

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
REMERCIEMENTS	XII
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 LE VIRUS ZIKA.....	1
1.1.1 Historique et éclosion.....	1
1.1.2 Transmission	2
1.1.3 Pathologie	3
1.1.4 Le génome viral.....	5
1.1.5 Les protéines virales.....	6
1.1.6 La structure du virion	8
1.1.7 Cycle de réplication	9
1.1.8 Les cellules cibles connues.....	10
1.2 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	11
1.2.1 L'immunité innée.....	12
1.2.2 Monocytes et macrophages.....	13
1.2.3 Fonctions antimicrobiennes du macrophage	16
1.2.4 Interférons et cytokines antivirales	18
1.2.5 Immunité adaptative	21
1.3 LE VIH-1	21
1.3.1 Génome et protéines.....	22
1.3.2 Cycle viral	22
1.3.3 Co-infection	24
2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	25
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
3.1 VIRUS UTILISÉS ET AMPLIFICATION	27
3.1.1 Zika.....	27
3.1.2 VIH-1	28
3.2 ANALYSE DE LA PRODUCTION VIRALE	29
3.3 ISOLEMENT DES CELLULES	30
3.3.1 Cellules NK.....	31
3.3.2 Lymphocytes T CD4 ⁺	31
3.3.3 Monocytes.....	32
3.3.4 Neutrophiles.....	32
3.3.5 Macrophages	33
3.4 INFECTION DES CELLULES	34
3.5 QUANTIFICATION DE L'ARN VIRAL DANS LES CELLULES	35
3.5.1 Extraction d'ARN	35
3.5.2 qRT-PCR.....	36
3.6 TRANSFERT VIRAL ENTRE LES NEUTROPHILES ET LES MDMs.....	37
3.7 MICROSCOPIE À FLUORESCENCE.....	38
3.8 TEST DE VIABILITÉ.....	40
3.9 CYTOMÉTRIE EN FLUX.....	40

3.10 ELISA.....	41
3.11 EFFET DU VIH-1 SUR LE VIRUS ZIKA	43
3.12 EFFET DU VIRUS ZIKA SUR LE VIH-1	43
3.13 ANALYSE STATISTIQUE.....	44
4. RÉSULTATS	45
4.1 SUSCEPTIBILITÉ DES CELLULES AU VIRUS ZIKA	45
4.1.1 <i>Monocytes</i>	45
4.1.2 <i>Lymphocytes T CD4⁺</i>	47
4.1.3 <i>Cellules NK</i>	49
4.1.4 <i>Macrophages</i>	50
4.2 TAUX D'INFECTION DES MDMs PAR LES DIFFÉRENTES SOUCHES DU VIRUS ZIKA	52
4.3 EFFET DE L'INFECTION DES CELLULES SUR LEUR VIABILITÉ	54
4.3.1 <i>Modulation du métabolisme cellulaire suite à une infection par le virus Zika</i>	55
4.3.2 <i>Observation en microscopie de cellules infectées</i>	56
4.4 TRANSFERT VIRAL ENTRE DIFFÉRENTES CELLULES IMMUNITAIRES	57
4.5 IMPACT DE L'AUTOPHAGIE SUR LA RÉPLICATION VIRALE	57
4.6 INTERACTION ENTRE LE VIH-1 ET LE VIRUS ZIKA DANS LES MDMs.....	61
4.6.1 RÔLE DE L'INTERFÉRON DE TYPE I DANS L'INFECTION PAR LE VIRUS ZIKA	63
4.6.2 EFFET DU VIRUS ZIKA SUR LE VIH-1	64
4.6.3 INHIBITION DE LA SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS DE L'INTERFÉRON	66
5. DISCUSSION	72
5.1 CELLULES SUSCEPTIBLES À L'INFECTION	72
5.1.1 <i>Macrophages</i>	73
5.2 IMPLICATON DE L'AUTOPHAGIE SUR L'INFECTION	75
5.3 EFFET DU VIRUS ZIKA SUR LE VIH-1	76
5.4 EFFET DU VIH-1 SUR LE VIRUS ZIKA	77
5.5 RÔLE DE L'INTERFÉRON DANS L'INFECTION	78
6. CONCLUSION.....	80
BIBLIOGRAPHIE.....	81

Liste des tableaux

Tableau 1 : Souches de virus Zika utilisées.....	28
Tableau 2 : Information sur les amorces utilisées dans les expériences de RT-qPCR	37

Liste des figures

Figure 1 : Épidémiologie du virus Zika au Brésil	2
Figure 2 : Conformation secondaire des extrémités non codantes de l'ARN viral	6
Figure 3 : Génome et protéines du virus Zika	7
Figure 4 : Représentation du virus Zika basée sur la cryomicroscopie électronique	8
Figure 5 : Le cycle de réPLICATION du virus Zika.....	10
Figure 6 : Représentation de la réponse immunitaire suite à une infection microbienne....	12
Figure 7 : Spectre de la polarisation des macrophages.....	15
Figure 8 : Processus de formation des vésicules de l'autophagie.....	17
Figure 9 : Récepteur et sentier de signalisation de l'IFN	20
Figure 10 : Organisation du génome viral du VIH-1.....	22
Figure 11 : Schéma du cycle viral du VIH-1	23
Figure 12 : Schéma de la particule virale du VIH-1.....	24
Figure 13 : Exemple d'une plaque de titration	30
Figure 14 : Représentation schématique des étapes d'un ELISA p24.....	43
Figure 15 : Expression relative d'ARN du virus Zika dans les monocytes.....	46
Figure 16 : Expression relative d'ARN du virus Zika dans les lymphocytes.....	47
Figure 17 : Concentration en particules virales dans le surnageant des lymphocytes T CD4+ activés et non activés	48
Figure 18 : Concentration de particules virales dans le milieu des cellules NK	49
Figure 19 : Expression relative d'ARN viral dans les MDMs en fonction de la MOI.....	50
Figure 20 : Concentration en particules virales dans le surnageant des MDMs.....	51
Figure 21 : Concentration en particules virales de la souche HS-2015-BA-01 dans les MDMs.....	52
Figure 22 : Taux d'infection des MDMs par le virus Zika PL CAL	53
Figure 23 : Taux d'infection des MDMs par différentes souches de virus Zika	54
Figure 24 : Activité métabolique des MDMs selon la souche de virus Zika.....	55
Figure 25 : Microphotographie de MDMs infectés par le virus Zika.....	56
Figure 26 : Représentation schématique du cycle de l'autophagie	58
Figure 27 : Mécanisme d'action de la molécule SPAUTIN-1.....	59
Figure 28 : Effet d'une augmentation de l'autophagie sur la réPLICATION du virus Zika dans les MDMs	59
Figure 29 : Effet d'une inhibition de l'autophagie sur la réPLICATION du virus Zika dans les MDMs.....	60
Figure 30 : RéPLICATION du virus Zika en présence d'une infection par le VIH-1 dans les MDMs.....	62
Figure 31 : Production virale dans les MDMs lors d'une co-infection en présence ou absence de B18R	63
Figure 32 : Taux d'infection des MDMs par le VIH-1 lors de co-infection.	65
Figure 33 : Taux de réPLICATION du VIH-1 lors de co-infection	66
Figure 34 : Taux d'infection des MDMs en présence de différentes concentrations de ruxolitinib	67
Figure 35 : Production virale dans les MDMs traités avec un anticorps ciblant les interférons $\lambda 1$ et $\lambda 3$	68
Figure 36 : Taux d'infection dans les MDMs traités avec un anticorps ciblant les interférons	

λ_1 et λ_3	69
Figure 37 : Production virale de la souche HS-2015-BA-01 dans les MDMs en présence de différentes concentrations de ruxolitinib.....	70
Figure 38 : Mutations de la souche HS-2015-BA-01 par rapport à la souche PLCAL.....	75

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
BSA	Albumine de sérum bovin
DC-SIGN	De l'anglais: « Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin »
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTPs	Mélange de quatre désoxyribonucléotides triphosphate
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
FBS	Sérum de veau foetal
GM-CSF	De l'anglais : « Granulocyte macrophage colony stimulating factor »
GFP	De l'anglais: « Green Fluorescent Protein »
HBSS	De l'anglais : « Hank's Balanced Salt Solution »
IFN	Interféron
IFNAR	Récepteur de l'interféron α/β
IFNGR	Récepteur de l'interféron γ
IFN- α	Interféron alpha
IFN- β	Interféron bêta
IFN- γ	Interféron gamma
IFN- λ	Interféron lambda
IL-1R	Récepteur de l'interleukine 1
IL-4	Interleukine 4
IL-10	Interleukine 10
IL-13	Interleukine 13
JAK	Janus Kinase
M-CSF	De l'anglais : « macrophage colony-stimulating factor »
MEM	De l'anglais: « Eagle's Minimum Essential Medium »
MERTK	De l'anglais : « myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase »
MOI	Multiplicité d'infection

NK	De l'anglais : « Natural Killer »
P-S	Pénicilline-streptomycine
PBS	De l'anglais : « Phosphate-Buffered Saline »
PBST	Solution de PBS contenant 0,05% de Tween-20
PHA	Phytohémagglutinine
qPCR	Réaction de polymérase en chaîne quantitative
PES	De l'anglais : « Polyethersulfone »
PRR	De l'anglais : « Pattern Recognition Receptor »
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TIM-1	De l'anglais: « T-cell immunoglobulin mucin domain 1 »
TLR	De l'anglais : « Toll-Like Receptor »
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TYK	Tyrosine Kinase
SIDA	Syndrôme de l'immunodéficience acquise
sfRNA	ARN sous-génomique flaviviral
UFP	Unité formatrice de plaque
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
% (m/v)	Pourcentage masse/volume
% (v/v)	Pourcentage volume/volume

Remerciements

En premier lieu, je me dois de remercier mon directeur de recherche, monsieur Michel J. Tremblay, pour son soutien indéfectible tout au long de ma maîtrise, de même que pour ses conseils, son encadrement et la confiance qu'il m'a témoigné.

Je tiens également à remercier madame Corinne Barat qui m'a fourni de nombreux conseils, de l'encadrement et de l'orientation pendant les deux années de ce projet.

J'aimerais également remercier monsieur Michel Ouellet pour son aide et ses conseils prodigués tout au long de ma maîtrise.

Finalement, je tiens à remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenu tout au long de mon cheminement.

Je vous exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance pour l'aide et le soutien que vous m'avez fourni.

1. Introduction

1.1 Le virus Zika

1.1.1 Historique et éclosion

En avril 1947, le virus Zika a été isolé de la forêt éponyme, en Ouganda. Des macaques rhésus qui étaient utilisés comme sentinelle pour détecter des foyers du virus de la fièvre jaune dans les forêts africaines ont été infectés par un virus inconnu à l'époque. Ce virus a été isolé et nommé Zika, soit le nom de la forêt dans laquelle les travaux de recherche avaient lieu. Un second isolement indépendant de ce virus a eu lieu 9 années plus tard dans la même forêt, mais cette fois chez un insecte. Chez le singe, aucun symptôme de l'infection n'a été remarqué à l'exception d'une faible élévation de la température corporelle¹. Des études subséquentes ont démontré que le virus isolé peut infecter des souris âgées de moins de deux semaines suite à une inoculation intracrânienne. Chez le singe, une virémie a été observée de 4 à 5 jours suivant l'inoculation et une production d'anticorps neutralisant a été détectée à partir de 2 à 3 semaines après l'infection².

Les premiers documents traitant de l'infection des humains par le virus Zika proviennent de l'Ouganda et de la Tanzanie en 1952^{3,4}. Lors de la même année, la présence du virus en Inde a été confirmée⁵. Durant les années 1950, la présence d'anticorps neutralisants contre le virus Zika a été confirmée chez des individus en Égypte, en Malaisie, au Mozambique, au Niger, et aux Philippines. De 1960 à 1999, le virus a été détecté dans les insectes et les macaques rhésus utilisés comme sentinelle pour des recherches scientifiques dans certains pays de l'Afrique équatoriale. Peu de cas ont été rapportés chez l'humain et la maladie qui découle de l'infection par le virus Zika a longtemps été considérée comme bénigne. La distribution du virus s'est étendue jusqu'en Asie et à l'Afrique de l'Ouest⁶. En 2007, pour la première fois, le virus s'est propagé de l'Asie jusqu'aux îles Yap en Micronésie, ce qui a occasionné la première grande éclosion chez l'humain avec un taux d'infection de 73% de la population. Aucun décès ou hospitalisation n'a été rapporté en lien avec cette éclosion⁷. De 2010 à 2015, quelques cas sporadiques ont été rapportés dans plusieurs pays d'Asie du Sud-Est et en 2015, une éclosion majeure se déclare au Brésil et se propage dans divers

pays d'Amérique du Sud⁶.

L'élosion de virus Zika au Brésil a atteint son paroxysme en 2016 et a diminué pour atteindre un faible niveau de nouveaux cas. Le taux de nouvelles infections demeure faible, mais constant jusqu'à juin 2017 (voir figure 1)⁸. Ce même effet est observé dans plusieurs autres pays de l'Amérique du Sud. Aucun nouveau territoire n'a été infecté depuis la semaine 44 de 2016. Lors de cette élosion, 48 pays et territoires ont rapporté des cas de transmission par des moustiques locaux⁹.

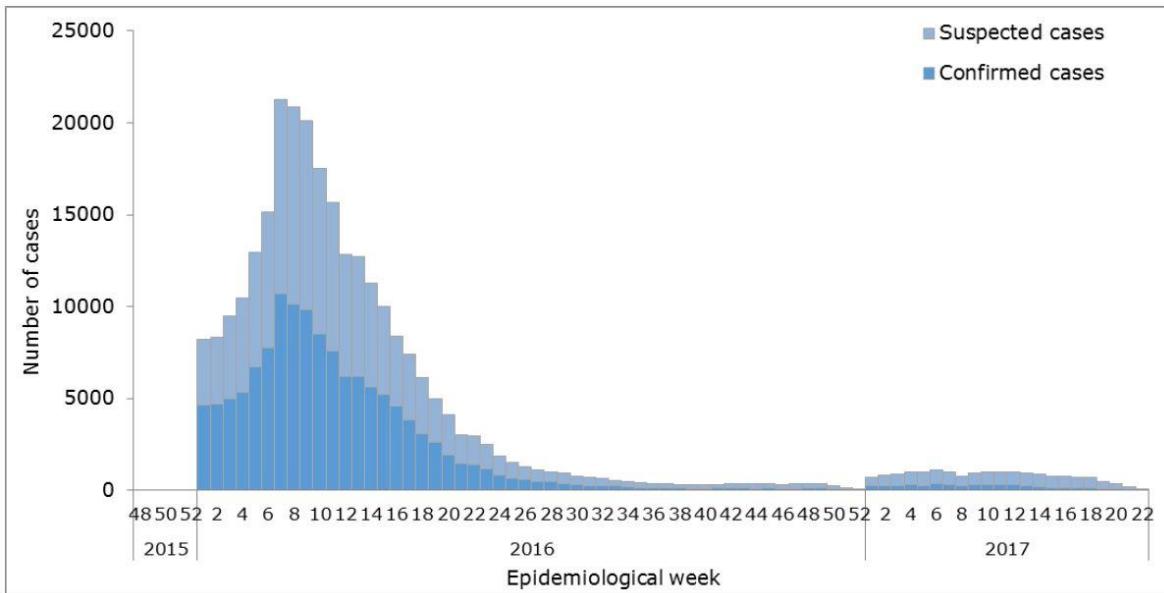


Figure 1 : Épidémiologie du virus Zika au Brésil

Représentation des cas cliniques suspectés et confirmés en laboratoire d'infection par le virus Zika au Brésil. Figure tirée de : *Pan American Health Organization*⁸

1.1.2 Transmission

Le premier mode de transmission suspecté du virus Zika a été la transmission par vecteur. Il s'agit plus précisément des insectes de l'espèce *Aedes Africanus*, dans lequel une souche de virus Zika a été isolée en 1948¹. Des travaux de recherches ultérieurs sur la transmission de virus par les moustiques dans une forêt en Ouganda ont été effectués en 1962 et démontrent que les insectes *Aedes Africanus* peuvent bel et bien servir de vecteur de transmission au virus Zika¹⁰. Des études subséquentes ont démontré que plusieurs espèces du genre *Aedes* peuvent être infectées par le virus Zika et pourraient agir comme vecteur¹¹⁻¹³. Dans l'épidémie qui a touché le Brésil, les insectes *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* sont les

deux principaux vecteurs de cette éclosion¹⁴.

Des cas de transmission sexuelle du virus ont été rapportés récemment. Plusieurs observations démontrent une transmission possible du virus de l'homme vers la femme lors de relations sexuelles vaginales non protégées¹⁵⁻¹⁷. Des études ont démontré la présence de particules virales infectieuses dans le sperme de patients, confirmant ainsi la possibilité de transmission virale lors des relations sexuelles¹⁸. De plus, il a été démontré chez l'humain qu'il pouvait y avoir une production virale soutenue dans le temps dans les sécrétions vaginales¹⁹. Un cas a été rapporté impliquant une femme infectée qui aurait transmis le virus à son partenaire masculin lors d'une relation sexuelle non protégée, démontrant ainsi la possibilité de transmission par les sécrétions vaginales²⁰. Le virus pourrait également se transmettre lors de relations sexuelles anales²¹.

La transmission par voie périnatale du virus est possible. Cette transmission peut avoir lieu lors de la grossesse et lors de l'accouchement²². Des particules virales infectieuses ont également été retrouvées dans le lait maternel, ce qui permettrait une transmission de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement²³.

La transmission du virus peut se faire par le sang et par les sécrétions. Des particules virales infectieuses du virus Zika ont été retrouvées dans des dons de sang²⁴. Il existe également un risque de transmission par la salive et l'urine de patients infectés²⁵.

1.1.3 Pathologie

Une infection par le virus Zika occasionne des symptômes variés d'un patient à l'autre. Chez l'adulte, environ 80% des personnes atteintes seront asymptomatiques⁷. La période d'incubation moyenne du virus est de 5,9 jours et l'apparition d'anticorps dans le sang a lieu 9,1 jours suivant l'infection²⁶. Les personnes présentant des symptômes ont, dans la majorité des cas, une fièvre, une éruption cutanée, des douleurs articulaires, une conjonctivite, des démangeaisons, des douleurs musculaires et des céphalées. La maladie se résout d'elle-même, après quatre à sept jours suite à l'apparition des symptômes et n'est pas assez sévère pour occasionner une hospitalisation²⁷.

Dans de rares cas, un syndrome de Guillain-Barré peut se développer suite à l'infection par le virus Zika²⁸. Ce syndrome d'origine auto-immunitaire survient suite à l'atteinte des axones et des filaments de myéline des neurones par des anticorps. Il n'y aurait pas ou peu d'implication cellulaire directe dans ce syndrome²⁹. Le syndrome de Guillain-Barré se caractérise par une faiblesse musculaire généralisée et dégénérative qui va atteindre son plus fort degré autour de 4 semaines après le début des symptômes. L'atteinte des nerfs commence généralement par les jambes et va occasionner une perte des réflexes. En conséquence, le patient aura une incapacité de marcher et avec le développement du syndrome, il pourrait développer une paralysie faciale^{30,31}. Une corrélation a été établie entre l'éclosion de virus Zika dans un territoire et une augmentation du taux de syndrome de Guillain-Barré dans la population³². De plus, une étude a confirmé que le virus Zika peut provoquer le développement d'un syndrome de Guillain-Barré environ 6 jours suivant le début des symptômes de l'infection virale³³. Il peut y avoir d'autres complications d'ordre neurologique suite à une infection par le virus Zika, comme une myélite aigüe³⁴. Une autre complication possible, observée chez un homme d'âge avancé, est la méningoencéphalite causée par le virus Zika³⁵.

