon, O., Karuna, R., Lakshminarayana, S. B., Yokokawa, F., Wang, F., Saravanan, C., Zhang, J., Day, C. W., Chan, K., Wang, Q.-Y., Lu, S., Dong, H., Wan, K. F., Lim, S. P., Liu, W., Seh, C. C., Chen, Y.-L., Xu, H., ... Gu, F. (2021). NITD-688, a pan-serotype inhibitor of the dengue virus NS4B protein, shows favorable pharmacokinetics and efficacy in preclinical animal models. *Science Translational Medicine*, 13(579), eabb2181. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb2181>
- Motwani, M., Pesiridis, S., & Fitzgerald, K. A. (2019). DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 20(11), 657-674. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0151-1>
- Muller, D. A., Depelsenaire, A. C. I., & Young, P. R. (2017). Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(suppl\_2), S89-S95. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335168100>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology* (9th edition). Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC.
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 723-737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), Article 3. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>
- N. Costa, M. C., Cardim, L. L., Teixeira, M. G., Barreto, M. L., Carvalho-Sauer, R. D. C. O. D., Barreto, F. R., Carvalho, M. S. I., Oliveira, W. K., França, G. V. A., Carmo, E. H., Andrade, R. F. S., Rodrigues, M. S., Veiga, R. V., Oliveira, J. F., Fernandes, Q. H. R. F., Costa, L. C., Coelho, G. E., & Paixao, E. S. (2020). Case Fatality Rate Related to Microcephaly Congenital Zika Syndrome and Associated Factors : A Nationwide Retrospective Study in Brazil †. *Viruses*, 12(11), 1228. <https://doi.org/10.3390/v12111228>

- Nakaya, M., Xiao, Y., Zhou, X., Chang, J.-H., Chang, M., Cheng, X., Blonska, M., Lin, X., & Sun, S.-C. (2014). Inflammatory T Cell Responses Rely on Amino Acid Transporter ASCT2 Facilitation of Glutamine Uptake and mTORC1 Kinase Activation. *Immunity*, *40*(5), 692-705. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.007>
- Namgaladze, D., & Brüne, B. (2014). Fatty acid oxidation is dispensable for human macrophage IL-4-induced polarization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1841*(9), 1329-1335. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.06.007>
- Nasirudeen, A. M. A., Wong, H. H., Thien, P., Xu, S., Lam, K.-P., & Liu, D. X. (2011). RIG-I, MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(1), e926. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000926>
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity : Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, *6*(3), 173-182. <https://doi.org/10.1038/nri1785>
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J., Arenzana-Seisdedos, F., & Després, 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. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor866>
- Ng, K.-H., Zhang, S. L., Tan, H. C., Kwek, S. S., Sessions, O. M., Chan, C.-Y., Liu, I. D., Lee, C. K., Tambyah, P. A., Ooi, E. E., & Yap, H.-K. (2019). Persistent Dengue Infection in an Immunosuppressed Patient Reveals the Roles of Humoral and Cellular Immune Responses in Virus Clearance. *Cell Host & Microbe*, *26*(5), 601-605.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.005>
- 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. <https://doi.org/10.3390/v9060137>
- Nguyen, M. T. A., Favelyukis, S., Nguyen, A.-K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A., Liu-Bryan, R., Glass, C. K., Neels, J. G., & Olefsky, J. M. (2007). A Subpopulation of Macrophages Infiltrates Hypertrophic Adipose Tissue and Is Activated by Free Fatty Acids via Toll-like Receptors 2 and 4 and JNK-dependent Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(48), 35279-35292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706762200>
- Nhan, N. T., Phuong, C. X. T., Kneen, R., Wills, B., Van My, N., Phuong, N. T. Q., Van Thien, C., Nga, N. T. T., Simpson, J. A., Solomon, T., White, N. J., & Farrar, J. (2001). Acute Management of Dengue Shock Syndrome : A Randomized Double-Blind Comparison of 4 Intravenous Fluid Regimens in the First Hour. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(2), 204-213. <https://doi.org/10.1086/318479>
- Nieman, D. C. (1997). Immune response to heavy exertion. *Journal of Applied Physiology*, *82*(5), 1385-1394. <https://doi.org/10.1152/jappl.1997.82.5.1385>
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Austin, M. D., & Brown, V. A. (2005). Immune Response to a 30-Minute Walk: *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *37*(1), 57-62. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000149808.38194.21>
- Nieman, D. C., & Wentz, L. M. (2019). The compelling link between physical activity and the body's defense system. *Journal of Sport and Health Science*, *8*(3), 201-217. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2018.09.009>
- Nimmanitya, S., Kliks, S. C., Burke, D. S., & Nisalak, A. (1988). Evidence That Maternal Dengue Antibodies Are Important in the Development of Dengue Hemorrhagic Fever in Infants. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *38*(2), 411-419. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.38.411>
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2009). CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine*, *15*(8), 914-920. <https://doi.org/10.1038/nm.1964>
- Nobre, L., Wise, D., Ron, D., & Volmer, R. (2015). Modulation of Innate Immune Signalling by Lipid-Mediated MAVS Transmembrane Domain Oligomerization. *PLOS ONE*, *10*(8), e0136883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136883>
- Nomura, M., Liu, J., Rovira, I. I., Gonzalez-Hurtado, E., Lee, J., Wolfgang, M. J., & Finkel, T. (2016). Fatty acid oxidation in macrophage polarization. *Nature Immunology*, *17*(3), 216-217. <https://doi.org/10.1038/ni.3366>
- Noronha, L. D., Zanluca, C., Azevedo, M. L. V., Luz, K. G., & Santos, C. N. D. D. (2016). Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(5), 287-293. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160085>
- Norouzi, M., Norouzi, S., Ruggiero, A., Khan, M. S., Myers, S., Kavanagh, K., & Vemuri, R. (2021). Type-2 Diabetes as a Risk Factor for Severe COVID-19 Infection. *Microorganisms*, *9*(6), 1211. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061211>
- Northoff, H., & Berg, A. (1991). Immunologic Mediators as Parameters of the Reaction to Strenuous Exercise. *International Journal of Sports Medicine*, *12*(S 1), S9-S15. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1024743>