Chez le fœtus, l'infection par le virus Zika peut occasionner diverses manifestations au niveau du système nerveux et des yeux. Plus généralement, un retard de croissance intra-utérin est fréquent lors de l'infection du fœtus par le virus Zika. Un lien a été établi entre l'augmentation du taux de microcéphalie et l'éclosion de virus Zika dans un nouveau territoire infecté. La microcéphalie est un grave syndrome relié à l'infection du fœtus par le virus Zika³⁶. Elle se caractérise par un enfant ayant une tête qui a une circonférence inférieure de 3 écarts-types à la moyenne³⁷. Il est estimé qu'environ 1% des fœtus infectés lors du premier trimestre vont être atteint de microcéphalie³⁸. Chez les enfants infectés par le virus Zika qui sont nés avec une microcéphalie, des troubles moteurs, des anomalies au niveau de la vision et de l'audition, des convulsions et des troubles du sommeil sont fréquemment observés. Des retards de développement cognitif importants ont également été rapportés chez ces enfants, ce qui requiert un soutien et un suivi médical important³⁹.

Une atrophie et la calcification cérébrale de même qu'une asymétrie entre les ventricules du

cerveau ont également été observées chez certains fœtus infectés présentant des signes de microcéphalie qui souffraient en plus de cataractes ou de calcification oculaire. Les articulations ne sont pas épargnées par le virus chez les fœtus. Des cas d'arthrogrypose sévères ont été observés suite à une infection par le virus Zika⁴⁰. Les atteintes oculaires chez les enfants souffrant de microcéphalie seraient plus prononcées lorsque l'infection a lieu au premier ou second trimestre de la grossesse. Des anomalies touchant le nerf optique et une atrophie de la choroïde et de la rétine ont été rapportées chez ces enfants⁴¹. Tragiquement, l'infection du fœtus par le virus peut mener à un retard de croissance et même à la mort *in utero*⁴².

1.1.4 Le génome viral

Le virus Zika est classé taxonomiquement dans le genre des *Flavivirus*, dans la famille des *Flaviviridae*. Son génome est composé d'ARN simple brin de polarité positive d'une taille de 10794 nucléotides, mais qui varie un peu selon la souche virale. Il a été séquencé au complet pour la première fois en 2007. Le génome viral possède une région non codante en 3' de 104 nucléotides et une région non codante en 5' de 428 nucléotides⁴³. De légères variations du nombre de nucléotides du génome viral sont observées selon les échantillons viraux étudiés. La teneur en G-C du génome varie légèrement selon la souche et est d'environ 51%. L'extrémité 5' de l'ARN génomique possède une coiffe et l'extrémité 3' du génome ne possède pas de queue poly(A).

La région non codante en 5' forme une structure en tige et boucle, alors que la région non codante en 3' forme plusieurs structures en tige et boucle (voir figure 2)⁴⁴. La région non codante en 3' est résistante à la dégradation par l'exoribonucléase XRN1 de l'hôte humain. Cette résistance à la dégradation va mener à la formation d'un ARN sous-génomique flaviviral (sfRNA). Des sfRNA de tailles différentes peuvent être formés selon le site de blocage de l'enzyme⁴⁵. Le sfRNA est impliqué dans la pathogenèse en inhibant la réponse interféron de la cellule hôte⁴⁶. D'autres effets des sfRNA incluent une augmentation des effets cytopathiques du virus sur les cellules infectées, notamment par une modulation de la signalisation des sentiers menant à l'apoptose. Les sfRNA ont également un effet inhibiteur sur la dégradation des ARNm viraux lors de l'infection. Comme les sfRNA perturbent la

fonction de l'exoribonucléase XRN1, cette dernière n'effectue plus son rôle correctement dans la cellule, ce qui mène à une augmentation de la concentration d'ARNm avec une absence de coiffe⁴⁷.

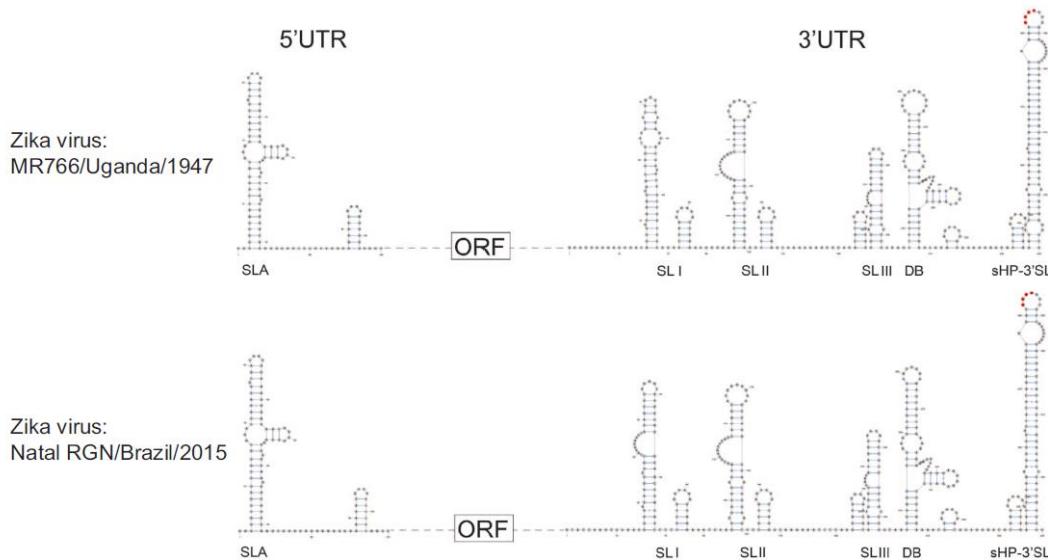


Figure 2 : Conformation secondaire des extrémités non codantes de l'ARN viral

Structures secondaires de l'ARN de deux souches du virus Zika. Une séquence conservée dans la conformation secondaire en 3' est identifiée en rouge. ORF : Cadre de lecture, SLA : Structure en tige et boucle à trois branches, SL : Structure en tige et boucle, DB : Structure en hantère, sHP-3'SL : petite structure en épingle à cheveux et structure en tige et boucle en 3'. Figure adaptée de Zhu, Z. et al., 2016⁴⁴.

1.1.5 Les protéines virales

Le génome viral code pour une polyprotéine de 3419 acides aminés. Cette polyprotéine est par la suite clivée par une protéase virale ainsi que par des protéases de l'hôte pour former les protéines virales sous leur forme individuelle et active⁴³. Les protéines formées suite au clivage incluent trois protéines de structure et sept protéines non structurelles. Les trois protéines de structure sont la protéine de la capsid (C), la protéine précurseur de la membrane (prM) et la protéine de l'enveloppe (E). Les sept autres protéines non structurelles sont : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 (voir figure 3)⁴⁴. Peu d'informations sont connues des protéines non structurelles du virus Zika, mais il est possible d'avoir une idée du rôle des différentes protéines en se basant sur les autres membres des *Flavivirus*. La protéine NS1 jouerait un rôle dans la réPLICATION virale et la

virulence au début de l'infection. La protéine NS4B est responsable de l'ancrage du complexe de réPLICATION du virus Zika en plus d'avoir un effet antagoniste sur l'interféron^{48,49}. La protéine NS3 possède plusieurs domaines catalyseur, dont un domaine protéolytique lors de l'association avec NS2B qui agit comme cofacteur. La protéine NS3 possède également un domaine hélicase nécessaire lors de la réPLICATION de l'ARN viral. Une autre protéine non structurelle d'intérêt est la protéine NS5. Cette protéine possède deux domaines importants. Le premier est un domaine méthyltransférase qui permet d'ajouter la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN viral. Le second domaine a une fonction d'ARN polymérase dépendante de l'ARN⁵⁰. Ces protéines non structurelles sont nécessaires pour la réPLICATION du génome viral, le détournement des mécanismes de défense de la cellule hôte ainsi que l'assemblage de particules virales matures⁵¹.

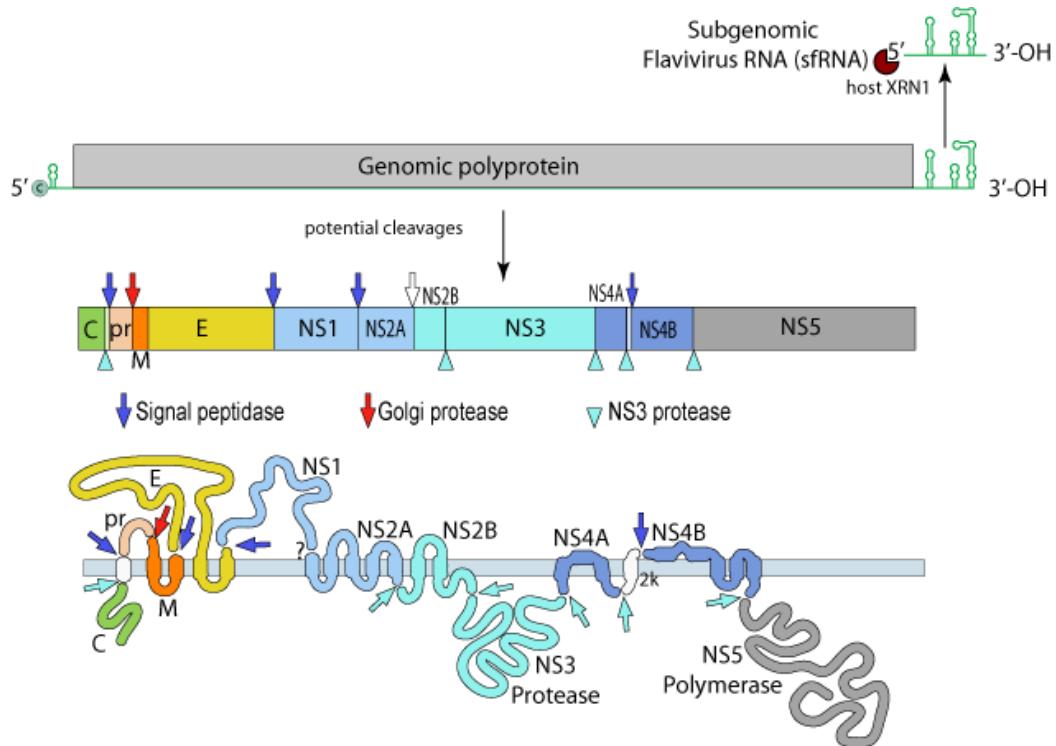


Figure 3 : Génome et protéines du virus Zika

Représentation schématique du génome viral, de la polyprotéine et ses sites de clivage. La polyprotéine peut être clivée par des protéines de l'hôte (« Signal peptidase » et « Golgi protease ») ou par la protéine virale NS3. La représentation de la traduction des protéines dans la membrane du réticulum endoplasmique est montrée au bas de la figure avec les sites de clivage. Figure issue de ViralZone-ExPASy⁵².

1.1.6 La structure du virion

Le virion mature est de forme sphérique, enveloppé et possède un diamètre d'environ 40nm (voir figure 4)⁵³. La capsidé est formée des protéines C, PrM / M et E. Du centre du virus vers l'extérieur, on retrouve le matériel génétique et la capsidé, la membrane virale qui dérive de la membrane du réticulum endoplasmique de l'hôte liée aux protéines prM et E qui sont exposés à la surface du virus. Les protéines prM et E sont assemblés en hétérodimères. Trois de ces hétérodimères vont s'assembler pour former les structures qui se projettent vers l'extérieur du virus lui conférant son aspect épineux. Le domaine pr de la protéine prM est ainsi exposé au sommet de cette structure et protège la boucle de fusion de la protéine E. Dans la forme mature du virus, la protéine PrM est clivée pour relâcher le segment Pr de la protéine et ainsi laisser en place la protéine M mature.

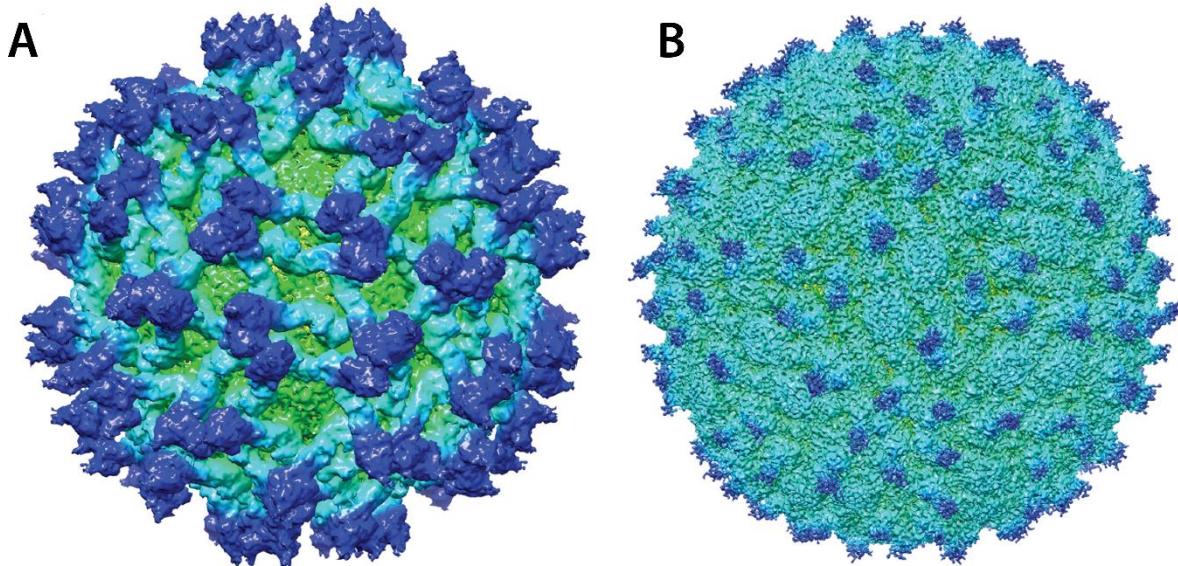


Figure 4 : Représentation du virus Zika basée sur la cryomicroscopie électronique

L'image (A) représente la particule virale immature et l'image (B) représente la particule virale mature. La présence du segment Pr lié à la protéine M occasionne la formation de spicules sur la particule virale. L'élimination de ces segments lors de la maturation du virus permet au virus d'obtenir une conformation plus sphérique. L'échelle de couleur représente la distance du centre de la particule virale en jaune vers l'extérieur en bleu foncé. Figure adaptée de Prasad, V. M. *et al.*⁵⁴

1.1.7 Cycle de réPLICATION

Le cycle de réPLICATION du virus Zika est similaire à celui des autres membres du genre des *Flavivirus*. Le virus va d'abord se lier à un récepteur cellulaire. Les récepteurs potentiels du virus incluraient, mais sans s'y limiter, la famille de récepteurs TAM (Tyro3, AXL, MERTK), DC-SIGN ainsi que TIM-1^{51,53}.

Suite à l'adhésion, le virus va entrer dans la cellule par endocytose médiée par un récepteur afin de rejoindre un endosome. La vésicule ainsi formée va s'acidifier, menant à un changement de conformation de la protéine E du virus. Ce changement de conformation va induire la fusion du virus avec l'endosome et libérer le matériel génétique viral dans le cytoplasme de la cellule.

La traduction de l'ARN(+) viral en protéine s'effectue par les ribosomes de l'hôte. La polyprotéine est ensuite clivée par des protéases de l'hôte et par la protéase virale. Suite à la traduction des protéines virales, un site de réPLICATION virale est formé dans le réticulum endoplasmique.

La réPLICATION du matériel génétique viral a lieu dans des invaginations du réticulum endoplasmique. L'ARN(+) viral y est répliqué en ARN(-). Les copies d'ARN(-) servent de matrice pour répliquer le génome viral et l'ARN(+) sert de matrice pour produire des protéines et sera éventuellement assemblé dans un virion.

Lors de la réPLICATION qui s'effectue près du réticulum endoplasmique, la protéine de capsid se lie à l'ARN(+) viral près d'un site contenant des dimères des protéines prM-E. Il y aura par la suite un bourgeonnement à l'intérieur du réticulum endoplasmique, ce qui formera un virion immature à l'apparence épineuse. Lors de son passage dans l'environnement acide du Golgi, un réarrangement des protéines va exposer le site de clivage du domaine pr qui sera ciblé par une furine de l'hôte. Le segment Pr va rester lié à la particule virale jusqu'à ce qu'elle se retrouve dans un environnement à pH neutre⁵⁵. Il a été observé qu'il reste des domaines Pr non-clivés à la particule virale suite au relargage du virus à l'extérieur de la cellule, car le processus de clivage n'est pas entièrement efficace.

Le rôle biologique de ces particules virales intermédiaires pour le virus Zika et les autres *Flavivirus* reste à être élucidé⁵⁴. Il pourrait également y avoir des interactions non élucidées entre la protéine de la capsid et la membrane virale. Le processus de maturation des *Flavivirus* n'est pas entièrement bien compris et d'autres travaux sont en cours pour élucider ces aspects⁵⁵. Finalement, la dernière étape est la libération du virus de la cellule par exocytose⁵¹.

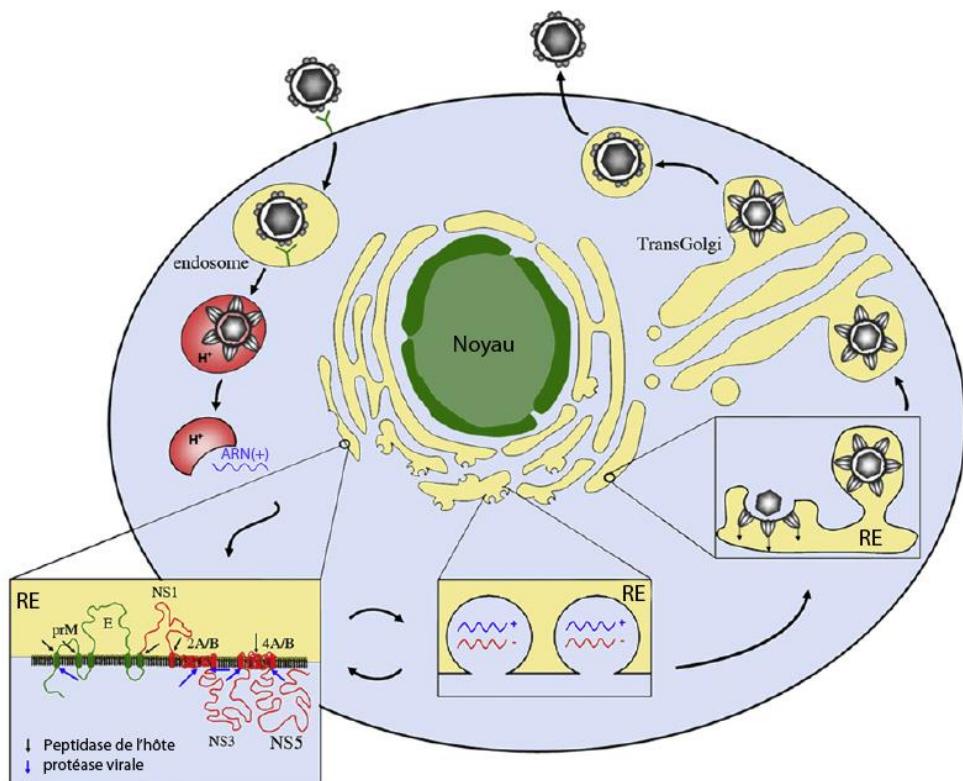


Figure 5 : Le cycle de réPLICATION du virus Zika

Représentation du cycle de réPLICATION du virus Zika dans une cellule hôte. RE : Réticulum endoplasmique, 2A/B : NS2A et NS2B, 4A/B : NS4A et NS4B. Figure adaptée de Fernandez-Garcia, M.-D., Mazzon, M., 2009⁵¹.