- Ohno, Y., Aoki, N., & Nishimura, A. (1993). In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 77(4), 1072-1077. <https://doi.org/10.1210/jcem.77.4.8408455>
- Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., & Kishimoto, T. (1988). IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 141(5), 1543-1549.
- Okumura, F., Zou, W., & Zhang, D.-E. (2007). ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes & Development*, 21(3), 255-260. <https://doi.org/10.1101/gad.1521607>
- Okuno, Y., Igarashi, A., Fukunaga, T., Tadano, M., & Fukai, K. (1984). Electron Microscopic Observation of a Newly Isolated Flavivirus-like Virus from Field-caught Mosquitoes. *Journal of General Virology*, 65(4), 803-807. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-4-803>
- Osorio, J. E., Velez, I. D., Thomson, C., Lopez, L., Jimenez, A., Haller, A. A., Silengo, S., Scott, J., Boroughs, K. L., Stovall, J. L., Luy, B. E., Arguello, J., Beatty, M. E., Santangelo, J., Gordon, G. S., Huang, C. Y.-H., & Stinchcomb, D. T. (2014). Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naive healthy adults in Colombia : A randomised, placebo-controlled, phase 1 study. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(9), 830-838. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70811-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70811-4)
- Otipoby, K. L., Sasaki, Y., Schmidt-Supprian, M., Patke, A., Gareus, R., Pasparakis, M., Tarakhovsky, A., & Rajewsky, K. (2008). BAFF activates Akt and Erk through BAFF-R in an IKK1-dependent manner in primary mouse B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), 12435-12438. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805460105>
- Ottensmeier, C. H., Perry, K. L., Harden, E. L., Stasakova, J., Jenei, V., Fleming, J., Wood, O., Woo, J., Woelk, C. H., Thomas, G. J., & Thirdborough, S. M. (2016). Upregulated Glucose Metabolism Correlates Inversely with CD8+ T-cell Infiltration and Survival in Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, 76(14), 4136-4148. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3121>
- Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R. A., & Li, M. O. (2009). An Essential Role of the Forkhead-Box Transcription Factor Foxo1 in Control of T Cell Homeostasis and Tolerance. *Immunity*, 30(3), 358-371. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.003>
- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., & Fridman, W.-H. (2010). Immune infiltration in human tumors : A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8), 1093-1102. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.416>
- Pahl, J. H. W., Koch, J., Götz, J.-J., Arnold, A., Reusch, U., Gantke, T., Rajkovic, E., Treder, M., & Cerwenka, A. (2018). CD16A Activation of NK Cells Promotes NK Cell Proliferation and Memory-Like Cytotoxicity against Cancer Cells. *Cancer Immunology Research*, 6(5), 517-527. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0550>
- Paixão, E. S., Barreto, F., Da Glória Teixeira, M., Da Conceição N. Costa, M., & Rodrigues, L. C. (2016). History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika : A Systematic Review. *American Journal of Public Health*, 106(4), 606-612. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303112>
- Palmer, Clovis. S. (2022). Innate metabolic responses against viral infections. *Nature Metabolism*, 4(10), 1245-1259. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00652-3>
- Palsson-McDermott, E. M., Curtis, A. M., Goel, G., Lauterbach, M. A. R., Sheedy, F. J., Gleeson, L. E., van den Bosch, M. W. M., Quinn, S. R., Domingo-Fernandez, R., Johnston, D. G. W., Jiang, J., Israelsen, W. J., Keane, J., Thomas, C., Clish, C., Vander Heiden, M., Xavier, R. J., & O'Neill, L. A. J. (2015). Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1 $\alpha$  Activity and IL-1 $\beta$  Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages. *Cell Metabolism*, 21(1), 65-80. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.005>
- Pan, H., O'Brien, T. F., Wright, G., Yang, J., Shin, J., Wright, K. L., & Zhong, X.-P. (2013). Critical Role of the Tumor Suppressor Tuberous Sclerosis Complex 1 in Dendritic Cell Activation of CD4 T Cells by Promoting MHC Class II Expression via IRF4 and CIITA. *The Journal of Immunology*, 191(2), 699-707. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201443>
- Panayiotou, C., Lindqvist, R., Kurhade, C., Vonderstein, K., Pasto, J., Edlund, K., Upadhyay, A. S., & Överby, A. K. (2018). Viperin Restricts Zika Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Replication by Targeting NS3 for Proteasomal Degradation. *Journal of Virology*, 92(7), e02054-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02054-17>
- Pape, K., Ryttergaard, L., Rotevatn, T. A., Nielsen, B. J., Torp-Pedersen, C., Overgaard, C., & Bøggild, H. (2016). Leisure-Time Physical Activity and the Risk of Suspected Bacterial Infections. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 48(9), 1737-1744. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000953>

- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705755200>
- 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., ... Weissman, D. (2017). Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, 543(7644), 248-251. <https://doi.org/10.1038/nature21428>
- Patke, A., Mecklenbräuker, I., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Tarakhovskiy, A. (2006). BAFF controls B cell metabolic fitness through a PKC $\beta$ - and Akt-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(11), 2551-2562. <https://doi.org/10.1084/jem.20060990>
- Paz, S., Vilasco, M., Werden, S. J., Arguello, M., Joseph-Pillai, D., Zhao, T., Nguyen, T. L.-A., Sun, Q., Meurs, E. F., Lin, R., & Hiscott, J. (2011). A functional C-terminal TRAF3-binding site in MAVS participates in positive and negative regulation of the IFN antiviral response. *Cell Research*, 21(6), 895-910. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.2>
- Pearce, E. J., & Everts, B. (2015). Dendritic cell metabolism. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), 18-29. <https://doi.org/10.1038/nri3771>
- Peiris, J. S. M., Gordon, S., Unkeless, J. C., & Porterfield, J. S. (1981). Monoclonal anti-Fc receptor IgG blocks antibody enhancement of viral replication in macrophages. *Nature*, 289(5794), 189-191. <https://doi.org/10.1038/289189a0>
- Perner, A., Nielsen, S. E., & Rask-Madsen, J. (2003). High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensive Care Medicine*, 29(4), 642-645. <https://doi.org/10.1007/s00134-002-1628-4>
- Pettersson, J. H.-O., & Fiz-Palacios, O. (2014). Dating the origin of the genus Flavivirus in the light of Beringian biogeography. *Journal of General Virology*, 95(9), 1969-1982. <https://doi.org/10.1099/vir.0.065227-0>
- Peyssonnaud, C., Datta, V., Cramer, T., Doedens, A., Theodorakis, E. A., Gallo, R. L., Hurtado-Ziola, N., Nizet, V., & Johnson, R. S. (2005). HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1806-1815. <https://doi.org/10.1172/JCI23865>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1132998>
- Pijlman, G. P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., Van Der Aa, L., Liu, W. J., Palmenberg, A. C., Shi, P.-Y., Hall, R. A., & Khromykh, A. A. (2008). A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host & Microbe*, 4(6), 579-591. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.007>
- Pindel, A., & Sadler, A. (2011). The Role of Protein Kinase R in the Interferon Response. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(1), 59-70. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0099>
- Plaszczyc, A., Scaturro, P., Neufeldt, C. J., Cortese, M., Cerikan, B., Ferla, S., Brancale, A., Pichlmair, A., & Bartenschlager, R. (2019). A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle. *PLOS Pathogens*, 15(5), e1007736. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007736>
- Popkin, B. M., Du, S., Green, W. D., Beck, M. A., Algaith, T., Herbst, C. H., Alsukait, R. F., Alluhidan, M., Alazemi, N., & Shekar, M. (2020). Individuals with obesity and COVID-19 : A global perspective on the epidemiology and biological relationships. *Obesity Reviews*, 21(11). <https://doi.org/10.1111/obr.13128>
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D. R., & Harris, E. (2016). Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLOS Pathogens*, 12(7), e1005738. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005738>
- Pugliese, G., Liccardi, A., Graziadio, C., Barrea, L., Muscogiuri, G., & Colao, A. (2022). Obesity and infectious diseases : Pathophysiology and epidemiology of a double pandemic condition. *International Journal of Obesity*, 46(3), 449-465. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-01035-6>
- Rabinowitz, J. D., Beeson, C., Wülfing, C., Tate, K., Allen, P. M., Davis, M. M., & McConnell, H. M. (1996). Altered T Cell Receptor Ligands Trigger a Subset of Early T Cell Signals. *Immunity*, 5(2), 125-135. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80489-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80489-6)
- Ramiharimanana, F. D., Haddad, J. G., Andrianavalonirina, M. A., Apel, C., Olivon, F., Diotel, N., Desprès, P., Ramanandraibe, V. V., & El Kalamouni, C. (2022). Antiviral Effect of Stenocline ericoides DC. and Stenocline inuloides DC., Two Flavonoid-Rich Endemic Plants from Madagascar, against Dengue and Zika Viruses. *Pharmaceuticals*, 15(12), 1500. <https://doi.org/10.3390/ph15121500>
- Raybuck, A. L., Lee, K., Cho, S. H., Li, J., Thomas, J. W., & Boothby, M. R. (2019). mTORC1 as a cell-intrinsic rheostat that shapes development, preimmune repertoire, and function of B lymphocytes. *The FASEB Journal*, 33(12), 13202-13215. <https://doi.org/10.1096/fj.201900069R>