1.1.8 Les cellules cibles connues

Les cellules de la peau comme les fibroblastes ou les kératinocytes peuvent être infectés par le virus Zika suite à une piqûre d'insecte. Les cellules dendritiques qui forment une ligne de défense immunitaire importante de la peau sont également des hôtes susceptibles du virus

Zika⁵³. Le virus Zika a également un tropisme envers les cellules du système nerveux. Des études ont démontré que les cellules souches neuronales peuvent être infectées et devenir apoptotiques à la suite d'une infection. Ces cellules souches neuronales peuvent se différencier en neurones et demeurer infectées. Il est également connu que les cellules souches embryonnaires sont susceptibles à l'infection par le virus Zika^{56,57}. Au niveau du placenta, les cytotrophoblastes, les cellules épithéliales amniotiques et les cellules progénitrices du trophoblaste peuvent être infectées productivement par le virus Zika⁵⁸. Des études ont démontré que les cellules formant la rétine et la choroïde des yeux sont susceptibles à l'infection par le virus⁵⁹. D'autres études chez les macaques ont permis de détecter des cellules infectées dans divers tissus, comme le système digestif, le système uro-génital et le système cardio-respiratoire. Cette détection du virus dans divers organes met en évidence le tropisme étendu du virus Zika⁶⁰.

Comme le virus peut infecter les cellules du fœtus et du placenta, il peut y avoir des conséquences occasionnées par une infection sur le développement du fœtus. L'infection par le virus Zika peut altérer la production de cytokines chez certaines cellules dérivées de cellules souches embryonnaires. Cette modulation de la production de cytokines peut affecter le développement du fœtus et plus particulièrement la neurogenèse. Ce mécanisme paracrine pourrait participer au développement de la microcéphalie chez les fœtus infectés⁶¹.

1.2 Le système immunitaire

Afin de mettre l'infection virale dans un contexte plus complet, un court survol du système immunitaire humain s'impose. Le système immunitaire joue un rôle primordial pour préserver la santé des individus. Entre autres, il protège le corps contre les infections microbiennes et détruit les tumeurs. Le système immunitaire peut être divisé en deux composantes, l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces deux composantes sont complémentaires et essentielles pour défendre correctement l'organisme contre les pathogènes⁶².

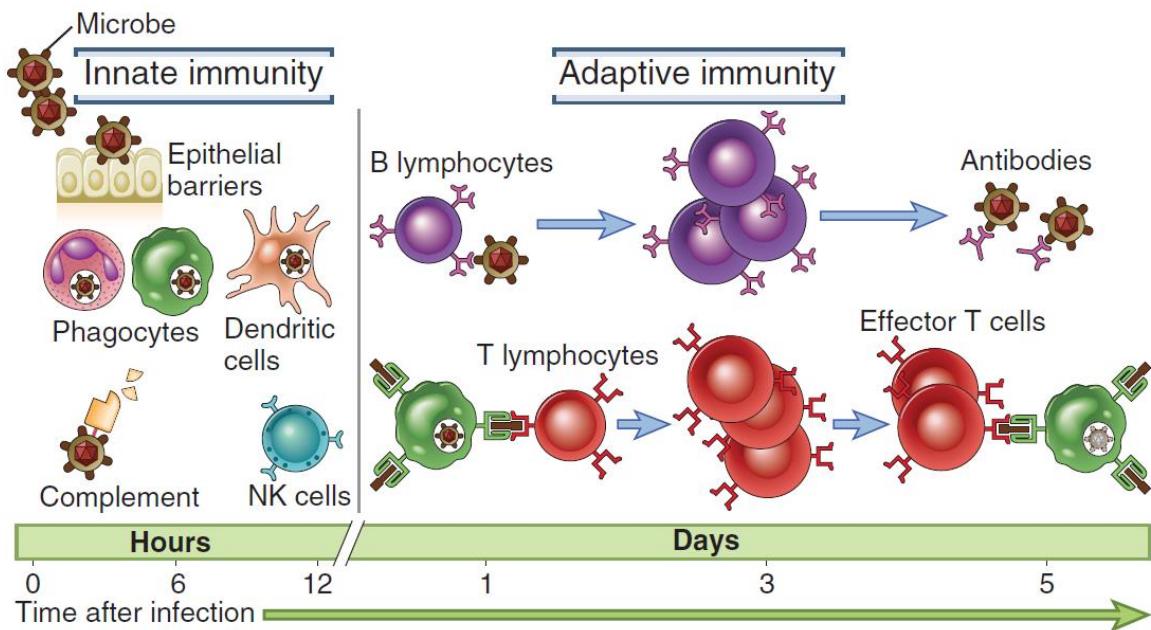


Figure 6 : Représentation de la réponse immunitaire suite à une infection microbienne.

Les cellules de l'immunité innée vont réagir rapidement à une invasion microbienne. Dans le cas d'une persistance de l'invasion, l'immunité adaptative va s'enclencher sur une période de quelques jours pour produire une réponse plus compétente et éliminer le microbe envahisseur. Figure issue de Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S., 2014⁶².

1.2.1 L'immunité innée

L'immunité innée est la composante du système immunitaire qui est toujours présente chez les individus sains. Cette composante est prête à répondre rapidement à une agression. L'immunité innée se compose à la fois de facteurs cellulaires et de facteurs solubles. Les facteurs cellulaires incluent les cellules phagocytaires, comme les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. On y retrouve également les cellules NK, les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles. Ces cellules sont les premières à réagir à une infection et vont se coordonner avec l'immunité adaptative pour optimiser la réponse immunitaire globale. Dans les facteurs solubles de l'immunité innée, on retrouve toutes les protéines du complément qui vont faire la lyse des microorganismes ou qui facilitent l'élimination des pathogènes ayant envahi l'organisme par des cellules phagocytaires⁶².

Afin de détecter les pathogènes qui envahissent l'organisme, le système immunitaire utilise des récepteurs pour identifier la présence de molécules conservées chez les microorganismes. L'ensemble de ces récepteurs est regroupé sous le nom de récepteurs de reconnaissance de motifs ou *Pattern Recognition Receptor* (PRR). Un sous-groupe de ces récepteurs est les *Toll-Like Receptor* (TLR). Ces TLRs peuvent reconnaître plusieurs composants de bactéries, de mycètes, de protozoaires et de virus. Plus précisément, les TLRs peuvent reconnaître certaines protéines de l'enveloppe virale, l'acide ribonucléique double brin, certains motifs de phosphorylation de l'ADN simple brin et des ARNs simple brin riches en guanosine ou en uridine. Comme plusieurs de ces récepteurs peuvent reconnaître des molécules similaires à celles de l'hôte, la localisation des TLRs est importante pour éviter une réaction auto-immunitaire. C'est pourquoi plusieurs des TLRs reconnaissant des molécules d'origine virale se retrouvent dans des endosomes. Ainsi, ils peuvent détecter les molécules d'origine virale sans réagir avec les molécules similaires de l'hôte⁶³.

1.2.2 Monocytes et macrophages

Les monocytes peuvent circuler dans le sang et se déplacer dans les tissus. Lorsque les monocytes pénètrent dans les tissus suite à la détection de signaux signalant la présence d'un danger, ils se différencient en cellules dendritiques ou en macrophages. Le macrophage est capable de survivre pendant plusieurs semaines dans son nouvel environnement⁶⁴. Le macrophage n'est pas une cellule différente du monocyte, mais est plutôt à un stade différent de différenciation de la même lignée cellulaire. Les macrophages se retrouvent dans plusieurs tissus sains du corps humain sous forme de macrophage résidents⁶². On en retrouve dans le cerveau sous forme de microglie, dans la peau, dans le tissu cardiaque et dans d'autres tissus du corps⁶⁴. Les macrophages tissulaires ont des origines variées. Ils peuvent provenir du sac vitellin, du foie fœtal ou de la moelle osseuse. Les macrophages d'origine fœtale ont souvent des capacités prolifératives qui leur permettent de conserver une présence dans les tissus durant toute la vie de l'hôte⁶⁴⁻⁶⁶.

Les macrophages jouent plusieurs rôles dans la défense de l'hôte contre les infections microbien-nes. Ils peuvent notamment produire des cytokines pour initier ou réguler l'inflammation, ils phagocytent les pathogènes, ils nettoient les tissus des débris de cellules mortes et ils peuvent aussi initier le processus de réparation tissulaire. Tout dépendants des signaux de l'environnement dans lequel les macrophages se retrouvent, ils peuvent se polariser et exprimer des phénotypes différents. Il faut cependant faire preuve de prudence avec ces phénotypes de polarisation, car il ne s'agit pas d'une polarisation précise, mais plutôt d'un spectre sur lequel les cellules vont évoluer en fonction des signaux de leur environnement (voir figure 7)⁶⁷.

Le premier phénotype est obtenu *in vitro* par la différenciation de monocytes en macrophages avec seulement la présence de M-CSF et en l'absence de cytokines de différenciation. Il est nommé phénotype M0⁶⁸.

Le second phénotype est la polarisation de type M1. Cette polarisation a lieu lorsque le macrophage est exposé à des signaux provenant de récepteurs de l'immunité innée, comme les TLRs et par des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IFN- γ . L'exposition au « Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor » (GM-CSF), qui est un facteur de croissance du macrophage, favorise la polarisation de type M1⁶⁹. Ce phénotype est principalement impliqué dans l'initiation ou l'exacerbation de l'inflammation et dans l'élimination des pathogènes lors d'une infection. Les macrophages de type M1 produiraient du TNF et d'autres molécules pro-inflammatoires qui sont relâchées dans l'environnement du macrophage⁷⁰. Le métabolisme des macrophages est modifié lors de la présence de signaux d'activation. La cellule diminue son taux de phosphorylation oxydative pour privilégier la glycolyse. La glycolyse est un moyen moins efficace, mais plus rapide pour la cellule de produire de l'énergie⁷¹.

Les macrophages qui ne sont pas exposés à des signaux forts provenant de récepteurs de l'immunité innée et qui sont exposés à des signaux anti-inflammatoires vont adopter une polarisation de type M2. Ces macrophages sont importants dans le contrôle de l'inflammation et dans la réparation tissulaire⁶². Divers signaux et molécules peuvent

pousser les macrophages vers une polarisation de type M2, notamment des acides gras non estérifiés. Ces macrophages vont sécréter des molécules anti-inflammatoires dans le milieu environnant. Ces molécules vont inhiber l'activité des cellules qui produisent des molécules pro-inflammatoires⁷⁰. L'exposition au M-CSF qui est un facteur de croissance du macrophage favorise la polarisation de type M2⁶⁹. Il existe des sous-groupes de catégorisation des macrophages de type M2. Principalement on y retrouve les types M2a, M2b et M2c. La polarisation de type M2a est induite par une exposition aux cytokines interleukines-4 (IL-4) et IL-13. Le phénotype des macrophages M2a augmente la capacité à encapsuler et détruire des parasites. Le phénotype M2b est obtenu en stimulant les macrophages avec des complexes immunitaires et un ligand du TLR ou un ligand du récepteur IL-1R. Les macrophages ayant ce type de polarisation sont impliqués dans la régulation immunologique. Finalement, la polarisation des macrophages en M2c est occasionnée par une exposition à l'IL-10. Les macrophages ayant cette polarisation sont impliqués dans le remodelage et la réparation tissulaire⁷². Certains auteurs dénotent l'existence d'un quatrième type de polarisation. Il s'agit du phénotype M2d qui serait impliqué dans la réparation tissulaire et l'angiogenèse. Ce phénotype serait observé lors de l'exposition d'un macrophage de type M1 à de l'arginine⁷³.

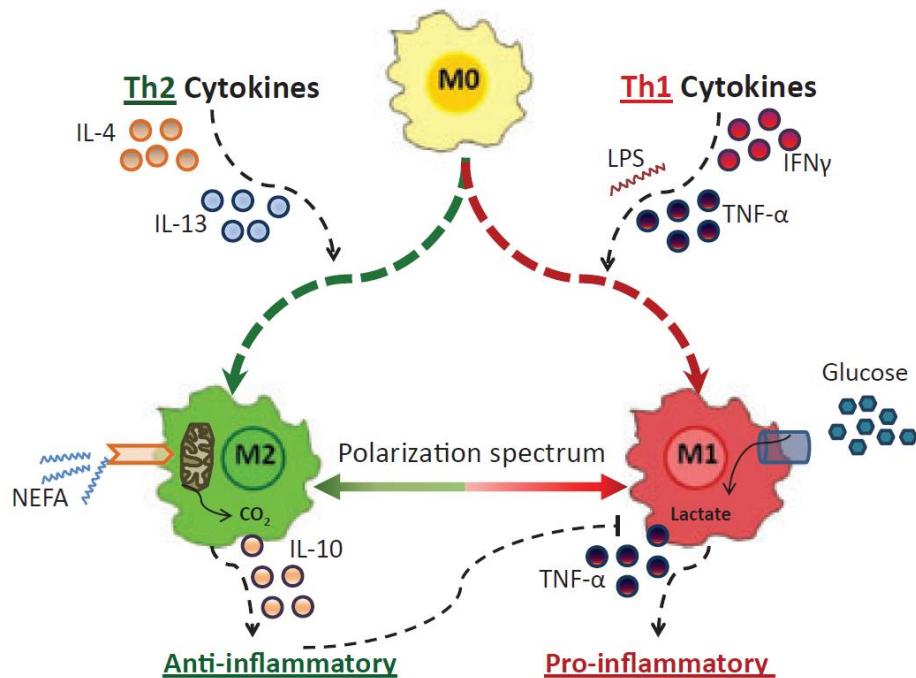


Figure 7 : Spectre de la polarisation des macrophages

Représentation schématique de la polarisation des macrophages M0 en macrophages M1 ou

M2. Différents stimuli peuvent favoriser la progression des macrophages sur le spectre M1-M2. NEFA : acides gras non estérifiés. Figure issue de Johnson, A. R., Justin Milner, J. & Makowski, L., 2012⁷⁰.

1.2.3 Fonctions antimicrobiennes du macrophage

La phagocytose est le processus cellulaire lors duquel la cellule détecte un microbe directement avec un récepteur membranaire ou à l'aide d'une molécule intercalée entre le microbe et le récepteur. Ces molécules qui font un lien entre le microbe et la cellule phagocytaire peuvent être des immunoglobulines ou des molécules du complément. La cellule phagocytaire étend des pseudopodes pour englober la particule et par fusion de membranes va l'intégrer dans une vésicule nommée phagosome. Afin d'éliminer le pathogène qui se retrouve dans le phagosome, la cellule procède à la maturation de la vésicule en phagolysosome afin de lui conférer des propriétés microbicides. Dans le cadre de cette maturation, le phagosome devient plus acide, se remplit d'enzymes hydrolytiques, de peptides antimicrobiens et devient très oxydant à cause de la présence de dérivés réactifs de l'oxygène et de dérivés réactifs de l'azote. Tous ces phénomènes sont occasionnés par un trafic bidirectionnel, c'est-à-dire des échanges de molécules entre la vésicule et la cellule. Les peptides dégradés provenant du microbe dans le phagolysosome peuvent être utilisés par la cellule phagocytaire afin de présenter l'antigène à une cellule de l'immunité adaptative^{74,75}.

L'autophagie est le second mécanisme par lequel la cellule phagocytaire peut éliminer un pathogène. Ce mécanisme est principalement utilisé pour recycler des organelles ou des protéines endommagées en leurs éléments constituants. Ce mécanisme effectue donc un rôle de stabilisation de la cellule et constitue un moyen de maintenir l'homéostasie intracellulaire. La formation d'une vésicule d'autophagie est un processus complexe (voir figure 8). Ce mécanisme est fortement régulé par la protéine mTOR. La protéine mTOR est un régulateur négatif de l'autophagie qui est actif lorsque la cellule a suffisamment d'énergie et de métabolites pour bien fonctionner. Elle est inactivée dans le cas d'un manque d'énergie et de métabolites, ce qui mène à l'activation de l'autophagie⁷⁶. Tout d'abord, une membrane double commence à former une vésicule qui deviendra

l'autophagosome contenant les protéines ou l'organelle à dégrader. Cette vésicule fusionne ensuite avec un lysosome contenant de nombreuses molécules pour dégrader des macromolécules biologiques. Suite à cette fusion, la vésicule devient un autolysosome. Les protéines expirées et les organelles en perdition seront dégradées en leur plus simple constituants et relâchés dans le cytosol⁷⁷. L'autophagie est un processus secondaire à la phagocytose pour dégrader des microorganismes et présenter les fragments des peptides résultant de la dégradation aux cellules de l'immunité adaptative. L'autophagie peut également être impliquée dans le contrôle des pathogènes intracellulaires. Ce mécanisme serait impliqué dans la présentation d'antigènes aux récepteurs intracellulaires innés, ce qui peut promouvoir une réponse inflammatoire⁷⁸. En effet, lors d'infections virales l'autophagie peut s'avérer nécessaire pour induire la production de molécules antivirales par la cellule, telle que l'interféron⁷⁹. Cependant, certains microorganismes ont développé des mécanismes d'évasion envers l'autophagie ou utilisent ce mécanisme à leur avantage⁸⁰.

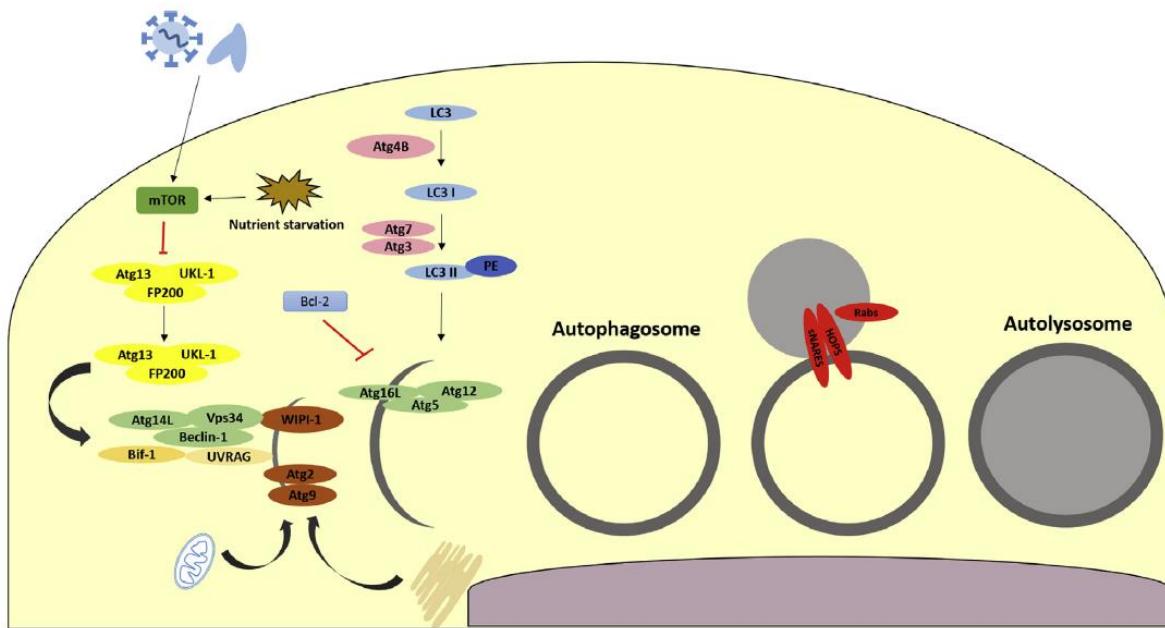


Figure 8 : Processus de formation des vésicules de l'autophagie.