- Reed, W. (1983). The Etiology of Yellow Fever: An Additional Note. *JAMA*, 250(5), 649. <https://doi.org/10.1001/jama.1983.03340050061034>
- Regla-Nava, J. A., Elong Ngono, A., Viramontes, K. M., Huynh, A.-T., Wang, Y.-T., Nguyen, A.-V. T., Salgado, R., Mamidi, A., Kim, K., Diamond, M. S., & Shresta, S. (2018). Cross-reactive Dengue virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells protect against Zika virus during pregnancy. *Nature Communications*, 9(1), 3042. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05458-0>
- Reid, V. L. (2004). Clinical investigation of athletes with persistent fatigue and/or recurrent infections. *British Journal of Sports Medicine*, 38(1), 42-45. <https://doi.org/10.1136/bjsm.2002.002634>
- Reinhold, D., & Ansoorge, S. (1996). Elevated Glucose Levels Stimulate Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Suppress Interleukin IL-2, IL-6 and IL-10 Production and DNA Synthesis in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Hormone and Metabolic Research*, 28(06), 267-270. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979789>
- Reiterer, M., Rajan, M., Gómez-Banoy, N., Lau, J. D., Gomez-Escobar, L. G., Ma, L., Gilani, A., Alvarez-Mulett, S., Sholle, E. T., Chandar, V., Bram, Y., Hoffman, K., Bhardwaj, P., Piloco, P., Rubio-Navarro, A., Uhl, S., Carrau, L., Houhgtton, S., Redmond, D., ... Lo, J. C. (2021). Hyperglycemia in acute COVID-19 is characterized by insulin resistance and adipose tissue infectivity by SARS-CoV-2. *Cell Metabolism*, 33(11), 2174-2188.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.09.009>
- Reslan, A., Haddad, J. G., Desprès, P., Bascands, J.-L., & Gadea, G. (2022). High Glucose Induces in HK2 Kidney Cells an IFN-Dependent ZIKV Antiviral Status Fueled by Viperin. *Biomedicines*, 10(7), 1577. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071577>
- Restrepo, B. I., Twahirwa, M., Rahbar, M. H., & Schlesinger, L. S. (2014). Phagocytosis via Complement or Fc-Gamma Receptors Is Compromised in Monocytes from Type 2 Diabetes Patients with Chronic Hyperglycemia. *PLoS ONE*, 9(3), e92977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092977>
- Rey, F. A., Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2017). Flavivirus structural heterogeneity: Implications for cell entry. *Current Opinion in Virology*, 24, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.009>
- 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. <https://doi.org/10.15252/embr.201745302>
- Rice, C. M., Grakoui, A., Galler, R., & Chambers, T. J. (1989). Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *The New Biologist*, 1(3), 285-296.
- Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S. J., Sheets, R. L., & Strauss, J. H. (1985). Nucleotide Sequence of Yellow Fever Virus: Implications for Flavivirus Gene Expression and Evolution. *Science*, 229(4715), 726-733. <https://doi.org/10.1126/science.4023707>
- Richardson, R. B., Ohlson, M. B., Eitson, J. L., Kumar, A., McDougal, M. B., Boys, I. N., Mar, K. B., De La Cruz-Rivera, P. C., Douglas, C., Konopka, G., Xing, C., & Schoggins, J. W. (2018). A CRISPR screen identifies IFI6 as an ER-resident interferon effector that blocks flavivirus replication. *Nature Microbiology*, 3(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0244-1>
- Richner, J. M., Himansu, S., Dowd, K. A., Butler, S. L., Salazar, V., Fox, J. M., Julander, J. G., Tang, W. W., Shresta, S., Pierson, T. C., Ciaramella, G., & Diamond, M. S. (2017). Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell*, 168(6), 1114-1125.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.017>
- Richner, J. M., Jagger, B. W., Shan, C., Fontes, C. R., Dowd, K. A., Cao, B., Himansu, S., Caine, E. A., Nunes, B. T. D., Medeiros, D. B. A., Muruato, A. E., Foreman, B. M., Luo, H., Wang, T., Barrett, A. D., Weaver, S. C., Vasconcelos, P. F. C., Rossi, S. L., Ciaramella, G., ... Diamond, M. S. (2017). Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. *Cell*, 170(2), 273-283.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.040>
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11(9), 785-797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
- Rivera-Serrano, E. E., Gizzi, A. S., Arnold, J. J., Grove, T. L., Almo, S. C., & Cameron, C. E. (2020). Viperin Reveals Its True Function. *Annual Review of Virology*, 7(1), 421-446. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-011720-095930>
- Rivero, A., Vézilier, J., Weill, M., Read, A. F., & Gandon, S. (2010). Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? *PLoS Pathogens*, 6(8), e1001000. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001000>
- Rodríguez-Prados, J.-C., Través, P. G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M., & Boscá, L. (2010). Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *The Journal of Immunology*, 185(1), 605-614. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901698>
- Roundy, C. M., Azar, S. R., Rossi, S. L., Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2017). Insect-Specific Viruses. In *Advances in Virus Research* (Vol. 98, p. 119-146). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.10.001>

- Rush, B. (1794). *An account of the bilious remitting yellow fever, as it appeared in the city of Philadelphia, in the year 1793* (Second edition.). Printed by Thomas Dobson, at the stone house, no 41, South Second-Street.
- Sabchareon, A., Wallace, D., Sirivichayakul, C., Limkittikul, K., Chanthavanich, P., Suvannadabba, S., Jiwariya-vej, V., Dulyachai, W., Pengsaa, K., Wartel, T. A., Moureau, A., Saville, M., Bouckenoghe, A., Viviani, S., Tornieporth, N. G., & Lang, J. (2012). Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren : A randomised, controlled phase 2b trial. *The Lancet*, 380(9853), 1559-1567. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61428-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61428-7)
- Sabin, A. B. (1952). Research on Dengue during World War II 1. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1(1), 30-50. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1952.1.30>
- Sadiku, P., Willson, J. A., Dickinson, R. S., Murphy, F., Harris, A. J., Lewis, A., Sammut, D., Mirchandani, A. S., Ryan, E., Watts, E. R., Thompson, A. A. R., Marriott, H. M., Dockrell, D. H., Taylor, C. T., Schneider, M., Maxwell, P. H., Chilvers, E. R., Mazzone, M., Moral, V., ... Walmsley, S. R. (2017). Prolyl hydroxylase 2 inactivation enhances glycogen storage and promotes excessive neutrophilic responses. *Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3407-3420. <https://doi.org/10.1172/JCI90848>
- Sahoo, B. R., Crook, A. A., Pattnaik, A., Torres-Gerena, A. D., Khalimonchuk, O., Powers, R., Franco, R., & Pattnaik, A. K. (2023). Redox Regulation and Metabolic Dependency of Zika Virus Replication : Inhibition by Nrf2-Antioxidant Response and NAD(H) Antimetabolites. *Journal of Virology*, 97(2), e01363-22. <https://doi.org/10.1128/jvi.01363-22>
- Sanchez, E. L., Pulliam, T. H., Dimaio, T. A., Thalhofer, A. B., Delgado, T., & Lagunoff, M. (2017). Glycolysis, Glutaminolysis, and Fatty Acid Synthesis Are Required for Distinct Stages of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lytic Replication. *Journal of Virology*, 91(10), e02237-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02237-16>
- Sangkaew, S., Ming, D., Boonyasiri, A., Honeyford, K., Kalayanarooj, S., Yacoub, S., Dorigatti, I., & Holmes, A. (2021). Risk predictors of progression to severe disease during the febrile phase of dengue : A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(7), 1014-1026. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30601-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30601-0)
- Sassetti, M., Zé-Zé, L., Franco, J., Cunha, J. D., Gomes, A., Tomé, A., & Alves, M.-J. (2018). First case of confirmed congenital Zika syndrome in continental Africa. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 112(10), 458-462. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try074>
- Sathaliyawala, T., O'Gorman, W. E., Greter, M., Bogunovic, M., Konjufca, V., Hou, Z. E., Nolan, G. P., Miller, M. J., Merad, M., & Reizis, B. (2010). Mammalian Target of Rapamycin Controls Dendritic Cell Development Downstream of Flt3 Ligand Signaling. *Immunity*, 33(4), 597-606. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.012>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70834-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70834-5)
- Schiela, B., Bernklau, S., Malekshahi, Z., Deutschmann, D., Koske, I., Banki, Z., Thielens, N. M., Würzner, R., Speth, C., Weiss, G., Stiasny, K., Steinmann, E., & Stoiber, H. (2018). Active Human Complement Reduces the Zika Virus Load via Formation of the Membrane-Attack Complex. *Frontiers in Immunology*, 9, 2177. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02177>
- Schoggins, J. W. (2019). Interferon-Stimulated Genes : What Do They All Do? *Annual Review of Virology*, 6(1), 567-584. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>
- Schoggins, J. W., MacDuff, D. A., Imanaka, N., Gainey, M. D., Shrestha, B., Eitson, J. L., Mar, K. B., Richardson, R. B., Ratushny, A. V., Litvak, V., Dabelic, R., Manicassamy, B., Aitchison, J. D., Aderem, A., Elliott, R. M., García-Sastre, A., Racaniello, V., Snijder, E. J., Yokoyama, W. M., ... Rice, C. M. (2014). Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature*, 505(7485), 691-695. <https://doi.org/10.1038/nature12862>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00207-12>
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Zeltser, L. M., Drewnowski, A., Ravussin, E., Redman, L. M., & Leibel, R. L. (2017). Obesity Pathogenesis : An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 38(4), 267-296. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00111>
- Schweighoffer, E., Nys, J., Vanes, L., Smithers, N., & Tybulewicz, V. L. J. (2017). TLR4 signals in B lymphocytes are transduced via the B cell antigen receptor and SYK. *Journal of Experimental Medicine*, 214(5), 1269-1280. <https://doi.org/10.1084/jem.20161117>
- Schweighoffer, E., Vanes, L., Nys, J., Cantrell, D., McCleary, S., Smithers, N., & Tybulewicz, V. L. J. (2013). The BAFF Receptor Transduces Survival Signals by Co-opting the B Cell Receptor Signaling Pathway. *Immunity*, 38(3), 475-488. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.015>

- Seet, R. C. S., Quek, A. M. L., & Lim, E. C. H. (2007). Post-infectious fatigue syndrome in dengue infection. *Journal of Clinical Virology*, 38(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.10.011>
- Sekaran, S. D., Liew, Z. M., Yam, H. C., & Raju, C. S. (2022). The association between diabetes and obesity with Dengue infections. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 14(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s13098-022-00870-5>
- Sen Santara, S., Lee, D.-J., Crespo, Â., Hu, J. J., Walker, C., Ma, X., Zhang, Y., Chowdhury, S., Meza-Sosa, K. F., Lewandrowski, M., Zhang, H., Rowe, M., McClelland, A., Wu, H., Junqueira, C., & Lieberman, J. (2023). The NK cell receptor NKp46 recognizes ecto-calreticulin on ER-stressed cells. *Nature*, 616(7956), 348-356. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05912-0>
- Serna, M., Giles, J. L., Morgan, B. P., & Bubeck, D. (2016). Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nature Communications*, 7(1), 10587. <https://doi.org/10.1038/ncomms10587>
- Shan, C., Muruato, A. E., Nunes, B. T. D., Luo, H., Xie, X., Medeiros, D. B. A., Wakamiya, M., Tesh, R. B., Barrett, A. D., Wang, T., Weaver, S. C., Vasconcelos, P. F. C., Rossi, S. L., & Shi, P.-Y. (2017). A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nature Medicine*, 23(6), 763-767. <https://doi.org/10.1038/nm.4322>
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzamelis, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3015-3025. <https://doi.org/10.1172/JCI28898>
- Shi, H.-X., Yang, K., Liu, X., Liu, X.-Y., Wei, B., Shan, Y.-F., Zhu, L.-H., & Wang, C. (2010). Positive Regulation of Interferon Regulatory Factor 3 Activation by Herc5 via ISG15 Modification. *Molecular and Cellular Biology*, 30(10), 2424-2436. <https://doi.org/10.1128/MCB.01466-09>
- Shipman, A. R., & Millington, G. W. M. (2011). Obesity and the skin : Obesity and the skin. *British Journal of Dermatology*, 165(4), 743-750. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10393.x>
- Shiratori, R., Furuichi, K., Yamaguchi, M., Miyazaki, N., Aoki, H., Chibana, H., Ito, K., & Aoki, S. (2019). Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Scientific Reports*, 9(1), 18699. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55296-3>
- Shrestha, S., Yang, K., Wei, J., Karmaus, P. W. F., Neale, G., & Chi, H. (2014). Tsc1 promotes the differentiation of memory CD8<sup>+</sup> T cells via orchestrating the transcriptional and metabolic programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), 14858-14863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404264111>
- Shu, B., Ooi, J. S. G., Tan, A. W. K., Ng, T.-S., Dejnirattisai, W., Mongkolsapaya, J., Fibriansah, G., Shi, J., Kostyuchenko, V. A., Screaton, G. R., & Lok, S.-M. (2022). CryoEM structures of the multimeric secreted NS1, a major factor for dengue hemorrhagic fever. *Nature Communications*, 13(1), 6756. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34415-1>
- Shum, M., Bellmann, K., St-Pierre, P., & Marette, A. (2016). Pharmacological inhibition of S6K1 increases glucose metabolism and Akt signalling in vitro and in diet-induced obese mice. *Diabetologia*, 59(3), 592-603. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3839-6>
- Shum, M., Houde, V. P., Bellemare, V., Junges Moreira, R., Bellmann, K., St-Pierre, P., Viollet, B., Foretz, M., & Marette, A. (2019). Inhibition of mitochondrial complex 1 by the S6K1 inhibitor PF-4708671 partly contributes to its glucose metabolic effects in muscle and liver cells. *Journal of Biological Chemistry*, 294(32), 12250-12260. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008488>
- Sinclair, L. V., Rolf, J., Emslie, E., Shi, Y.-B., Taylor, P. M., & Cantrell, D. A. (2013). Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nature Immunology*, 14(5), 500-508. <https://doi.org/10.1038/ni.2556>
- Singh, K., Martinez, M. G., Lin, J., Gregory, J., Nguyen, T. U., Abdelaal, R., Kang, K., Brennand, K., Grünweller, A., Ouyang, Z., Phatnani, H., Kielian, M., & Wendel, H.-G. (2022). Transcriptional and Translational Dynamics of Zika and Dengue Virus Infection. *Viruses*, 14(7), 1418. <https://doi.org/10.3390/v14071418>
- Singh, P. K., Singh, S., Farr, D., & Kumar, A. (2019). Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) restricts Zika virus replication in primary human corneal epithelial cells. *The Ocular Surface*, 17(3), 551-559. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2019.03.006>
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., & Hauner, H. (2007). Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(3), 1023-1033. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1055>
- Smith, A. G., Sheridan, P. A., Tseng, R. J., Sheridan, J. F., & Beck, M. A. (2009). Selective impairment in dendritic cell function and altered antigen-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses in diet-induced obese mice infected with influenza virus. *Immunology*, 126(2), 268-279. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02895.x>
- Song, Y., Mugavero, J., Stauff, C. B., & Wimmer, E. (2019). Dengue and Zika Virus 5' Untranslated Regions Harbor Internal Ribosomal Entry Site Functions. *mBio*, 10(2), e00459-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00459-19>