Représentation schématique des différentes protéines et complexes protéiques nécessaires à la formation de l'autolysosome (aussi appelé autophagolysosome) ainsi que leurs interactions entre elles.

Figure issue de Rey-Jurado, E., Riedel, C. A., Gonzalez, P. A., Bueno, S. M. & Kalergis, A. M., 2015⁷⁷.

1.2.4 Interférons et cytokines antivirales

Les cytokines dont font partie les molécules de la famille de l'interféron (IFN) jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire et extracellulaire lors d'une infection. Ils permettent de coordonner une réponse immunitaire adaptée et d'éliminer le microorganisme pathogène. Comme il existe un très grand nombre de cytokines, l'emphase sera mise sur la famille de l'IFN.

La caractéristique de base de l'IFN est que ce dernier induit ou participe à une réponse antivirale⁸¹. Ainsi, une cellule infectée va produire de l'interféron pour signaler aux cellules environnantes la présence d'un microbe et stimuler leur défense face à cette menace. Les IFNs sont classés dans trois familles, les IFNs de type I, type II et type III selon leurs propriétés physicochimiques, leur séquence, leur récepteur, leur localisation chromosomique et leur structure. Lors de la liaison de l'IFN à son récepteur, une cascade de signalisation impliquant des réponses spécifiques est enclenchée pour orchestrer la réponse cellulaire de ce stimuli⁸².

Le groupe de l'IFN de type I chez l'humain comprend l'IFN- α , l'IFN- β , l'IFN- ω , l'IFN- κ , l'IFN- ϵ et IFN- ν . L'IFN- α et - β sont les plus étudiés dans ce groupe. Les IFNs de type I peuvent être produits par la plupart des cellules nucléées lors d'une réponse à une infection microbienne. Ils produisent des effets antiviraux et immunomodulatoires. Les effets antiviraux de l'IFN peuvent inclure un état de résistance cellulaire à la réPLICATION virale et une augmentation de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité pour favoriser la reconnaissance des cellules infectées par les cellules de l'immunité adaptatif⁸². La réponse IFN de type I passe par le récepteur de l'IFN α/β (IFNAR), puis par une cascade de signalisation utilisant les protéines kinases JAK1 et TYK2 pour mener à l'activation de gènes stimulés par l'IFN qui ont un effet antimicrobien. Les kinases de la famille JAK phosphorylent des facteurs de transcription et des activateurs de la transcription (voir figure 9). Les membres de cette famille comprennent les protéines TYK et JAK⁸³. Les facteurs de transcription activés par les protéines kinases JAK1 et TYK2 sont les protéines « Signal transducer and activator of transcription 1 » (STAT1) et STAT2. Ces facteurs de transcription sont phosphorylés par les kinases de la famille JAK et vont s'associer avec

d'autres protéines pour se rendre jusqu'au noyau et modifier l'expression des gènes de réponse à l'interféron⁸⁴.

Chez l'humain, on ne retrouve que l'IFN- γ dans le groupe de l'IFN de type II. Contrairement à l'IFN de type I qui peut être produit par plusieurs types cellulaires, l'IFN de type II n'est produit que par les leucocytes. Comme l'IFN de type I, l'IFN- γ a des effets antiviraux et immunomodulatoires de même que de l'inhibition de croissance. Cependant, les effets immunomodulatoires de l'IFN- γ sont les plus importants, puisqu'il joue un rôle dans la maturation des lymphocytes T et qu'il s'agit de la cytokine qui caractérise la réponse de type Th1. La réponse de type Th1 est caractérisée comme étant proinflammatoire ayant pour but d'éliminer les microorganismes pathogènes⁸¹. Une réponse IFN de type II passe essentiellement par le récepteur de l'IFN- γ (IFNGR) composé des sous-unités IFNGR1 et IFNGR2. Suite à la liaison au récepteur, les kinases JAK1 et JAK2 sont recrutées sur la partie cytosolique du récepteur pour phosphoryler les facteurs de transcription STAT1 et STAT3 afin de transmettre le signal jusqu'au noyau pour activer la réponse cellulaire propre à l'IFN de type II⁸⁵.

Le groupe de l'IFN de type III est le plus récent à avoir été décrit. On y retrouve la famille de l'IFN- λ , qui comprend l'IFN- λ 1, l'IFN- λ 2 et l'IFN- λ 3 (aussi nommé IL-29, IL-28a et IL-28b, respectivement). Ces IFNs peuvent être produits dans plusieurs types cellulaires, notamment les cellules épithéliales. Le récepteur de l'IFN de type III est un dimère composé de la protéine IFN- λ R1 et IL10-R2. La liaison à ce récepteur induit une cascade de signalisation intracellulaire impliquant les kinases JAK1 et TYK2 qui transmettront le signal aux facteurs de transcription STAT1 et STAT2 qui activeront la transcription de gènes stimulés par l'IFN de type III⁸⁶. Ainsi l'activation d'une cellule par l'IFN- λ mène à un état antiviral par un mécanisme similaire, mais différent de l'interféron de type I⁸².

Certains microbes pathogènes ont développé des mécanismes pour résister à l'action antimicrobienne du système immunitaire. Ces mécanismes d'action sont variés et diffèrent selon le pathogène. Le virus Zika est très sensible à l'action de l'IFN de type 1 dans divers types cellulaires^{53,87}. Cependant, il possède un mécanisme de résistance qui inhibe la

cascade de signalisation menant à l'activation de la réponse cellulaire à l'IFN. La protéine NS5 virale peut cibler la protéine STAT2 utilisée dans la signalisation du sentier de l'IFN pour la dégrader⁸⁸. Le sfRNA a aussi un effet inhibiteur sur l'activation des gènes stimulé par l'IFN⁸⁹⁻⁹².

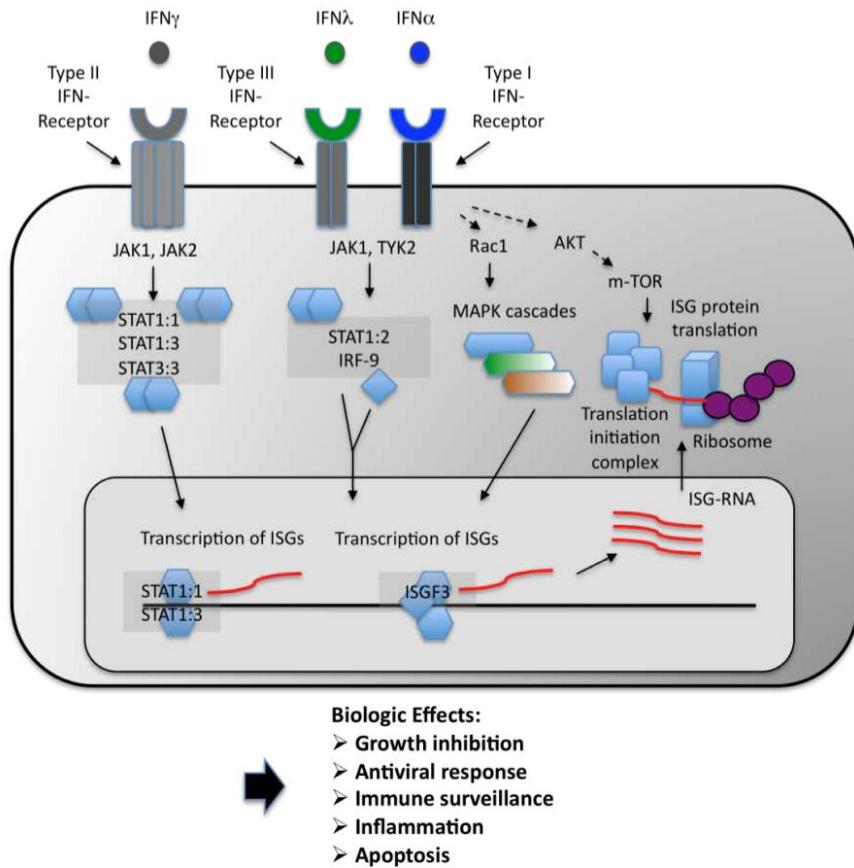


Figure 9 : Récepteur et sentier de signalisation de l'IFN

L'IFN de type I va activer une cascade de signalisation utilisant JAK1 et TYK2, qui vont activer les facteurs de transcription STAT1 et STAT2 et le facteur régulateur de l'interféron 9 (IRF-9). L'interféron de type I peut aussi activer la voir des Mitogen-activated protein (MAP) kinase et la voie AKT-mTOR pour mener à la réponse antivirale. La liaison de l'IFN de type II à son récepteur va activer une cascade de signalisation utilisant JAK1 et JAK2. Ensuite, les facteurs de transcription STAT 1 et STAT3 seront activés. Finalement, lorsque l'IFN de type III se lie à son récepteur, la réponse est sensiblement la même que l'IFN de type I. Toutes ces cascades mènent à une réponse antivirale. ISG : Gène stimulé par l'IFN. Figure adaptée de Katsoulidis, E., Kaur, S. & Platanias, L. C⁹³.

1.2.5 Immunité adaptative

La section concernant l'immunité adaptative est brève et représente un survol des connaissances actuelles sur cette partie de l'immunité, car elle n'est pas totalement pertinente dans le cadre de ce projet de recherche.

L'immunité adaptative se compose de facteurs cellulaires et humoraux. Les cellules de l'immunité adaptative sont principalement les lymphocytes T et B. Les facteurs humoraux de l'immunité adaptative sont les anticorps produits par les lymphocytes B. L'immunité adaptative est le système de défense le plus efficace chez l'être humain, mais il est plus lent à réagir que l'immunité innée. Pour être activé, des antigènes doivent être présentés aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules dendritiques ou les macrophages. Suite à cette présentation, les lymphocytes T vont exprimer un phénotype d'effecteur cellulaire ($CD8^+$) ou un phénotype auxiliaire ($CD4^+$). Principalement, les lymphocytes T présentant un phénotype effecteur vont tuer les cellules qui sont infectées par un parasite intracellulaire ou qui présentent des signaux anormaux et les lymphocytes T avec un phénotype auxiliaire vont assister les autres cellules du système immunitaire à effectuer leur fonction en les activant ou en amplifiant leur réponse. Ils peuvent également stimuler les lymphocytes B pour faciliter la production d'anticorps⁶².

1.3 Le VIH-1

Une brève présentation de ce virus est nécessaire car il a été utilisé dans le cadre d'expériences de co-infection avec le virus Zika. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un virus du genre *Lentivirus* dans la famille des *Retroviridae*. Les personnes infectées par le VIH peuvent développer le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) après plusieurs années d'infection. En 2016, plus de 36 millions de personnes étaient infectées par le VIH à travers le monde. De ce nombre près de 21 millions de personnes ont accès à un traitement antirétroviral en date de juin 2017. Il y a chaque année près de 2 millions de personnes nouvellement infectées et près d'un million de personnes meurent annuellement de maladies liées au SIDA⁹⁴. En 2014, au Canada, plus de 75000 personnes vivent avec le VIH et plus de 2500 personnes ont été infectées dans l'année⁹⁵.

1.3.1 Génome et protéines

Le génome du VIH de type 1 (VIH-1) est composé de deux copies d'ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 9,7kb. Comme le génome viral est synthétisé par la machinerie cellulaire de l'hôte on y retrouve des caractéristiques semblables à l'ARNm, dont une coiffe en 5' et une queue poly-A en 3'. Le génome code pour trois polyprotéines et pour les protéines Tat, Rev, Nef, Vpr, Vif et Vpu (voir figure 10). La séquence codante du génome viral se situe entre des séquences terminales longues répétées. Ces séquences ont une fonction dans la régulation de la réPLICATION du virus⁹⁶.

Les gènes codant les polyprotéines sont *gag*, *pol* et *env*. Le gène *gag* code pour les protéines de la matrice (MA), de la capsid virale (CA) et de la nucléocapside (NC). Le gène *pol* code pour les protéines de la transcriptase inverse (RT), une intégrase (IN) et protéase virale (PR). Le gène *env* code pour les protéines de l'enveloppe virale c'est-à-dire la protéine de surface (SU) et la protéine transmembranaire (TM). Les gènes *tat* et *rev* codent pour des protéines régulatrices essentielles qui permettent un bon fonctionnement des mécanismes de réPLICATION virale. Les protéines Nef, Vpr, Vif et Vpu sont des protéines accessoires qui servent à améliorer le taux de réPLICATION du virus⁹⁷.

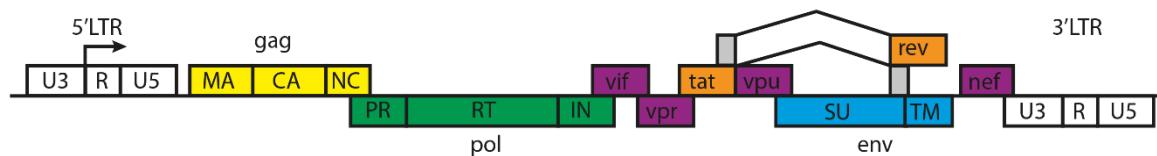


Figure 10 : Organisation du génome viral du VIH-1

Représentation schématisée de l'organisation du génome du VIH de type 1. En jaune sont identifiés les gènes codant pour *gag*, en vert les gènes codant pour *pol* et en bleu les gènes codants pour *env*. En orangé, on retrouve les gènes codants pour les protéines régulatrices essentielles et en mauve, les gènes codants pour des protéines accessoires.

Figure adaptée de Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M.⁹⁷.

1.3.2 Cycle viral

Le cycle viral du VIH est relativement complexe (voir figure 11). La première étape

consiste en l'attachement de la particule virale à un récepteur cellulaire et à son co-récepteur. Ensuite, l'enveloppe virale va fusionner avec la membrane de la cellule hôte grâce à la protéine TM afin d'internaliser sa capside. Une fois dans le cytosol, le virus va procéder à la transcription inverse afin de former de l'ADN double brin linéaire sous forme d'un complexe de préintégration. Ce complexe va migrer vers le noyau et s'insérer dans le génome de la cellule hôte. La machinerie cellulaire de la cellule hôte va transcrire l'ADN viral intégré en ARNm viral. Il y aura un épissage et un export nucléaire de l'ARNm viral vers le cytosol. Une fois dans le cytosol, l'ARNm sera traduit en protéines précurseurs. Ces protéines vont s'assembler autour de l'ARN génomique viral pour former un virion (voir figure 12). Le virus va quitter la cellule par bourgeonnement et procéder à la maturation de ses protéines par un clivage protéolytique des protéines précurseurs⁹⁷.

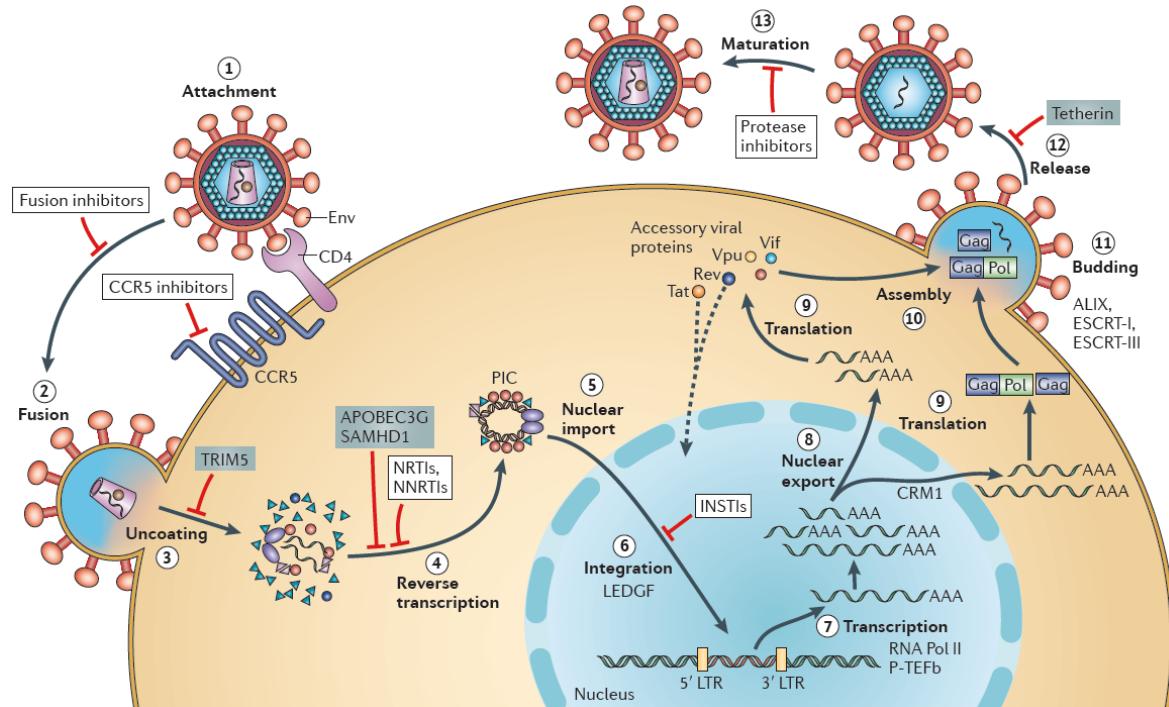


Figure 11 : Schéma du cycle viral du VIH-1

Illustration du cycle viral du VIH-1 et les effets de différents facteurs de restriction cellulaire.

Le virus se lie d'abord au récepteur CD4 et au corécepteur CCR5 (1) ensuite, le virus va fusionner avec la membrane plasmique et la particule virale va pénétrer dans la cellule (2-3). L'ARN viral sera rétrotranscrit en ADN (4) un complexe de préintégration sera formé et sera transporté jusqu'au noyau (5). Les protéines virales vont permettre l'intégration de

l'ADN viral dans le code génétique cellulaire (6). Cet ADN sera traduit en ARNm et exporté dans le cytoplasme pour débuter la traduction et former des protéines virales (7-9). Les nouveaux virions seront formés à partir de la membrane plasmique qui bourgeonnera avant d'être relâchés (10-12). Finalement la protéase virale va terminer la maturation de la particule virale dans le milieu environnant (13). Figure tirée d'Engelman, A. & Cherepanov, P⁹⁸.