- SPF. (2021, décembre). *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>
- 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., Bouckennooghe, A., Chen, J., ... DiazGranados, C. A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *New England Journal of Medicine*, 379(4), 327-340. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800820>
- 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. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8475-8481.1997>
- Staples, J. E. (2008). Yellow Fever: 100 Years of Discovery. *JAMA*, 300(8), 960. <https://doi.org/10.1001/jama.300.8.960>
- Stegenga, M. E., van der Crabben, S. N., Blümer, R. M. E., Levi, M., Meijers, J. C. M., Serlie, M. J., Tanck, M. W. T., Sauerwein, H. P., & van der Poll, T. (2008). Hyperglycemia enhances coagulation and reduces neutrophil degranulation, whereas hyperinsulinemia inhibits fibrinolysis during human endotoxemia. *Blood*, 112(1), 82-89. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-121723>
- Steinbrink, K., Mahnke, K., Grabbe, S., Enk, A. H., & Jonuleit, H. (2009). Myeloid dendritic cell : From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance? *Human Immunology*, 70(5), 289-293. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.02.003>
- Stoermer, K. A., & Morrison, T. E. (2011). Complement and viral pathogenesis. *Virology*, 411(2), 362-373. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.045>
- Sumathy, K., Kulkarni, B., Gondu, R. K., Ponnuru, S. K., Bonguram, N., Eligeti, R., Gadiyaram, S., Praturi, U., Chougule, B., Karunakaran, L., & Ella, K. M. (2017). Protective efficacy of Zika vaccine in AG129 mouse model. *Scientific Reports*, 7(1), 46375. <https://doi.org/10.1038/srep46375>
- Suzich, J. B., & Cliffe, A. R. (2018). Strength in diversity : Understanding the pathways to herpes simplex virus reactivation. *Virology*, 522, 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.07.011>
- Suzuki, A., Yamaguchi, M. T., Ohteki, T., Sasaki, T., Kaisho, T., Kimura, Y., Yoshida, R., Wakeham, A., Higuchi, T., Fukumoto, M., Tsubata, T., Ohashi, P. S., Koyasu, S., Penninger, J. M., Nakano, T., & Mak, T. W. (2001). T Cell-Specific Loss of Pten Leads to Defects in Central and Peripheral Tolerance. *Immunity*, 14(5), 523-534. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00134-0)
- Suzuki, H., Tashiro, S., Hira, S., Sun, J., Yamazaki, C., Zenke, Y., Ikeda-Saito, M., Yoshida, M., & Igarashi, K. (2004). Heme regulates gene expression by triggering Crml-dependent nuclear export of Bach1. *The EMBO Journal*, 23(13), 2544-2553. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600248>
- Swamy, M., Pathak, S., Grzes, K. M., Damerow, S., Sinclair, L. V., Van Aalten, D. M. F., & Cantrell, D. A. (2016). Glucose and glutamine fuel protein O-GlcNAcylation to control T cell self-renewal and malignancy. *Nature Immunology*, 17(6), 712-720. <https://doi.org/10.1038/ni.3439>
- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome : Molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology*, 19(8), 477-489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
- Taïlé, J., Arcambal, A., Clerc, P., Gauvin-Bialecki, A., & Gonthier, M.-P. (2020). Medicinal Plant Polyphenols Attenuate Oxidative Stress and Improve Inflammatory and Vasoactive Markers in Cerebral Endothelial Cells during Hyperglycemic Condition. *Antioxidants*, 9(7), 573. <https://doi.org/10.3390/antiox9070573>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>
- Tangnararatchakit, K., Tirapanich, W., Tapaneya-Olarn, W., Sumethkul, V., Sirachainan, N., Watcharananan, S., Leenanapunth, C., Yoksan, S., & Chuansumrit, A. (2012). Severe Nonfebrile Dengue Infection in an Adolescent After Postoperative Kidney Transplantation : A Case Report. *Transplantation Proceedings*, 44(1), 303-306. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.11.025>
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., ... O'Neill, L. A. J. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 496(7444), 238-242. <https://doi.org/10.1038/nature11986>
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Patanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L., Steinman, R. M., Schlesinger, S., & Marovich, M. A. (2003). DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(7), 823-829. <https://doi.org/10.1084/jem.20021840>
- Tenthorey, J. L., Emerman, M., & Malik, H. S. (2022). Evolutionary Landscapes of Host-Virus Arms Races. *Annual Review of Immunology*, 40(1), 271-294. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-072621-084422>

- Teoh, E. P., Kukkaro, P., Teo, E. W., Lim, A. P. C., Tan, T. T., Yip, A., Schul, W., Aung, M., Kostyuchenko, V. A., Leo, Y. S., Chan, S. H., Smith, K. G. C., Chan, A. H. Y., Zou, G., Ooi, E. E., Kemeny, D. M., Tan, G. K., Ng, J. K. W., Ng, M. L., ... MacAry, P. A. (2012). The Structural Basis for Serotype-Specific Neutralization of Dengue Virus by a Human Antibody. *Science Translational Medicine*, 4(139). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003888>
- Terenzi, F., Hui, D. J., Merrick, W. C., & Sen, G. C. (2006). Distinct Induction Patterns and Functions of Two Closely Related Interferon-inducible Human Genes, ISG54 and ISG56. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34064-34071. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605771200>
- Terrén, I., Orrantia, A., Vitallé, J., Zenarruzabeitia, O., & Borrego, F. (2019). NK Cell Metabolism and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10, 2278. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02278>
- Thaker, S. K., Ch'ng, J., & Christofk, H. R. (2019). Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biology*, 17(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0678-9>
- Thiemmecca, S., Tamdet, C., Punyadee, N., Prommool, T., Songjaeng, A., Noisakran, S., Puttikhunt, C., Atkinson, J. P., Diamond, M. S., Ponlawat, A., & Avirutnan, P. (2016). Secreted NS1 Protects Dengue Virus from Mannose-Binding Lectin-Mediated Neutralization. *The Journal of Immunology*, 197(10), 4053-4065. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600323>
- Thomas, S. P., & Suthers, R. A. (1972). The Physiology and Energetics of Bat Flight. *Journal of Experimental Biology*, 57(2), 317-335. <https://doi.org/10.1242/jeb.57.2.317>
- Thompson, A. A. R., Elks, P. M., Marriott, H. M., Eamsamarn, S., Higgins, K. R., Lewis, A., Williams, L., Parmar, S., Shaw, G., McGrath, E. E., Formenti, F., Van Eeden, F. J., Kinnula, V. L., Pugh, C. W., Sabroe, I., Dockrell, D. H., Chilvers, E. R., Robbins, P. A., Percy, M. J., ... Walmsley, S. R. (2014). Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates key neutrophil functions in humans, mice, and zebrafish. *Blood*, 123(3), 366-376. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-500207>
- Thullier, P., Demangel, C., Bedouelle, H., Mégret, F., Jouan, A., Deubel, V., Mazié, J.-C., & Lafaye, P. (2001). Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes : Insight into the neutralization mechanism. *Journal of General Virology*, 82(8), 1885-1892. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1885>
- Turpin, J., El-Safadi, D., Lebeau, G., Frumence, E., Desprès, P., Viranaïcken, W., & Krejbich-Trotot, P. (2021). CHOP Pro-Apoptotic Transcriptional Program in Response to ER Stress Is Hacked by Zika Virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3750. <https://doi.org/10.3390/ijms22073750>
- Turpin, J., Frumence, E., Desprès, P., Viranaïcken, W., & Krejbich-Trotot, P. (2019). The ZIKA Virus Delays Cell Death Through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. *Cells*, 8(11), 1338. <https://doi.org/10.3390/cells8111338>
- Turpin, J., Frumence, E., Harrabi, W., Haddad, J. G., El Kalamouni, C., Desprès, P., Krejbich-Trotot, P., & Viranaïcken, W. (2020). Zika virus subversion of chaperone GRP78/BiP expression in A549 cells during UPR activation. *Biochimie*, 175, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.011>
- Twiddy, S. S., Holmes, E. C., & Rambaut, A. (2003). Inferring the Rate and Time-Scale of Dengue Virus Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 20(1), 122-129. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg010>
- Tyrakis, P. A., Palazon, A., Macias, D., Lee, Kian. L., Phan, Anthony. T., Veliça, P., You, J., Chia, G. S., Sim, J., Doedens, A., Abelanet, A., Evans, C. E., Griffiths, J. R., Poellinger, L., Goldrath, A. W., & Johnson, R. S. (2016). S-2-hydroxyglutarate regulates CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte fate. *Nature*, 540(7632), 236-241. <https://doi.org/10.1038/nature20165>
- Uchida, L., Espada-Murao, L. A., Takamatsu, Y., Okamoto, K., Hayasaka, D., Yu, F., Nabeshima, T., Buerano, C. C., & Morita, K. (2014). The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. *Scientific Reports*, 4(1), 7395. <https://doi.org/10.1038/srep07395>
- Vallerskog, T., Martens, G. W., & Kornfeld, H. (2010). Diabetic Mice Display a Delayed Adaptive Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*, 184(11), 6275-6282. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000304>
- Van Den Elsen, K., Quek, J. P., & Luo, D. (2021). Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses*, 13(6), 956. <https://doi.org/10.3390/v13060956>
- Van Der Linden, V., Pessoa, A., Dobyns, W., Barkovich, A. J., Júnior, H. V. D. L., Filho, E. L. R., Ribeiro, E. M., Leal, M. D. C., Coimbra, P. P. D. A., Aragão, M. D. F. V. V., Verçosa, I., Ventura, C., Ramos, R. C., Cruz, D. D. C. S., Cordeiro, M. T., Mota, V. M. R., Dott, M., Hillard, C., & Moore, C. A. (2016). Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth—Brazil. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(47), 1343-1348. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6547e2>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000244>
- Van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1(1), 1-30.

- Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J. I., Zhang, L., Smith, K. L., Morel, C. R., Greaves, D. R., Murray, P. J., & Chawla, A. (2006). Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metabolism*, *4*(1), 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.011>
- 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. <https://doi.org/10.1086/315215>
- 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., ... Noriega, F. (2015). Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *New England Journal of Medicine*, *372*(2), 113-123. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411037>
- Villordo, S. M., Carballeda, J. M., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2016). RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. *Trends in Microbiology*, *24*(4), 270-283. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.002>
- Villordo, S. M., Filomatori, C. V., Sánchez-Vargas, I., Blair, C. D., & Gamarnik, A. V. (2015). Dengue Virus RNA Structure Specialization Facilitates Host Adaptation. *PLOS Pathogens*, *11*(1), e1004604. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004604>
- Villordo, S. M., & Gamarnik, A. V. (2013). Differential RNA Sequence Requirement for Dengue Virus Replication in Mosquito and Mammalian Cells. *Journal of Virology*, *87*(16), 9365-9372. <https://doi.org/10.1128/JVI.00567-13>
- Voelxen, N. F., Blatt, S., Knopf, P., Henkel, M., Appelhans, C., Righesso, L. A. R., Pabst, A., Goldschmitt, J., Walenta, S., Neff, A., Mueller-Klieser, W., & Ziebart, T. (2018). Comparative metabolic analysis in head and neck cancer and the normal gingiva. *Clinical Oral Investigations*, *22*(2), 1033-1043. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2185-0>
- Wang, F., Alain, T., Szretter, K. J., Stephenson, K., Pol, J. G., Atherton, M. J., Hoang, H.-D., Fonseca, B. D., Zakaria, C., Chen, L., Rangwala, Z., Hesch, A., Chan, E. S. Y., Tuinman, C., Suthar, M. S., Jiang, Z., Ashkar, A. A., Thomas, G., Kozma, S. C., ... Lichty, B. D. (2016). S6K-STING interaction regulates cytosolic DNA-mediated activation of the transcription factor IRF3. *Nature Immunology*, *17*(5), 514-522. <https://doi.org/10.1038/ni.3433>
- Wang, J. P., Liu, P., Latz, E., Golenbock, D. T., Finberg, R. W., & Libraty, D. H. (2006). Flavivirus Activation of Plasmacytoid Dendritic Cells Delineates Key Elements of TLR7 Signaling beyond Endosomal Recognition. *The Journal of Immunology*, *177*(10), 7114-7121. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7114>
- Wang, P.-G., Kudelko, M., Lo, J., Siu, L. Y. L., Kwok, K. T. H., Sachse, M., Nicholls, J. M., Bruzzone, R., Altmeier, R. M., & Nal, B. (2009). Efficient Assembly and Secretion of Recombinant Subviral Particles of the Four Dengue Serotypes Using Native prM and E Proteins. *PLoS ONE*, *4*(12), e8325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008325>
- Wang, R., Dillon, C. P., Shi, L. Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L. L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., & Green, D. R. (2011). The Transcription Factor Myc Controls Metabolic Reprogramming upon T Lymphocyte Activation. *Immunity*, *35*(6), 871-882. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.021>
- Wang, W.-K., Lin, S.-R., Lee, C.-M., King, C.-C., & Chang, S.-C. (2002). Dengue Type 3 Virus in Plasma Is a Population of Closely Related Genomes: Quasispecies. *Journal of Virology*, *76*(9), 4662-4665. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4662-4665.2002>
- Wang, Y., Ren, K., Li, S., Yang, C., & Chen, L. (2020). Interferon stimulated gene 15 promotes Zika virus replication through regulating Jak/STAT and ISGylation pathways. *Virus Research*, *287*, 198087. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198087>
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, *123*(3191), 309-314.
- Waters, L. R., Ahsan, F. M., Wolf, D. M., Shirihai, O., & Teitell, M. A. (2018). Initial B Cell Activation Induces Metabolic Reprogramming and Mitochondrial Remodeling. *iScience*, *5*, 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.005>
- Wculek, S. K., Dunphy, G., Heras-Murillo, I., Mastrangelo, A., & Sancho, D. (2022). Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. *Cellular & Molecular Immunology*, *19*(3), 384-408. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00791-9>
- Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses : Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, *9*(4), 523-540. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>
- Weber, D., Rutala, W., Samsa, G., Bradshaw, S., & Lemon, S. (1986). Impaired Immunogenicity of Hepatitis B Vaccine in Obese Persons. *New England Journal of Medicine*, *314*(21), 1393-1393. <https://doi.org/10.1056/NEJM198605223142119>