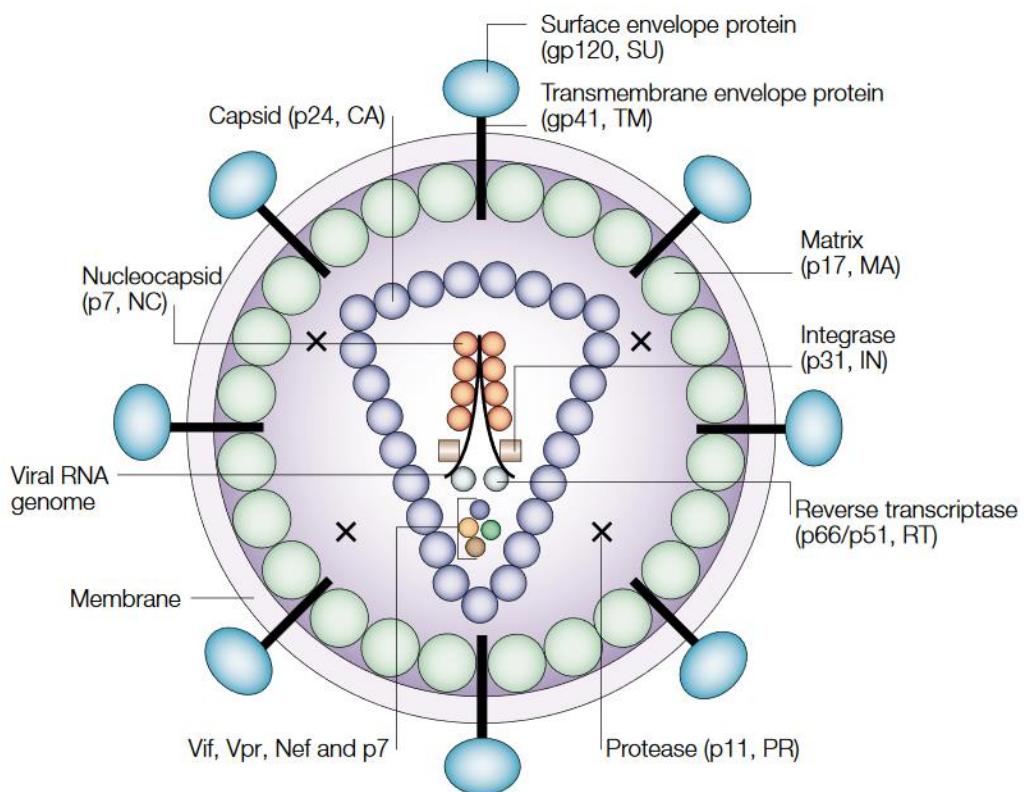


Figure 12 : Schéma de la particule virale du VIH-1

Représentation schématique de la particule virale du VIH-1. Figure tirée de Robinson, H. L. 2002⁹⁹.

1.3.3 Co-infection

Comme il n'existe aucun traitement permettant d'éliminer complètement le VIH-1 de l'organisme, le virus peut seulement être contrôlé par l'usage d'un traitement antirétroviral. Cet état d'infection chronique peut mener à la présence de co-infections, c'est-à-dire l'infection par plusieurs pathogènes¹⁰⁰. Ces infections peuvent être d'origine parasitaire,

bactérienne ou virale¹⁰⁰⁻¹⁰³. Il peut y avoir des interactions entre différents pathogènes et ces interactions peuvent être néfastes pour l'hôte. Par exemple, dans le cas d'une co-infection dans les macrophages, le parasite leishmania peut provoquer une augmentation de la production virale par les cellules qui sont co-infectées¹⁰⁴.

2. Hypothèses et objectifs de recherche

Depuis la découverte du virus Zika, peu d'attention lui a été accordé, car il semblait s'agir d'un virus bénin ne causant pas d'effets importants chez l'humain. Cependant, la récente épidémie au Brésil et la recrudescence des cas de microcéphalies et d'autres pathogénies sévères a provoqué un nouvel intérêt de la communauté scientifique mondiale pour ce *Flavivirus*. Comme il n'existe pas encore de traitements ou de vaccins contre le virus Zika, des travaux sont nécessaires pour approfondir les connaissances sur ce pathogène et développer de nouveaux moyens pour contrôler sa propagation et protéger les populations vulnérables de ses effets. Il est connu que le virus Zika se transmet principalement par les piqûres de moustiques. Cependant, les cellules cibles du virus sont variées et parfois protégées par des barrières, comme la barrière hématoencéphalique. Comment le virus parvient à traverser ces barrières et infecter les cellules qui sont normalement considérées comme protégées est toujours inconnu. La première hypothèse de ce projet de recherche est que lors d'une piqûre, un ou plusieurs types de cellules immunitaires peuvent être infectés lors de la réponse inflammatoire à la piqûre et se déplacer vers les sites immunitaires privilégiés afin d'infecter ces cellules cibles.

Un autre sujet sur lequel il y a peu d'information disponible est la co-infection entre le virus Zika et VIH-1 chez l'humain. Comme la récente éclosion de virus Zika a eu lieu en Amérique du Sud où l'on retrouve près de 2 millions de personnes vivant avec le VIH, il est probable que des individus porteurs du VIH soient infectés par le virus Zika. Les interactions entre ces deux virus méritent donc d'être étudiées¹⁰⁵.

Afin de vérifier ces hypothèses, les objectifs suivants ont été établis :

1. Vérifier la susceptibilité de plusieurs types cellulaires du système immunitaire face à une infection par le virus Zika.

2. Approfondir les connaissances concernant les mécanismes cellulaires employés lors de la réPLICATION virale, comme l'autophagie et la phagocytose.
3. Vérifier les effets d'une co-infection entre le virus Zika et le VIH-1 dans les cellules susceptibles d'être infectées par les deux virus.

3. Matériel et méthodes

Le projet de recherche ayant plusieurs objectifs, il a été effectué en plusieurs phases. La première consistait à isoler certaines cellules immunitaires et de vérifier leur susceptibilité à l'infection par le virus Zika. Une fois ce criblage effectué, il a fallu approfondir les connaissances de la pathogenèse du virus Zika dans ces types cellulaires. Finalement, des expériences de co-infections entre le virus Zika et le VIH dans des cellules immunitaires susceptibles aux deux virus ont été effectuées pour vérifier la présence de possibles interactions entre les deux virus.

3.1 Virus utilisés et amplification

3.1.1 Zika

Les stocks viraux ont été préparés dans la lignée de cellule C6/36 (ATCC® CRL-1660™) qui est une lignée de cellules de larves d'insecte du genre *Aedes albopictus*. Cette lignée est cultivée à 28°C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO₂ dans du milieu Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (Thermo Fisher) contenant de la pénicilline-streptomycine 1X (P-S) et supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (FBS) (Wisent) ainsi que l'ajout de MEM *Non-Essential Amino Acids* 1X (Thermo Fisher).

Lors de ce projet de recherche, 6 souches différentes de virus Zika ont été utilisées. Les informations d'isolation de ces souches se retrouvent dans le tableau 1. La souche HS-2015-BA-01 provient gracieusement du Dr. Anne Gatignol du Lady Davis Institute for Medical Research, Montréal, Canada. Les autres souches proviennent gracieusement du Dr. Gary P. Kobinger du Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval, Québec, Canada. Afin d'amplifier les virus reçus et de se constituer des stocks viraux, des cellules C6/36 ont été cultivées jusqu'à obtenir une confluence d'environ 75-80%. Ensuite, elles ont été infectées avec une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1 et incubées pendant 7 jours. La MOI est le rapport entre le nombre de particules virales infectieuses et le nombre de cellules dans un contenant. Ainsi, plus le rapport est élevé, plus il y a de virus par rapport au nombre de cellules et inversement plus le rapport est faible, moins il y a de virus par rapport au nombre de cellules. Ensuite, le milieu de culture des cellules a été récolté et

centrifugé à 400 x g pendant 10 minutes afin d'enlever les plus gros débris cellulaires. Suite à la centrifugation, le surnageant a été filtré sur un filtre de *Polyethersulfone* (PES) ayant des pores de 0,22 µm (Fisher Scientific). Le filtrat a été aliquoté et congelé à -80°C.

Souche virale	Hôte	Pays	Année d'isolement
MR766	<i>Macaca mulatta</i>	Ouganda	1947
HD 78788	<i>Homo sapiens</i>	Sénégal	1991
ArD 165522	<i>Aedes vittatus</i>	Sénégal	2002
PLCAL	<i>Homo sapiens</i>	Canada	2013
PRVABC59	<i>Homo sapiens</i>	Puerto Rico	2015
HS-2015-BA-01	<i>Homo sapiens</i>	Brésil	2015

Tableau 1 : Souches de virus Zika utilisées

Les souches virales utilisées proviennent de divers pays et ont été isolées à différents moments.

Informations des souches MR766, HD78788, ArD165522, PLICAL, PRVABC59 tirées de Baz, M., Goyette, N. et *al*¹⁰⁶. Informations de la souche HS-2015-BA-01 tirée de Teixeira, M., Herman,B.D et *al*¹⁰⁷.

3.1.2 VIH-1

Les souches virales de VIH-1 utilisées ont été obtenues à partir de clones moléculaires. Le premier clone moléculaire utilisé est le NL4-3-Bal. Il s'agit du clone NL4-3 de tropisme X4 qui a été modifié pour avoir l'enveloppe Bal de tropisme R5. Le second clone moléculaire est une modification du premier. Il s'agit du clone moléculaire NL4-3-IRES-GFP-Bal. Un *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) a été ajouté au génome viral et la protéine fluorescente verte ou Green Fluorescent Protein (GFP) y a également été insérée. Cette organisation permet d'exprimer la GFP chez les cellules qui sont infectées productivement par le virus.

Ces clones moléculaires ont été produits dans les cellules 293T qui dérivent des cellules humaines de rein HEK293. Les plasmides sont introduits dans les cellules en suivant un protocole de transfection calcium-phosphate, puis les surnageants contenant les virions sont récoltés et purifiés. Les stocks viraux ainsi obtenus sont conservés à -80°C.

3.2 Analyse de la production virale

Afin de déterminer la concentration des stocks viraux et la production virale de cellules infectées, la méthode de titration sur plaque a été utilisée. Cette méthode permet de quantifier la concentration en particules virales infectieuses à l'aide de cellules VERO E6 (ATCC). Les cellules VERO E6 proviennent de rein de singe *Cercopithecus aethiops*. Cette lignée est susceptible à un effet cytopathique très important lorsqu'elle est infectée par le virus Zika, car elle ne produit pas d'interféron alpha et bêta¹⁰⁸.

Les cellules sont ensemencées à raison de 5×10^5 dans chaque puits d'une plaque de 12 puits. Elles sont incubées pendant 48h pour les laisser adhérer et se multiplier jusqu'à confluence. Des dilutions séries de stock viral ou de surnageant de culture de cellules infectées ont été effectuées dans du milieu de culture MEM sans sérum. Une quantité de 200µL de ces dilutions en duplicité ont été appliquées sur les tapis de cellules VERO. Les plaques ont par la suite été incubées pendant 1h avec agitation pour que le virus soit bien en contact avec la totalité du tapis cellulaire. Suite à l'infection, le milieu infectieux est retiré et remplacé par du milieu MEM contenant 2% de FBS (Wisent) et 0,6% de SeaPlaque agarose (Lonza) et incubé pendant 4 à 5 jours selon les souches virales.

Suite à cette incubation, 500µL de formaldéhyde 2% (Thermo Fisher) est ajouté sur les puits gélosés pour fixer les virus et les cellules pendant au moins trente minutes. La solution de formaldéhyde est récupérée et neutralisée dans une solution appropriée. La gélose est enlevée des puits de façon à ne pas endommager le tapis cellulaire et les plages de lyse qui se sont formées.

Les plages de lyses sont révélées à l'aide d'une solution de cristal violet (MilliporeSigma) 0,8% (m/v) dans une solution aqueuse contenant 50% (v/v) d'éthanol qui est appliquée au fond des puits pendant 15 minutes. Finalement, les puits sont rincés indirectement sous un faible filet d'eau à trois répétitions et la plaque inversée est laissée à sécher à l'air libre pendant la nuit sans couvercle. Ainsi, les cellules sont colorées en violet et les plages de lyses apparaissent comme une absence de coloration dans les puits (voir figure 13). Il faut compter les plages de lyse de préférence en orientant la plaque vers un fond blanc ou

lumineux, puis tenir compte de la dilution utilisée pour obtenir un titre viral en unité formatrice de plaque par millilitre (UFP/mL).

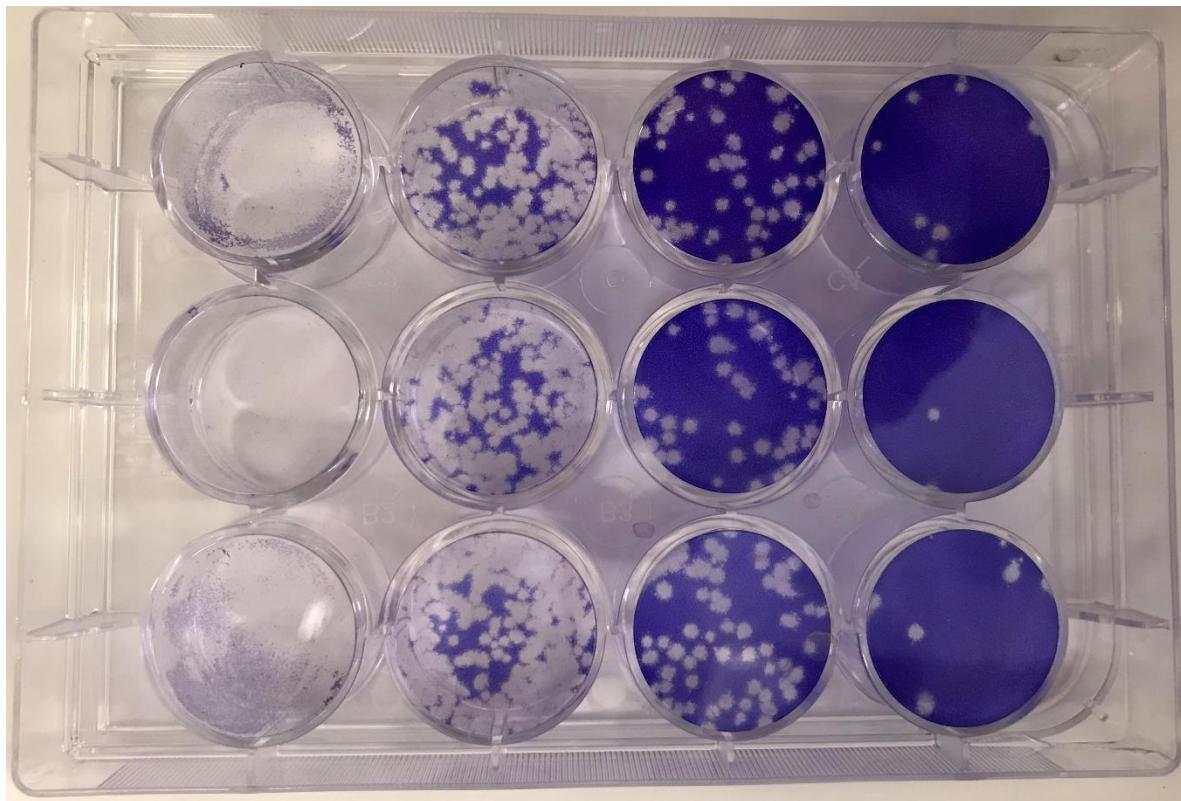


Figure 13 : Exemple d'une plaque de titration

Exemple de titration de surnageant de cellules infectées. De gauche à droite, du plus concentré au moins concentré. Dans la première et la seconde colonne, on ne peut distinguer correctement les plages de lyse formées. Les plages de lyse sont bien visibles et dénombrables dans la troisième colonne. Dans la dernière colonne, il y a trop peu de plages de lyses pour avoir un dénombrement précis.

3.3 Isolement des cellules

La méthode de base qui permet d'isoler les cellules primaires qui ont été utilisées au cours de ce projet de recherche est détaillée ici et les étapes spécifiques à un type cellulaire particulier se retrouvent dans sa propre section. Du sang périphérique de donneur sain a été prélevé par les infirmières du centre de recherche dans une poche contenant du citrate, du phosphate, du dextrose et de l'adénine qui agissent à titre d'anticoagulants. Par la suite, le sang a été déposé délicatement dans 16 tubes de 50mL contenant 15mL de *Lymphocyte*

Separation Medium (Thermo Fisher) afin d'éviter de mélanger le sang et le milieu de séparation. Après une centrifugation à une vitesse de 800 x g pendant 30 minutes, le sang a été séparé en ses différents composants, soit le plasma, les cellules mononucléées du sang périphérique, le *Lymphocyte Separation Medium* et les granulocytes avec les érythrocytes. L'anneau de cellules mononucléées qui s'est formé à l'étape précédente a été aspiré à l'aide d'une pipette de transfert stérile et transféré dans 8 tubes de 50mL. Les tubes ont été complétés jusqu'à contenir 50mL avec du *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) et centrifugés. Deux autres lavages successifs ont permis de concentrer les cellules mononucléées dans un seul tube et d'éliminer la majorité des plaquettes résiduelles. Ces cellules restantes ont été resuspendues dans du RPMI 1640.

3.3.1 Cellules NK

Suivant la séparation du sang en ses différentes fractions, la fraction contenant les cellules mononucléées du sang a été dénombrée à l'aide d'un hémacytomètre. Une quantité d'environ 50 millions de cellules a été prélevée et placée dans un tube de 5mL à fond rond. Les réactifs fournis avec la trousse *EasySep Human NK cell Enrichment Kit* (Stemcell) ont été ajoutés selon les instructions du fabricant. Une séparation magnétique à sélection négative a été utilisée pour enlever les cellules non désirées, c'est-à-dire que les cellules d'intérêts n'ont pas été ciblées par des anticorps, ce qui permet de diminuer les risques d'activer les cellules par les anticorps.

Une fois les cellules NK enrichies, elles ont été cultivées dans un incubateur humidifié à 37°C et à 5% de CO₂ dans du milieu RPMI 1640 (Thermo Fisher) supplémenté de 15% de FBS, de pénicilline-streptomycine 1X, de 10 µM d'hydrocortisone (MilliporeSigma) et de 20 ng/mL d'IL-15 (R&D systems). L'ajout de cortisone et d'IL-15 permet d'avoir une prolifération de cellules NK et de s'assurer que les cellules gardent le phénotype approprié.

3.3.2 Lymphocytes T CD4⁺

Une quantité d'environ 50 millions de cellules a été prélevée et placée dans un tube de 5mL à fond rond. Les réactifs fournis avec la trousse *EasySep Human CD4⁺ cell Enrichment Kit* (Stemcell) ont été ajoutés selon les instructions du fabricant. Une séparation magnétique à sélection négative a été utilisée pour enlever les cellules non désirées.

Les cellules ont été conservées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% de FBS et de pénicilline-streptomycine 1X dans un incubateur humidifié à 37°C et à 5% de CO₂. L'ajout de phytohémagglutinine (PHA) à une concentration de 1 µg/mL a été utilisé pour stimuler les cellules de façon non spécifique pour les activer. Par la suite, les cellules ont été cultivées dans un milieu contenant de l'IL-2.

3.3.3 Monocytes

Suivant la séparation du sang en ses différentes fractions, les cellules mononucléées du sang ont été dénombrées à l'aide d'un hémacytomètre. Une quantité d'environ 50 millions de cellules a été prélevée et placée dans un tube de 5mL à fond rond. Les réactifs fournis avec la trousse *EasySep Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 depletion* (Stemcell) ont été ajoutés selon les instructions du fabricant. Une séparation magnétique à sélection négative a été utilisée pour enlever les cellules non désirées.

Les cellules enrichies ont été conservées dans des tubes non adhérents dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% de sérum AB humain (Valley Biomedical) et de pénicilline-streptomycine 1X dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. L'utilisation de tubes non adhérents permet d'empêcher la différenciation des monocytes en macrophage.

3.3.4 Neutrophiles

Afin d'isoler des neutrophiles, 50mL de sang a été transféré dans un tube de 50mL puis centrifugé à 500 x g pendant 10 minutes. Le sérum (environ 20mL) se retrouvant dans la phase supérieure a été enlevé dans le but de diminuer la quantité de plaquettes. Une solution de 2% de dextran (Millipore Sigma) a été ajoutée au tube et mélangée par culbutage à 3-4 reprises. Le tube a été laissé ouvert immobile, sous la hotte, pendant 20 à 30 minutes pour permettre à la séparation d'avoir lieu. La couche supérieure blanchâtre contenant les leucocytes a été jetée. À l'aide d'une pipette stérile, 12 mL de *Lymphocyte Separation Medium* a été ajouté doucement au fond du tube sous le culot de globules rouges. Une centrifugation à 500 x g pendant 20 minutes a permis de séparer le reste des cellules des neutrophiles et des globules rouges qui se retrouvent dans le culot au fond du tube. Le surnageant a été jeté pour ne conserver que le culot de globules rouges et de

neutrophiles. Les cellules ont été détachées de la paroi du tube par un léger tapotement et une lyse hypotonique d'une dizaine de secondes a permis d'éliminer les globules rouges pour ne conserver que les neutrophiles. Une dernière centrifugation pour éliminer les débris et concentrer les neutrophiles dans 2mL de *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (Thermo Fisher) a été réalisée. Les cellules ont été comptées avec une solution de bleu acétique contenant 1% (m/v) de bleu de méthylène (Thermo Fisher) dilué dans 30% (v/v) d'acide acétique (Millipore Sigma).

3.3.5 Macrophages

Suivant la séparation du sang en ses différentes fractions, la fraction contenant les cellules mononucléées du sang a été extraite du gradient formé et les cellules ont été dénombrées à l'aide d'un hémacytomètre. Dans un pétri de 15cm de diamètre, 100 à 150 millions de cellules ont été déposées dans 15 à 20 mL de milieu RPMI 1640 et incubées pendant 3 heures dans un incubateur humidifié à 37°C et contenant 5% de CO₂.

Les monocytes sont des cellules qui adhèrent facilement au plastique du pétri et pourront être différenciés en macrophages dérivés de monocytes (MDMs). Les autres cellules mononucléées n'adhèrent pas facilement au plastique du pétri et pourront être enlevées en lavant les pétris à répétition avec du PBS. Les monocytes adhérés ont ensuite été incubés pendant 3 jours dans du RPMI 1640 supplémenté de 10% de sérum AB humain, de pénicilline-streptomycine 1X et de 25 ng/mL de *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF). La présence de M-CSF dans le milieu va stimuler la différenciation des monocytes en MDMs et ces derniers vont ensuite produire du M-CSF naturellement. Il n'est donc pas nécessaire de rajouter du M-CSF au-delà de trois jours. Après 3 jours de stimulation avec le M-CSF, les pétris ont été lavés à plusieurs reprises avec du PBS pour enlever les cellules non-adhérées résiduelles et le milieu a été remplacé par du RPMI 1640 supplémenté de 10% de sérum AB humain et de pénicilline-streptomycine 1X. Une dernière incubation de 3 jours dans un incubateur humidifié à 37°C et à 5% de CO₂ a été effectuée. Finalement, les cellules adhérées au pétri ont été lavées à deux reprises avec du PBS.

Les cellules ont été incubées pendant une heure à 37°C dans 7 mL d'acutase™ (Thermo Fisher). Cette étape sert à décoller doucement les cellules du pétri. Pour détacher les cellules récalcitrantes à l'effet de l'acutase™, un racleur à cellules a été utilisé. Une fois les cellules décollées, elles ont été transférées dans un tube de 50mL, centrifugées à 300 x g et resuspendues dans du milieu de culture approprié.

3.4 Infection des cellules

Les cellules adhérentes ont été cultivées dans des plaques de 24 puits. Une période de 24h s'est écoulée entre l'ensemencement des plaques et l'ajout du virus. Lors des tests de susceptibilité à l'infection, une MOI croissante allant de 0,1 à 10 a été utilisée. Le virus a été en contact pendant 24h avec les cellules avant d'être lavé. Suite à ce lavage, du milieu frais a été remis dans les puits et les plaques ont été remises à l'incubateur. Les surnageants ont été prélevés pour détecter la production virale à plusieurs temps post-infection. Les cellules ont été lysées à plusieurs moments post-infection avec le réactif RA1 de la trousse Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel) pour analyser la production d'ARN viral par RT-qPCR.

Les cellules non-adhérentes, comme les cellules NK et les monocytes ont été cultivées dans des tubes en polypropylène de 5 mL. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été cultivés dans un flasque T25 ou dans une plaque de 6 puits. La mise en contact avec le virus a eu lieu immédiatement après l'obtention des cellules. Les surnageants des culots de cellules lysées ont été récoltés suite à une centrifugation de 5 minutes à 300 x g.

Les agents modulateurs de l'autophagie ont été mis en contact avec les cellules 24h avant l'infection avec le virus Zika pour vérifier l'effet de l'autophagie sur la réPLICATION virale. L'activateur de l'autophagie, INK128 (Cayman Chemical) et l'inhibiteur de l'autophagie, SPAUTIN-1 (Cayman Chemical) ont été resuspendus dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (ATCC). Les concentrations allant de 10 à 100 nM de la molécule INK128 ont été utilisées dans les milieux de culture. Pour la molécule SPAUTIN-1, des concentrations entre 1 et 10 µM ont été utilisées. Les agents ont été rajoutés à chaque changement de milieu.

Le B18R est un récepteur leurre de l’interféron de type I. En l’ajoutant au milieu à une concentration de 100 ng/mL, il permet d’inhiber la réponse interféron de type I dans les cellules. Le ruxolitinib est une molécule qui inhibe la signalisation de JAK1 et JAK2. Il inhibe entre autres la réponse interféron de type I, II et III. Cette molécule est utilisée à des concentrations entre 0,1 µM et 10 µM et a été rajoutée à chaque changement de milieu. L’anticorps monoclonal (MAB15981, R&D Systems) ciblant IL-29 et IL-28b (IFN-λ1 et IFN-λ3, respectivement) a été utilisé dans les surnageants à des concentrations de 1 µg/mL et 5 µg/mL. Un anticorps monoclonal de souris (MAB003, R&D Systems) a été utilisé comme contrôle isotypique à une concentration de 1 µg/mL ou 5 µg/mL.

3.5 Quantification de l’ARN viral dans les cellules

3.5.1 Extraction d’ARN

Afin de détecter l’ARN du virus Zika dans les cellules étudiées, une lyse de ces cellules suivies d’une extraction d’ARN s’avère nécessaire. Afin d’y parvenir, la trousse *NucleoSpin RNA* (Macherey Nagel) a été utilisée en suivant les instructions du fabricant avec quelques modifications. En résumé, pour lyser les cellules le réactif RA1 a été déposé sur les cellules et récolté après quelques secondes d’homogénéisation à l’aide d’une micropipette et d’un embout stérile filtré sans ribonucléase et désoxyribonucléase. Ce lysat a été congelé à -80°C ou utilisé immédiatement pour les étapes subséquentes. Une quantité de 350 µL d’éthanol absolu pour biologie moléculaire (Spectrum) dilué à 70% (v/v) dans de l’eau ultrapure a été ajoutée à chaque lysat et le tout a été mélangé à l’aide d’un vortex pendant quelques secondes. Le lysat a été déposé sur une colonne et cette colonne a été centrifugée pendant 1 minute à 11 000 x g pour faire passer le lysat à travers la membrane de la colonne. Suite à plusieurs étapes de purification en série, l’ARN purifié est élué dans de l’eau sans ribonucléase.

L’ARN purifié obtenu est dosé à l’aide d’un appareil de spectrométrie de type DS-11 FX (DeNovix) et la pureté est validée à l’aide des ratios d’absorbance 260/280 nm et 260/230 nm. Le ratio de l’absorbance à 260/280 nm autour de 2,0 permet de valider l’absence de protéines ou d’autres contaminants dans l’échantillon. Le ratio 260/230 nm entre 2,0 et 2,2 permet de vérifier l’absence de sucres, phénols et d’autres contaminants utilisés lors de

l'extraction et de la purification sur colonne. Les échantillons d'ARN sont conservés à - 80°C jusqu'à leur utilisation future.

3.5.2 qRT-PCR

En partant des échantillons d'ARN congelés, une réaction de transcription inverse pour produire l'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN extrait a été effectuée pour pouvoir faire une réaction de polymérisation en chaîne quantitative. Environ 500 ng d'ARN a été prélevé et mélangé avec des amorces universelles (Millipore Sigma), de l'eau sans nucléases (Roche), d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dNTPs) à une concentration de 0,5 mM (Thermo Fisher), de RNAsin à une concentration de 1 U/ μ L (Promega), de tampon pour la transcriptase inverse à une concentration de 1X et de l'enzyme transcriptase inverse du virus de la leucémie murine moloney (M-MLV) à une concentration de 5 U/ μ L (Promega). Les amorces universelles permettent d'amplifier toutes les séquences d'ARN avec une efficacité similaire. Le mélange des quatre désoxyribonucléotides triphosphate permet à la transcriptase inverse de procéder à la transcription de l'ARN en ADN. La RNAsin permet d'inhiber l'action de ribonucléase qui pourrait avoir contaminé l'échantillon. Ce mélange a été déposé dans un thermocycleur et les paramètres du fabricant de l'enzyme ont été appliqués.

Suite à l'obtention d'ADNc il est possible de faire une réaction de polymérase en chaîne (PCR) pour déterminer la quantité relative de chaque cible. Pour y parvenir, il faut mélanger le PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) à une concentration de 1X qui contient tout ce qui est nécessaire à la réaction de qPCR avec 5 μ L de l'échantillon d'ADNc dilué 1 : 25 et les amorces à une concentration de 0,1 μ M. La plaque est ensuite transférée dans un appareil QuantStudio™ 6 Flex System (Applied Biosystems) et un cycle standard est lancé. Le cycle standard programmé ainsi : La plaque est chauffée à 50°C pendant 2 minutes, puis chauffée à 95°C pendant 10 minutes. Cette étape permet de préparer l'enzyme et de dénaturer l'ADN. Par la suite, 40 cycles de 15 secondes à 95°C et d'une minute à 60°C vont amplifier l'ADN ciblé par les amorces. Une lecture de la fluorescence sera effectuée à chaque cycle lors de l'étape à 60°C. Lors de l'abaissement de la température de 95°C à 60°C, il y aura hybridation entre les amorces et les ADNc. Une

fois les hybridations complétées, la polymérase amplifiera les cibles lors de l'étape à 60°C. La température est normalement trop élevée pour permettre l'hybridation entre les longs brins d'ADN, ce qui favorise la spécificité de l'hybridation entre les amores et l'ADN cible. Finalement, une augmentation lente, de l'ordre de 0,05°C/s, de la température aura lieu de pair avec une prise de la fluorescence en continu pour déterminer le point de fusion de l'ADN amplifié. Cette étape permet de vérifier la spécificité des amores et de s'assurer que la réaction s'est déroulée correctement.

Cible	Séquence amorce en amont	Séquence amorce en aval
18S	CGCTGAGCCAGTCAGTGT	TAGAGGGACAAGTGGCGTTC
Zika	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC

Tableau 2 : Information sur les amores utilisées dans les expériences de RT-qPCR

La première colonne indique la cible d'amplification du qPCR, la séquence des amores sens et antisens pour chaque cible est donnée dans le sens 5' -> 3'. La cible 18S est un gène d'ARN ribosomal exprimé dans toutes les cellules eucaryotes de façon relativement stable qui sert à la formation des ribosomes. La cible Zika amplifie l'ARN du virus qui code pour la protéine M.

Finalement, l'expression du gène du virus Zika sera rapportée en fonction de l'expression de l'ARN ribosomal 18S pour corriger le résultat en tenant compte de la quantité d'ARN total. Cette méthode de quantification relative utilise le $2^{-\Delta\Delta C_t}$, ce qui permet d'avoir une normalisation du gène étudié sur un gène exprimé de façon relativement constante dans les cellules¹⁰⁹. Il est ainsi possible de comparer différentes conditions entre elles pour observer des variations de quantité du gène étudié. Des contrôles négatifs ont été effectués pour vérifier que la préparation des mélanges a été effectuée sans contamination.

3.6 Transfert viral entre les neutrophiles et les MDMs

Une expérience de coculture a été effectuée pour déterminer la possibilité d'un transfert viral d'un type cellulaire à un autre. Les neutrophiles extraits précédemment ont été mis en contact avec le virus Zika à une MOI de 1 pendant 3h à 37°C sous agitation. Trois lavages successifs avec du PBS ont été réalisés afin d'enlever le virus résiduel. Une partie des

cellules ont été traitées à la trypsine pendant 5 minutes à 37°C pour détacher les particules virales qui auraient adhérées à la paroi cellulaire des neutrophiles sans y pénétrer et les autres cellules n'ont pas subi ce traitement. Par la suite, les neutrophiles ont été ajoutés à la culture de MDMs à un ratio de 10 neutrophiles pour 1 macrophage. Les neutrophiles ont été enlevés des cocultures à 1h, 5h et 24h suivant la mise en contact des différents types cellulaires. Les surnageants de culture ont été récoltés à 2, 7 et 14 jours suivant la mise en contact des différents types cellulaires et ils ont été analysés par titration sur plaque pour déterminer la présence de transfert et de production virale.

3.7 Microscopie à fluorescence

Pour observer les cellules infectées par le virus Zika en microscopie à fluorescence, les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre stérile ou dans des µ-Slide de 8 trous (Ibidi). Les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde 4% pendant environ 30 minutes. Suite à ce traitement, deux lavages au PBS ont été effectués pour enlever toutes traces résiduelles d'agent de fixation.

Une fois les cellules fixées, l'étape de perméabilisation et de blocage des cellules peut être effectuée. Cette étape est effectuée à l'aide d'une seule solution de PBS contenant 10% de sérum AB-humain, 20% de sérum de chèvre, 0,2% de Triton X-100 et 1% de BSA. Dans ce mélange, les sérum et la BSA servent d'agent bloquant et le détergent Triton X-100 sert d'agent de perméabilisation. Cette solution est laissée en contact avec les cellules pendant environ 45 minutes. Des lavages successifs avec du PBS sont effectués pour enlever complètement la solution de perméabilisation et de blocage.

L'étape du marquage avec l'anticorps primaire consiste en l'ajout d'une solution d'anticorps dans du PBS avec 1% de BSA. Dans cette solution se retrouve une dilution 1 : 4000 de l'anticorps D1-4G2-4-15 (BEI Resources) ciblant la protéine E des flavivirus, dont le virus Zika fait partie. Une incubation d'environ deux heures a été effectuée. Les lamelles ont ensuite été lavées de à plusieurs reprises pour éliminer tout anticorps n'ayant pas adhéré à sa cible.

Une solution contenant une dilution 1 : 500 de l'anticorps secondaire *Goat Anti-Mouse* lié au fluorochrome *Alexa Fluor® 546* (Life technologies) et contenant une dilution 1 : 1000 de 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Millipore Sigma) dans du PBS est ajoutée sur les lamelles. Les lamelles sont incubées en absence de lumière pendant 45 minutes. L'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome permet la détection de l'anticorps primaire. Le DAPI permet de marquer les noyaux des cellules. Des lavages ont été effectués pour enlever toute trace d'anticorps secondaire libre sur les lamelles dans le but de diminuer l'obtention de signaux non spécifiques.

Les filaments d'actine ont été détectés à l'aide de Phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa Fluor 488 (Life Technologies) suite aux lavages de l'anticorps secondaire. Le marquage a été effectué en se basant sur les recommandations du fabricant.

Finalement, les lamelles ont été montées sur des lames de microscopie à l'aide de Fluoromount-G™ (eBioscience) et serties avec du vernis à ongles pour s'assurer de la solidité du montage. Les montages sont conservés à 4°C jusqu'à leur analyse. La capture d'images des montages est effectuée à l'aide d'un microscope de modèle DMI6000 B (Leica). Les images ont été analysées avec le logiciel Volocity 5.4 (PerkinElmer).

Toutes les prises d'images ont été effectuées selon un schéma préétabli pour éviter de sélectionner des endroits contenant plus ou moins d'infection selon les traitements effectués. Le microscope utilise des filtres pour visualiser la fluorescence. Le filtre DAPI (excitation à $350\text{ nm} \pm 50\text{ nm}$ et émission à $460\text{ nm} \pm 50\text{ nm}$) permet de visualiser les noyaux marqués. Pour la visualisation de l'anticorps secondaire *Alexa Fluor 546*, le filtre RFP (excitation à $545\text{ nm} \pm 25\text{ nm}$ et émission à $605\text{ nm} \pm 70\text{ nm}$) a été utilisé et le filtre EGFP (excitation à $470\text{ nm} \pm 40\text{ nm}$ et émission à $525\text{ nm} \pm 50\text{ nm}$) a été utilisé pour visualiser la protéine GFP. Le taux d'infection a été mesuré en rapportant le nombre de cellules qui présentaient de la fluorescence avec l'anticorps D1-4G2-4-15 sur le nombre de noyaux colorés par le DAPI.

3.8 Test de viabilité

Afin de valider les concentrations des différents agents utilisés au cours de ce projet de recherche et de déterminer la viabilité des cellules infectées sans interrompre une expérience, la trousse *CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega) a été utilisée en suivant les instructions du manufacturier. Le test MTT permet de vérifier l'activité d'une enzyme mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme effectue une réaction qui crée un précipité violet suite à la réduction du réactif. Les cellules mortes sont donc incapables d'effectuer cette réaction et il n'y aura pas de précipité formé par ces cellules.

La trousse commerciale contient tous les réactifs nécessaires au test MTT. En résumé, les réactifs fournis sont mélangés avec du milieu de culture frais. Dans une plaque de 96 puits, on dépose ce mélange pour avoir un blanc. Le vieux milieu de culture est enlevé et remplacé par le mélange fait précédemment. Les plaques sont incubées dans un incubateur humidifié à 37°C et à 5% de CO₂ pendant environ 30 minutes ou jusqu'à ce qu'un changement de couleur du milieu avec les cellules se produise. 100 µL de milieu exposé aux cellules sera transféré dans la plaque de 96 puits, puis l'absorbance sera mesurée à 490 nm et le résultat sera normalisé sur le blanc. Les absorbances des conditions analysées sont comparées par le ratio de l'absorbance par rapport aux cellules qui sont non traitées ou non infectées.