- Wee, Y. S., Roundy, K. M., Weis, J. J., & Weis, J. H. (2012). Interferon-inducible transmembrane proteins of the innate immune response act as membrane organizers by influencing clathrin and v-ATPase localization and function. *Innate Immunity*, *18*(6), 834-845. <https://doi.org/10.1177/1753425912443392>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1796-1808. <https://doi.org/10.1172/JCI200319246>
- Weisel, F. J., Mullett, S. J., Elsner, R. A., Menk, A. V., Trivedi, N., Luo, W., Wikenheiser, D., Hawse, W. F., Chikina, M., Smita, S., Conter, L. J., Joachim, S. M., Wendell, S. G., Jurczak, M. J., Winkler, T. H., Delgoffe, G. M., & Shlomchik, M. J. (2020). Germinal center B cells selectively oxidize fatty acids for energy while conducting minimal glycolysis. *Nature Immunology*, *21*(3), 331-342. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0598-4>
- Weiskopf, D., Angelo, M. A., De Azeredo, E. L., Sidney, J., Greenbaum, J. A., Fernando, A. N., Broadwater, A., Kolla, R. V., De Silva, A. D., De Silva, A. M., Mattia, K. A., Doranz, B. J., Grey, H. M., Shresta, S., Peters, B., & Sette, A. (2013). Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8<sup>+</sup> T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.1305227110>
- Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V., Cross, J. R., & Thompson, C. B. (2009). ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation. *Science*, *324*(5930), 1076-1080. <https://doi.org/10.1126/science.1164097>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- Wen, J., Elong Ngonu, A., Regla-Nava, J. A., Kim, K., Gorman, M. J., Diamond, M. S., & Shresta, S. (2017). Dengue virus-reactive CD8<sup>+</sup> T cells mediate cross-protection against subsequent Zika virus challenge. *Nature Communications*, *8*(1), 1459. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01669-z>
- Wengler, G., Wengler, G., & Gross, H. J. (1978). Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology*, *89*(2), 423-437. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90185-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90185-X)
- West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M. C., Choi, Y., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, *472*(7344), 476-480. <https://doi.org/10.1038/nature09973>
- Whelan, J. N., Li, Y., Silverman, R. H., & Weiss, S. R. (2019). Zika Virus Production Is Resistant to RNase L Antiviral Activity. *Journal of Virology*, *93*(16), e00313-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00313-19>
- Wichit, S., Hamel, R., Zanzoni, A., Diop, F., Cribier, A., Talignani, L., Diack, A., Ferraris, P., Liegeois, F., Urbach, S., Ekchariyawat, P., Merits, A., Yssel, H., Benkirane, M., & Missé, D. (2019). SAMHD1 Enhances Chikungunya and Zika Virus Replication in Human Skin Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(7), 1695. <https://doi.org/10.3390/ijms20071695>
- Wieland, C. W., Florquin, S., Chan, E. D., Leemans, J. C., Weijer, S., Verbon, A., Fantuzzi, G., & van der Poll, T. (2005). Pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection in leptin-deficient ob/ob mice. *International Immunology*, *17*(11), 1399-1408. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh317>
- Wilkins, C., Woodward, J., Lau, D. T.-Y., Barnes, A., Joyce, M., McFarlane, N., McKeating, J. A., Tyrrell, D. L., & Gale, M. (2013). IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology*, *57*(2), 461-469. <https://doi.org/10.1002/hep.26066>
- Williams, N. L., Morris, J. L., Rush, C., Govan, B. L., & Ketheesan, N. (2011). Impact of streptozotocin-induced diabetes on functional responses of dendritic cells and macrophages towards *Burkholderia pseudomallei*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *61*(2), 218-227. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00767.x>
- Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y., & Rathmell, J. C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood*, *111*(4), 2101-2111. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-096297>
- Woltman, A. M., Van Der Kooij, S. W., Coffey, P. J., Offringa, R., Daha, M. R., & Van Kooten, C. (2003). Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. *Blood*, *101*(4), 1439-1445. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1688>
- World Health Organisation. (2021, juin 9). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/obesity-and-overweight>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2>