3.9 Cytométrie en flux

L'analyse des cellules par cytométrie en flux a été utilisée pour déterminer le taux de cellules infectées par le VIH-1 exprimant la protéine GFP. La première étape consiste à détacher les cellules des puits auxquels elles étaient attachées avec une solution de PBS contenant 5mM d'EDTA (Thermo Fisher) et 1% de BSA (Fitzgerald Industries) remplace le milieu de culture pendant environ 60 minutes dans un incubateur humidifié à 37°C et à 5% de CO₂. La BSA permet d'augmenter la viabilité des cellules en diminuant les dommages qu'elles pourraient subir pendant cette étape. L'EDTA est un agent chélateur qui capture les ions métalliques nécessaires aux protéines d'adhérence. Un racleur à cellules a été utilisé suite à cette période d'incubation pour détacher délicatement les

cellules récalcitrantes. La seconde étape consiste à fixer les cellules avec du formaldéhyde 4% pendant environ 20 minutes. Un lavage avec du PBS permet d'éliminer les traces restantes de formaldéhyde. Les cellules ont été lavées, puis resuspendues dans du PBS contenant 2mM d'EDTA avant d'être analysées par un appareil FACSCELESTA (BD Biosciences). Les cellules étaient analysées en ciblant d'abord les cellules ayant la taille et la granularité désirée, un second ciblage permet de s'assurer que seulement les cellules isolées seront analysées et d'éliminer les agrégats cellulaires qui auraient pu se former. Finalement, le dernier ciblage concerne la protéine GFP. Un niveau d'émission basal des cellules à 525 nm lors de l'excitation par le laser à 488 nm est déterminé à l'aide de cellules non infectées. Toutes les cellules excédant ce niveau basal sont considérées comme étant infectées productivement par le VIH-1.

Alternativement, comme le clone moléculaire NL4-3-IRES-GFP-Bal exprime la GFP dans les cellules productivement infectées, il est possible d'observer en microscopie à fluorescence le nombre de cellules exprimant la GFP et de rapporter ce nombre sur le nombre de cellules totales observées afin d'obtenir une estimation du taux d'infection.

3.10 ELISA

Pour détecter la production virale du VIH-1, nous avons utilisé un ELISA ciblant la protéine de la capsid p24. Un ELISA est une technique immunologique qui permet de détecter la concentration d'un antigène en utilisant deux anticorps distincts qui ciblent des épitopes différents de la protéine de capsid. Le premier anticorp est l'anticorp de capture qui va être adsorbé au fond d'une plaque de 96 puits. Il s'agit du clone 183.H12.5C (NIH AIDS Reagent Program) qui a une spécificité pour l'antigène de capsid. Une quantité de 100 μ L de l'anticorp 183.H12.5C à une concentration de 2,5 μ g/mL est ajouté à chaque puits de la plaque. Une fois adsorbé, des lavages successifs effectués à l'aide d'un laveur de plaques automatique de type ELx-405 (Bio-Tek Instrument) avec une solution de PBST, soit du PBS contenant 0,05% de Tween-20 (Thermo Fisher) ont lieu pour enlever tout anticorp non adhéré à la surface du puits. Une étape de blocage d'environ une heure avec une solution de PBST et 0,5% de BSA permet de diminuer les liaisons non spécifiques qui pourraient avoir lieu lors des étapes ultérieures. Pendant ce blocage, la plaque est en

agitation constante à température de la pièce et les échantillons peuvent être préparés pour les analyser. Une fois le blocage terminé et les échantillons prêts à être mis dans la plaque, un lavage pour enlever la solution de blocage est effectué. Ensuite, 100 µL d'échantillons est déposé dans la plaque et 25 µL d'un tampon de lyse contenant 2,5% de Triton-X100 (Millipore Sigma) et 2% de bleu de trypan dans du PBST est ajouté pour s'assurer que l'enveloppe virale est détruite, ce qui exposera la protéine de la capsid. Une courbe standard de p24 provenant de la souche SF2 du VIH-1 (Chiron corporation) permet de quantifier la concentration de particules virales est aussi ajoutée dans la plaque en triplicata. La plaque est laissée à la température de la pièce sous agitation constante pendant une heure. Lors de cette heure, les anticorps liés à la plaque vont capturer la protéine de la capsid. À la fin de la période d'incubation un lavage automatisé a été effectué pour enlever toutes les particules n'ayant pas été capturées par l'anticorps de capture. Une quantité de 100 µL d'une solution contenant l'anticorps de détection 31-90-25 (ATCC; HB-9725; IgG2a CHO cells, discontinué) à une concentration de 0,5 µg/mL est ajouté dans la plaque. Cet anticorps couplé à la biotine se lie à la protéine de la capsid lors d'une incubation d'une heure avec agitation à température de la pièce. Encore un autre lavage a été effectué de façon automatisée pour enlever les anticorps non adhérés à l'antigène. Suite à ce lavage une solution de 0,05 µg/mL de streptavidine couplée à la *horseradish peroxidase* (Thermo Fisher) est ajoutée aux puits à raison de 100 µL par puits pendant 30 minutes. La streptavidine est une protéine qui a une forte affinité pour la biotine, elle va donc se lier aux anticorps biotinylés liés à l'antigène de capsid du VIH-1. Un autre lavage automatisé est effectué. La révélation se fait avec une solution commerciale de *TMB-substrate* contenant du 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Thermo Fisher). Ce composé réagit avec la peroxydase pour produire un composé bleuté. En ajoutant de l'acide sulfurique (H_2SO_4) dans les puits à une concentration de 1 M, on arrête la réaction entre le TMB et la peroxydase. Il se produit un changement de couleur du bleu vers le jaune et il est possible de lire l'absorbance à 450 nm. En comparant les absorbances obtenues des échantillons avec la courbe standard, il est possible de quantifier la concentration de p24 dans les échantillons.

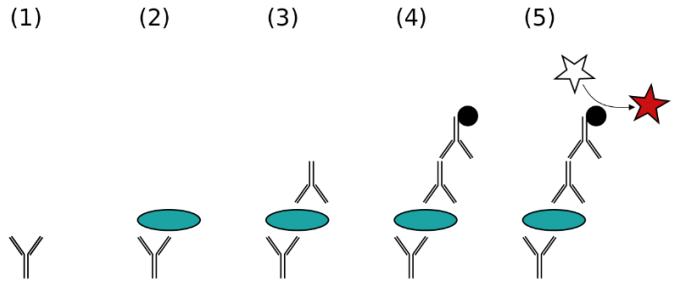


Figure 14 : Représentation schématique des étapes d'un ELISA p24.

- 1 : Anticorps de capture adsorbé au fond d'un puits d'une plaque à ELISA.
- 2 : L'antigène est capturé par l'anticorps de capture.
- 3 : L'anticorps de détection couplé à de la biotine se lie à un autre site de l'antigène.
- 4 : La streptavidine-HRP se lie à la biotine de l'anticorps de détection.
- 5 : Le substrat TMB est utilisé par la peroxydase et forme une solution bleutée.

Figure issue de <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ELISA-sandwich.svg>

3.11 Effet du VIH-1 sur le virus Zika

Dans le cadre de l'expérience de co-infection visant à déterminer l'effet du VIH-1 sur la réPLICATION du virus Zika, le but était de simuler une infection avec le virus Zika chez un patient déjà infecté par le VIH-1. Des macrophages ont été infectés pendant 7 jours avec le VIH-1 à une concentration de 25 ng de p24 pour 50000 cellules avant d'être mis en contact avec le virus Zika à une MOI de 1. Les surnageants ont été récoltés et analysés pour déterminer l'effet de la co-infection sur la production virale du virus Zika 2 et 7 jours suivant l'infection par le virus Zika.

3.12 Effet du virus Zika sur le VIH-1

L'expérience avait comme but de simuler une infection simultanée par le virus Zika et le VIH. Pour cette expérience, un virus de type VIH-1 exprimant la protéine Green Fluorescent Protein (GFP) a été utilisé. Les cellules ont été infectées avec une MOI de 0,75 du VIH-1 exprimant la GFP et différentes MOI de virus Zika. Les surnageants des cellules infectées simultanément ont été récoltés 7 jours post-infection pour être analysé par ELISA pour détecter des variations de production virale du VIH-1. Les cellules ont également été récoltées pour être analysées par cytométrie de flux pour détecter le taux d'infection des cellules au VIH-1.

3.13 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Prism 7.03 (Graphpad Software). Les moyennes ont été comparées au moyen d'un test t jumelé bilatéral « two-tailed paired t-test ». Le niveau de confiance a été fixé à 95%.

4. Résultats

4.1 Susceptibilité des cellules au virus Zika

Afin de déterminer si certaines cellules du système immunitaire sont susceptibles d'être infectées et de produire de nouveaux virions du virus Zika, des analyses de biologie moléculaire et des titrations de surnageant ont été effectués. Suite à l'isolement et la mise en contact de différents types cellulaires avec le virus, une quantification relative de l'ARN viral a été effectuée. Dans tous les cas, la souche virale PLCAL du virus Zika a été utilisée. Une MOI de 1 a été utilisée, sauf si spécifié autrement. Cette détection d'ARN viral par RT-qPCR vise à détecter des indices indiquant une réplication virale dans les différentes cellules analysées. Afin de valider les résultats obtenus par RT-qPCR, les surnageants des cultures ont été titrés sur des cellules VERO pour déterminer la production virale en unité formatrice de plaque par millilitre ou UFP/mL. Cette validation permet d'obtenir de l'information sur la complétion du cycle viral et de savoir si les cellules infectées peuvent produire des particules virales infectieuses.

4.1.1 Monocytes

Les monocytes isolés et mis en contact avec le virus pendant 3h, puis lavés avec du PBS ont été conservés pendant plusieurs jours en culture. À 3 et 7 jours post-infection, les surnageants ont été récoltés, puis conservés à -80°C jusqu'à ce qu'ils soient analysés et les cellules ont été lysées. Les lysats ont été conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN et l'analyse par RT-qPCR pour quantifier de façon relative la quantité d'ARN viral dans les cellules.

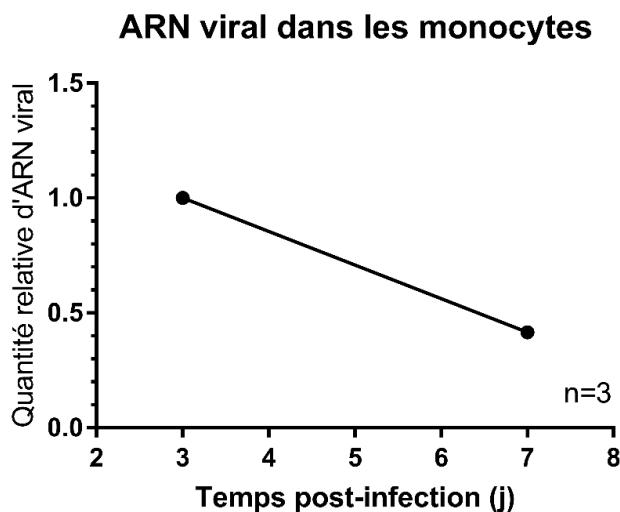


Figure 15 : Expression relative d'ARN du virus Zika dans les monocytes

La quantité d'ARN viral est normalisée sur l'expression d'ARN ribosomal 18S au troisième jour post-infection, une valeur de 1 a été attribuée à cette quantité et les rapports sont exprimés par rapport à la quantité au premier temps.

Une diminution de l'ARN viral d'environ 60% à 7 jours post-infection par rapport au niveau relatif d'ARN viral exprimé à trois jours post-infection a été observée dans les monocytes. Cette diminution de la quantité d'ARN viral dans les monocytes suggère que ces cellules sont naturellement réfractaires à l'infection ou que les conditions dans lesquelles ces cellules ont été cultivées n'étaient pas propices à les rendre susceptibles à l'infection. Il apparaît donc peu probable que ces cellules soient un hôte compétent du virus Zika selon les résultats obtenus par RT-qPCR.

Dans les monocytes mis en contact avec le virus Zika, aucune particule virale infectieuse n'a été détectée dans le surnageant à 3 et 7 jours post-infection. Il est cependant possible que des particules virales aient été produites, mais soient sous le seuil de détection de la méthode. En combinant ces résultats avec ceux obtenus par qRT-PCR, il apparaît peu probable que les monocytes soient infectés productivement par le virus Zika.

4.1.2 Lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ isolés ont été cultivés en présence ou absence de phytohémagglutinine. La phytohémagglutinine agit en liant des protéines de surface des cellules, ce qui a pour effet de transmettre un signal intracellulaire et d'activer les lymphocytes T CD4⁺ non activés. Cet agent a été utilisé afin de vérifier si l'état d'activation des lymphocytes avait un effet sur la susceptibilité de ces cellules à être infectées par le virus Zika. Après 48h d'incubation avec le PHA, les cellules ont été mises en contact avec le virus pendant 3 heures, puis lavées deux fois dans du PBS pour enlever toutes traces résiduelles de virus. Du milieu frais a été rajouté et les cellules ont été placées à l'incubateur pour la durée de l'expérience.

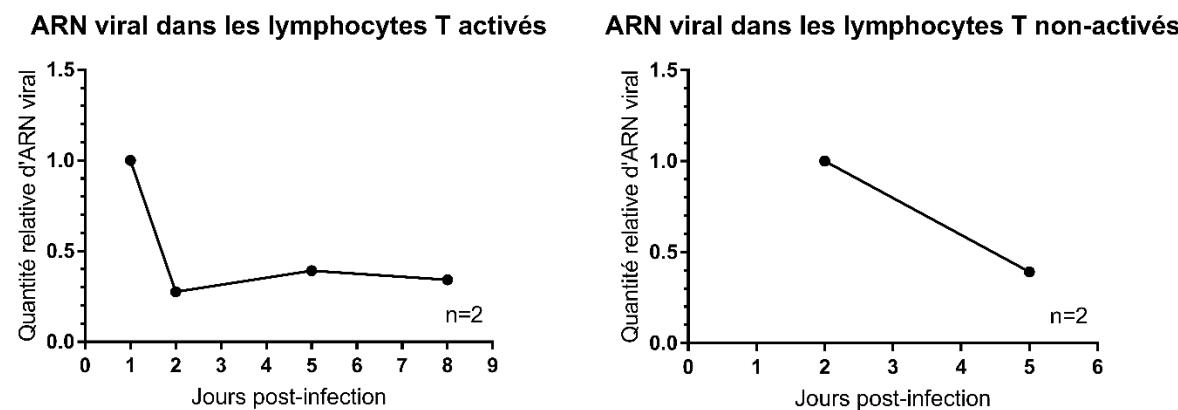


Figure 16 : Expression relative d'ARN du virus Zika dans les lymphocytes

La quantité d'ARN viral a été quantifiée de façon relative. Une valeur de 1 a été attribuée à la première quantité d'ARN viral détectée. Les quantités d'ARN aux autres temps sont exprimées par rapport à la valeur au premier temps quantifié.

Chez les lymphocytes T activés, une diminution de l'ordre de 70% a été observée en 24h, entre 1 et 2 jours post-infection. Par la suite, le niveau d'ARN viral détecté est resté relativement stable durant toute la durée de l'expérience. Cela suggère que les lymphocytes T activés ne supportent pas la réPLICATION virale et sont donc naturellement réfractaires à l'infection dans les conditions de cette expérience.

Dans le cas des lymphocytes T non activés, une diminution de l'ordre de 60% a été observée entre 2 et 5 jours post-infection. Cette diminution suggère qu'il n'y a pas de

réPLICATION VIRALE DANS CES CELLULES ET QUE CES CELLULES SONT RÉFRACTAIRES À L'INFECTION DANS CES CONDITIONS.

LES DIMINUTIONS D'ARN VIRAL OBSERVÉES DANS LES LYMPHOCYTES T NON ACTIVÉS ET ACTIVÉS SONT PROPORTIONNELLEMENT SIMILAIRES. LORS DE CETTE MÊME EXPÉRIENCE, LES SURNAGEANTS DE CULTURE ONT ÉTÉ RÉCOLTÉS ET CONSERVÉS À -80°C JUSQU'À CE QU'ILS SOIENT ANALYSÉS POUR DÉTECTER LES PARTICULES VIRALES INFECTIEUSES DANS LE MILIEU DES CELLULES.

Production virale dans les lymphocytes T CD4⁺

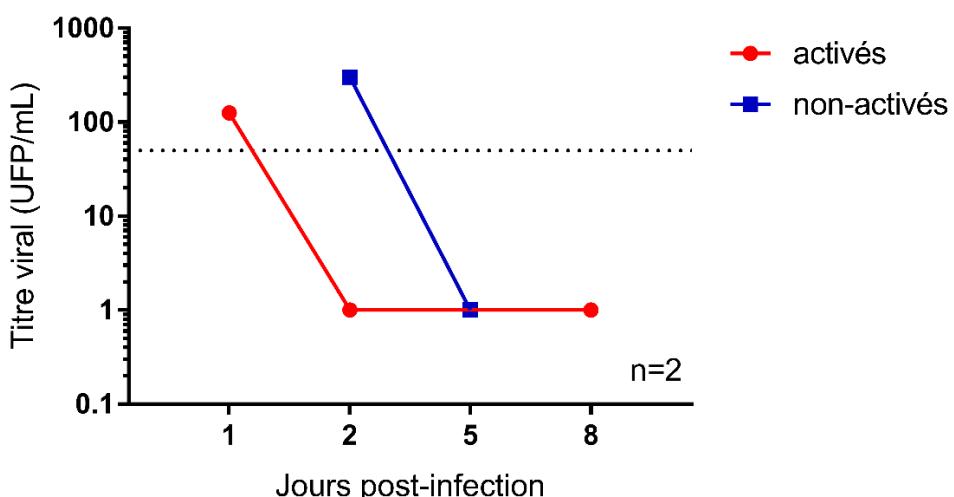


Figure 17 : Concentration en particules virales dans le surnageant des lymphocytes T CD4+ activés et non activés

LA LIGNE POINTILLÉE REPRÉSENTE LA LIMITÉ DE DÉTECTION DE LA MÉTHODE. TOUTES LES POINTES SE SITUANT SOUS CETTE LIGNE REPRÉSENTENT DES ÉCHANTILLONS DANS LESQUELS AUCUNE PARTICULE VIRALE N'A ÉTÉ DÉTECTÉE.

LE PREMIER PRÉLÈVEMENT DE MILIEU DE CULTURE A PERMIS DE DÉTECTER UN FAIBLE NOMBRE DE PARTICULES VIRALES DANS LES MILIEUX DES CELLULES NON ACTIVÉES ET ACTIVÉES. DANS CE CAS, IL S'AGIT PROBABLEMENT DE VIRUS RÉSIDUEL AYANT RÉSISTÉ AU LAVAGE. À AUCUN AUTRE MOMENT, LE PRÉLÈVEMENT DE SURNAGEANT N'A PERMIS DE DÉTECTER UNE PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES.

EN RÉSUMÉ, L'ÉTAT D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T CD4⁺ NE SEMBLE PAS AVOIR UN IMPACT SUR LA SUSCEPTIBILITÉ DE CES CELLULES À UNE INFECTION PAR LE VIRUS ZIKA. DANS LES DEUX CAS, AUCUNE

réPLICATION n'a été détectée par RT-qPCR. Les résultats de titration concordent avec les résultats obtenus au niveau moléculaire. Il n'y a pas de réPLICATION du virus Zika dans les lymphocytes T CD4⁺ qu'ils soient activés ou non activés.

4.1.3 Cellules NK

La production virale dans les cellules NK a été évaluée avec deux souches virales différentes et à des multiplicités d'infection allant de 0,1 à 10. Deux lavages au PBS ont été effectués pour enlever les particules virales provenant de l'inoculum initial. Les cellules ont été remises dans du milieu frais et le surnageant a été prélevé et remplacé par du milieu de culture frais à 1, 5 et 7 jours post-infection.