- Xie, X., Yang, Y., Muruato, A. E., Zou, J., Shan, C., Nunes, B. T. D., Medeiros, D. B. A., Vasconcelos, P. F. C., Weaver, S. C., Rossi, S. L., & Shi, P.-Y. (2017). Understanding Zika Virus Stability and Developing a Chimeric Vaccine through Functional Analysis. *mBio*, 8(1), e02134-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02134-16>
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1821-1830. <https://doi.org/10.1172/JCI200319451>
- Xu, K., Song, Y., Dai, L., Zhang, Y., Lu, X., Xie, Y., Zhang, H., Cheng, T., Wang, Q., Huang, Q., Bi, Y., Liu, W. J., Liu, W., Li, X., Qin, C., Shi, Y., Yan, J., Zhou, D., & Gao, G. F. (2018). Recombinant Chimpanzee Adenovirus Vaccine AdC7-M/E Protects against Zika Virus Infection and Testis Damage. *Journal of Virology*, 92(6), e01722-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01722-17>
- Xu, L.-G., Wang, Y.-Y., Han, K.-J., Li, L.-Y., Zhai, Z., & Shu, H.-B. (2005). VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN- $\beta$  Signaling. *Molecular Cell*, 19(6), 727-740. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.014>
- Yadav, P. D., Malhotra, B., Sapkal, G., Nyayanit, D. A., Deshpande, G., Gupta, N., Padinjaremathathil, U. T., Sharma, H., Sahay, R. R., Sharma, P., & Mourya, D. T. (2019). Zika virus outbreak in Rajasthan, India in 2018 was caused by a virus endemic to Asia. *Infection, Genetics and Evolution*, 69, 199-202. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.026>
- Yang, C., Ko, B., Hensley, C. T., Jiang, L., Wasti, A. T., Kim, J., Sudderth, J., Calvaruso, M. A., Lumata, L., Mitsche, M., Rutter, J., Merritt, M. E., & DeBerardinis, R. J. (2014). Glutamine Oxidation Maintains the TCA Cycle and Cell Survival during Impaired Mitochondrial Pyruvate Transport. *Molecular Cell*, 56(3), 414-424. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.025>
- Yang, C., Tsaih, S.-W., Lemke, A., Flister, M. J., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). mTORC1 and mTORC2 differentially promote natural killer cell development. *eLife*, 7, e35619. <https://doi.org/10.7554/eLife.35619>
- Yang, C., Zhao, H., Espín, E., & Tebbutt, S. J. (2023). Association of SARS-CoV-2 infection and persistence with long COVID. *The Lancet Respiratory Medicine*, 11(6), 504-506. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(23\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(23)00142-X)
- Yang, D., Chu, H., Lu, G., Shuai, H., Wang, Y., Hou, Y., Zhang, X., Huang, X., Hu, B., Chai, Y., Yuen, T. T.-T., Zhao, X., Lee, A. C.-Y., Ye, Z., Li, C., Chik, K. K.-H., Zhang, A. J., Zhou, J., Yuan, S., & Chan, J. F.-W. (2021). STAT2-dependent restriction of Zika virus by human macrophages but not dendritic cells. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 1024-1037. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1929503>
- Yang, K., Shrestha, S., Zeng, H., Karmaus, P. W. F., Neale, G., Vogel, P., Guertin, D. A., Lamb, R. F., & Chi, H. (2013). T Cell Exit from Quiescence and Differentiation into Th2 Cells Depend on Raptor-mTORC1-Mediated Metabolic Reprogramming. *Immunity*, 39(6), 1043-1056. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.09.015>
- Yasuda, T., Kometani, K., Takahashi, N., Imai, Y., Aiba, Y., & Kurosaki, T. (2011). ERKs Induce Expression of the Transcriptional Repressor Blimp-1 and Subsequent Plasma Cell Differentiation. *Science Signaling*, 4(169). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001592>
- Yau, C., Low, J. Z. H., Gan, E. S., Kwek, S. S., Cui, L., Tan, H. C., Mok, D. Z. L., Chan, C. Y. Y., Sessions, O. M., Watanabe, S., Vasudevan, S. G., Lee, Y. H., Chan, K. R., & Ooi, E. E. (2021). Dysregulated metabolism underpins Zika-virus-infection-associated impairment in fetal development. *Cell Reports*, 37(11), 110118. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110118>
- Yauch, L. E., Prestwood, T. R., May, M. M., Morar, M. M., Zellweger, R. M., Peters, B., Sette, A., & Shrestha, S. (2010). CD4+ T Cells Are Not Required for the Induction of Dengue Virus-Specific CD8+ T Cell or Antibody Responses but Contribute to Protection after Vaccination. *The Journal of Immunology*, 185(9), 5405-5416. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001709>
- Yauch, L. E., Zellweger, R. M., Kotturi, M. F., Qutubuddin, A., Sidney, J., Peters, B., Prestwood, T. R., Sette, A., & Shrestha, S. (2009). A Protective Role for Dengue Virus-Specific CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, 182(8), 4865-4873. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801974>
- Yi, H., Devkota, B. R., Yu, J., Oh, K., Kim, J., & Kim, H.-J. (2014). Effects of global warming on mosquitoes & mosquito-borne diseases and the new strategies for mosquito control : The new strategies for mosquito control. *Entomological Research*, 44(6), 215-235. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12084>
- Youn, S., Li, T., McCune, B. T., Edeling, M. A., Fremont, D. H., Cristea, I. M., & Diamond, M. S. (2012). Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of West Nile Virus. *Journal of Virology*, 86(13), 7360-7371. <https://doi.org/10.1128/JVI.00157-12>
- Zhang, J., Jia, L., Lin, W., Yip, Y. L., Lo, K. W., Lau, V. M. Y., Zhu, D., Tsang, C. M., Zhou, Y., Deng, W., Lung, H. L., Lung, M. L., Cheung, L. M., & Tsao, S. W. (2017). Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane

- Protein 1 Upregulates Glucose Transporter 1 Transcription via the mTORC1/NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *Journal of Virology*, 91(6), e02168-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02168-16>
- Zhang, L., Guerrero-Juarez, C. F., Chen, S. X., Zhang, X., Yin, M., Li, F., Wu, S., Chen, J., Li, M., Liu, Y., Jiang, S. I. B., Hata, T., Plikus, M. V., & Gallo, R. L. (2021). Diet-induced obesity promotes infection by impairment of the innate antimicrobial defense function of dermal adipocyte progenitors. *Science Translational Medicine*, 13(577), eabb5280. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb5280>
- Zhang, S., Zhang, X., Wang, K., Xu, X., Li, M., Zhang, J., Zhang, Y., Hao, J., Sun, X., Chen, Y., Liu, X., Chang, Y., Jin, R., Wu, H., & Ge, Q. (2018). Newly Generated CD4<sup>+</sup> T Cells Acquire Metabolic Quiescence after Thymic Egress. *The Journal of Immunology*, 200(3), 1064-1077. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700721>
- Zhang, W., Wang, G., Xu, Z.-G., Tu, H., Hu, F., Dai, J., Chang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Zeng, H., Cai, Z., Han, F., Xu, C., Jin, G., Sun, L., Pan, B.-S., Lai, S.-W., Hsu, C.-C., Xu, J., ... Lin, H.-K. (2019). Lactate Is a Natural Suppressor of RLR Signaling by Targeting MAVS. *Cell*, 178(1), 176-189.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.003>
- Zhang, X., Guo, J., Wei, X., Niu, C., Jia, M., Li, Q., & Meng, D. (2018). Bach1 : Function, Regulation, and Involvement in Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2018/1347969>
- 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. <https://doi.org/10.3390/v9110338>
- Zhang, X., Zhu, X., Ji, Y., Li, H., Hou, F., Xiao, C., & Yuan, P. (2019). Increased risk of hepatitis B virus infection amongst individuals with diabetes mellitus. *Bioscience Reports*, 39(3), BSR20181715. <https://doi.org/10.1042/BSR20181715>
- Zhang, Y. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO Journal*, 22(11), 2604-2613. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg270>
- Zheng, C., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Liu, K., Shou, P., Qian, F., Wang, Y., & Shi, Y. (2016). Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. *Cell Death & Disease*, 7(3), e2167-e2167. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.54>
- Zheng, X., Zhang, D., Li, Y., Yang, C., Wu, Y., Liang, X., Liang, Y., Pan, X., Hu, L., Sun, Q., Wang, X., Wei, Y., Zhu, J., Qian, W., Yan, Z., Parker, A. G., Gilles, J. R. L., Bourtzis, K., Bouyer, J., ... Xi, Z. (2019). Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature*, 572(7767), 56-61. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1407-9>
- Zhou, P., Tachedjian, M., Wynne, J. W., Boyd, V., Cui, J., Smith, I., Cowled, C., Ng, J. H. J., Mok, L., Michalski, W. P., Mendenhall, I. H., Tachedjian, G., Wang, L.-F., & Baker, M. L. (2016). Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of *IFN- $\alpha$*  in bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(10), 2696-2701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518240113>
- Zhu, J., & Thompson, C. B. (2019). Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(7), 436-450. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0123-5>
- Zhu, T., Webb, L. G., Veloz, J., Wilkins, M., Aguirre, S., & Fernandez-Sesma, A. (2022). Generation and Characterization of Human-Mouse STING Chimeras That Allow DENV Replication in Mouse Cells. *mSphere*, 7(3), e00914-21. <https://doi.org/10.1128/msphere.00914-21>

**LETTRÉ D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT**

Je, soussigné(e) ..... Grégoire Lebeau .....,  
en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le  
plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la  
propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes  
sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la  
rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est  
susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à ..... Saint-Pierre ....., le (date) ... 14 Octobre 2023 ...

Signature :



**Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion**  
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

**Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat**

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tels droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

**La contrefaçon et le faux**

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335\_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

**Le plagiat** est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.