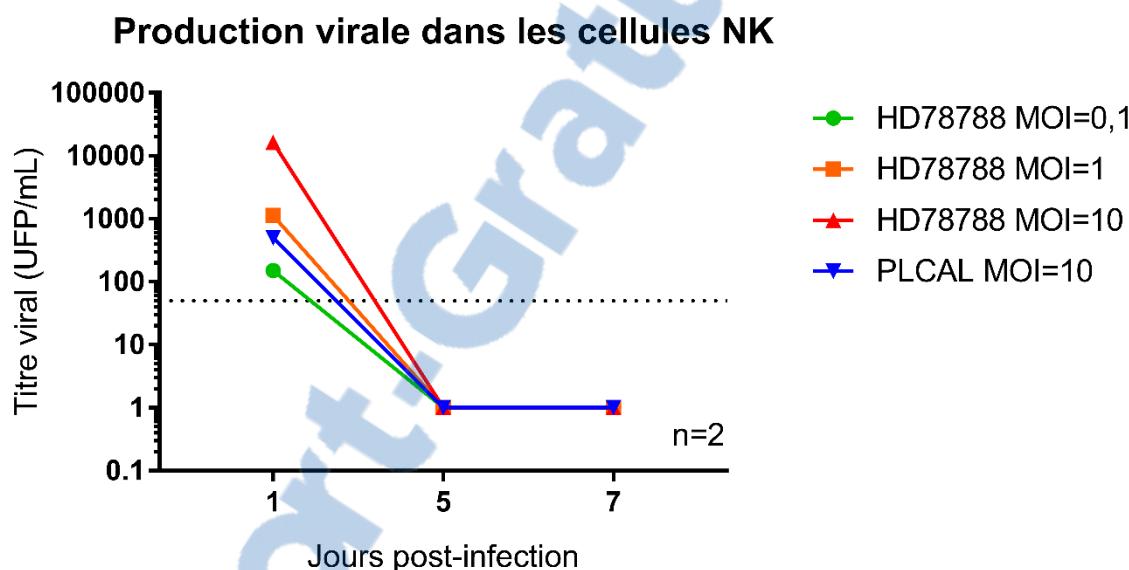


Figure 18 : Concentration de particules virales dans le milieu des cellules NK

La ligne pointillée représente la limite de détection de la méthode et tous les points sous cette ligne ont été considérés comme non détectés.

La concentration en particules virales infectieuses dans le surnageant des cellules NK est détectable seulement 1 jour suivant la mise en contact avec le virus. Cela suggère qu'il s'agit de virus résiduel n'ayant pas été enlevé suite aux lavages. Aux jours 5 et 7 post-infection, aucune particule virale n'a été détectée. Ce résultat indique que les cellules NK ne sont pas capables d'être infectées et de produire des particules virales infectieuses. Les particules virales détectées au jour 1 sont donc probablement des particules virales ayant

résisté au lavage ou ayant été captées, puis relâchées par les cellules NK.

4.1.4 Macrophages

Les MDMs ont été isolés et mis en contact pendant une heure avec le virus Zika. Les cellules ont été lysées à 24h et 48h post-infection. Des multiplicités d'infection allant de 0,1 à 10 ont été utilisées pour déterminer l'effet de la concentration de l'inoculum initial sur la susceptibilité à l'infection.

ARN viral dans les MDMs infectés à différentes MOI

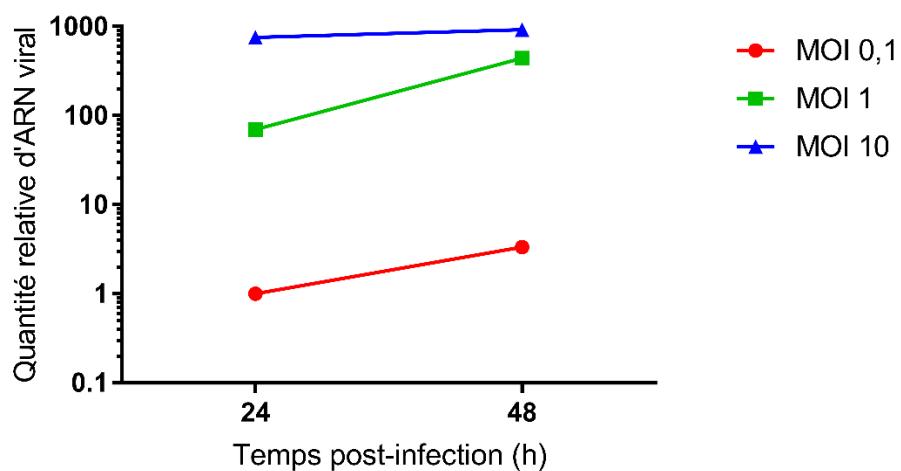


Figure 19 : Expression relative d'ARN viral dans les MDMs en fonction de la MOI

La quantité d'ARN viral a été quantifiée de façon relative. Une valeur de 1 a été attribuée à la première quantité d'ARN viral détectée à la MOI de 0,1.

Avec les trois multiplicités d'infection, une augmentation de l'ARN viral suggère une susceptibilité au virus et que ce type cellulaire permet au moins la réplication du matériel génétique du virus Zika.

Une expérience subséquente a été réalisée pour déterminer la production de particules virale du virus Zika dans les MDMs selon les souches de virus utilisées. Les MDMs ont été mis en contact pendant 1h avec une MOI de 1 de chaque souche. Suite à ce temps d'exposition au virus, deux lavages avec du PBS ont été effectués pour enlever les particules virales des puits de culture et du milieu frais a été ajouté dans les puits. Les surnageants de culture ont été récoltés à 3, 6, 9 et 15 jours post-infection et analysés par

titration sur cellule VERO.

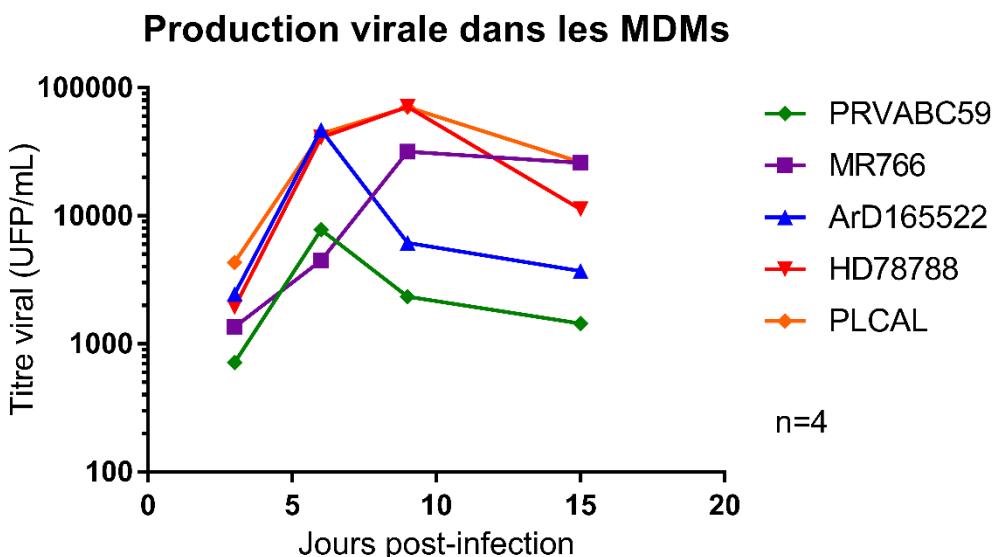


Figure 20 : Concentration en particules virales dans le surnageant des MDMs

Les différentes souches de virus Zika peuvent toutes infecter productivement les MDMs.
La production est soutenue dans temps jusqu'à 15 jours post-infection.

Dans les MDMs, une production virale soutenue est observée peu importe la souche virale utilisée. Ce qui confirme que le cycle viral peut s'effectuer au complet, relâchant des particules virales infectieuses et valide les résultats obtenus précédemment par qRT-PCR.

Des différences ont été observées entre les différentes souches du virus Zika. Un pic de réplication maximale est habituellement atteint entre 6 et 9 jours. Les souches PRVABC59 et ArD165522 semblent atteindre ce pic plus tôt que les autres souches. Des différences ont également été observées en ce qui concerne la concentration maximale de particules virales infectieuses retrouvée dans les surnageants.

En résumé, il apparaît que les macrophages dérivés de monocyte sont infectés productivement par le virus Zika. La réplication du virus a été observée par RT-qPCR et une augmentation de la concentration en particules virales infectieuses a été détectée lors de titration sur cellules VERO.

La souche HS-2015-BA-01 qui a été reçue au laboratoire plus récemment a également été mise en contact avec les macrophages et la production virale a été vérifiée à 3 et 7 jours post-infection selon le même protocole que l'expérience précédente avec les 5 souches de virus.

Production virale de HS-2015-BA-01 dans les MDMs

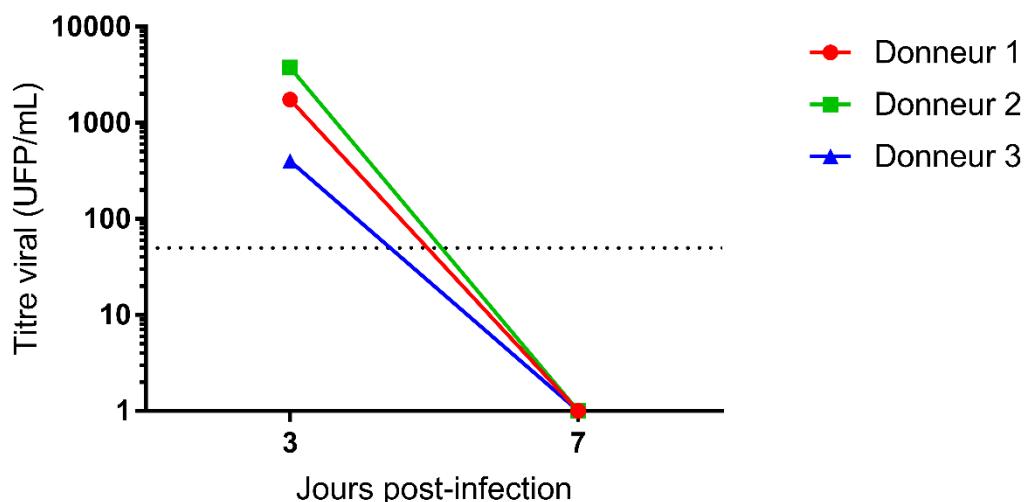


Figure 21 : Concentration en particules virales de la souche HS-2015-BA-01 dans les MDMs

La ligne pointillée représente la limite de détection de la méthode. Les points situés sous cette ligne représentent des échantillons dans lesquels aucune particule virale n'a été détectée.

Pour cette souche de virus Zika, les macrophages apparaissent résistants à l'infection et ne permettent pas une production virale soutenue dans le temps comme avec les autres souches. Lors d'analyses par RT-qPCR, aucune détection de matériel génétique de cette souche n'a été détectée dans les cellules, ce qui est concordant avec le résultat obtenu.

4.2 Taux d'infection des MDMs par les différentes souches du virus Zika

Le taux d'infection des cellules a été déterminé par marquage et observation des cellules en microscopie à fluorescence en rapportant le nombre de cellules infectées sur le nombre de cellules totales dans les champs observés. Les cellules ont été marquées avec le DAPI et l'anticorps ciblant la protéine E du virus Zika. Pour obtenir un taux d'infection avec une

précision acceptable, de 4 à 6 mille cellules totales ont été dénombrées par donneur.

Taux d'infection des MDMs par le virus Zika

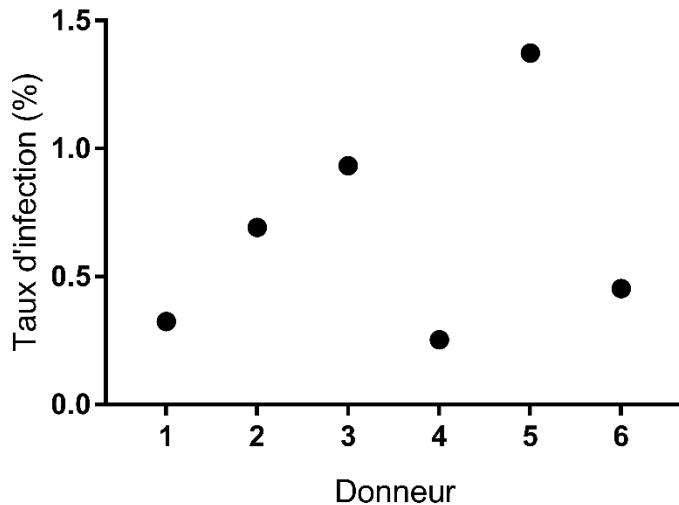


Figure 22 : Taux d'infection des MDMs par le virus Zika PL CAL

Le taux d'infection des macrophages par le virus Zika après 7 jours d'incubation oscille entre 0,3 et 1%. Des différences importantes entre les donneurs ont été observées.

Un très faible pourcentage de macrophage est infecté par le virus Zika. Cependant, ce très faible nombre produit une certaine quantité de particules virales infectieuses qui se retrouvent dans le surnageant et peuvent infecter d'autres cellules susceptibles.

Le taux d'infections des 6 souches a été analysé dans les MDMs de la même façon que précédemment pour vérifier s'il y a des différences entre les différentes souches.

Taux d'infection des MDMs par différentes souches de virus Zika

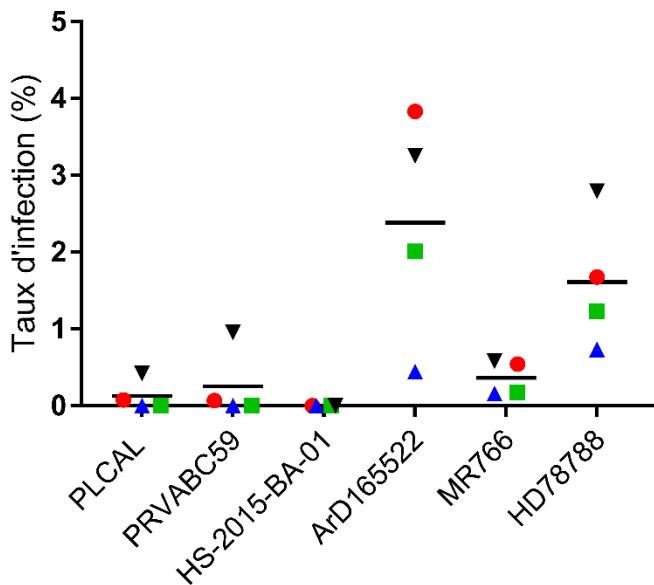


Figure 23 : Taux d'infection des MDMs par différentes souches de virus Zika

Le taux d'infection des macrophages par les différentes souches de virus Zika suite à 7 jours d'incubation varie en fonction de la souche virale utilisée. Chaque symbole représente le taux d'infection des MDMs provenant d'un donneur différent.

Tout d'abord, la souche HS-2015-BA-01 n'infecte pas les macrophages. Dans ces cellules provenant de quatre donneurs, le taux d'infection de la souche PL CAL était en moyenne de 0,13%, soit légèrement plus bas que lors de l'expérience précédente. La souche PRVABC59 a infecté les MDMs à un taux moyen de 0,26%, la souche ArD165522 a infecté les MDMs à un taux moyen de 2,39%, la souche MR766 à un taux moyen de 0,37% et la souche HD78788 à un taux moyen de 1,61%. Dans tous les cas, une variabilité importante est observable entre les cellules de différents donneurs.

4.3 Effet de l'infection des cellules sur leur viabilité

La viabilité des MDMs a été évaluée de deux façons différentes au cours de ce projet de recherche. La première consiste en l'évaluation de l'activité métabolique des cellules. Une diminution de cette activité peut indiquer de la mortalité cellulaire. La seconde méthode est une observation en microscopie pour détecter des effets cytopathiques.

4.3.1 Modulation du métabolisme cellulaire suite à une infection par le virus Zika

Afin de vérifier l'effet des différentes souches de virus sur le métabolisme cellulaire des macrophages infectés par le virus Zika un test MTT a été réalisé. Ce test vérifie l'activité d'une enzyme mitochondriale dans les cellules vivantes. L'enzyme mitochondriale va transformer le réactif du test MTT en précipité de couleur mauve qui est facilement détectable. Ce test permet donc de détecter des variations au niveau du métabolisme de la cellule et peut être utilisé pour obtenir une approximation de la viabilité cellulaire. Les MOI utilisées sont de 1 dans tous les cas et les analyses ont été effectuées 7 jours après l'infection.

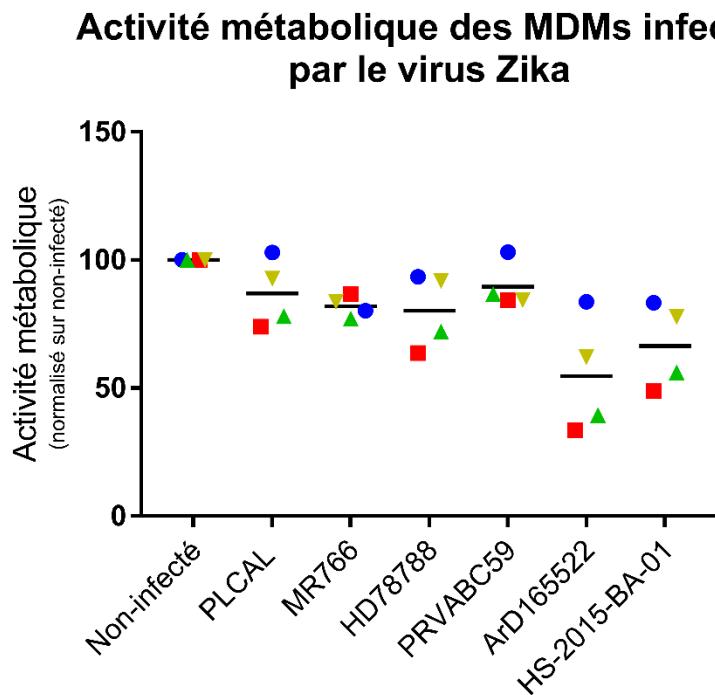


Figure 24 : Activité métabolique des MDMs selon la souche de virus Zika

L'activité métabolique des MDMs infectés avec les 6 souches disponibles au laboratoire du virus Zika. Les résultats obtenus ont été normalisés sur l'activité métabolique des MDMs non infectés par le virus. Chaque symbole représente un donneur différent.

La plupart des souches n'ont pas d'effet significatif sur l'activité métabolique des MDMs infectés. Les souches HS-2015-BA-01 et ArD165522 ont un effet plus marqué sur les

MDMs. Elles diminuent l'activité métabolique des cellules en contact avec elle de façon plus importante que les autres souches et une plus grande variabilité est observée chez ces deux souches par rapport aux autres, et ce malgré la présence d'une infection productive dans le cas de la souche HS-2015-BA-01.

4.3.2 Observation en microscopie de cellules infectées

Afin de détecter des changements morphologiques et de localiser le site de réPLICATION virale dans les MDMs des expériences de microscopie à fluorescence ont été effectuées pour observer les cellules infectées et les comparer avec des cellules saines. Les cellules ont été infectées pendant 7 jours avant d'être fixées et marquées à l'aide d'anticorps ciblant la protéine E du virus Zika, de DAPI et de phalloïdine qui marque les filaments d'actine.

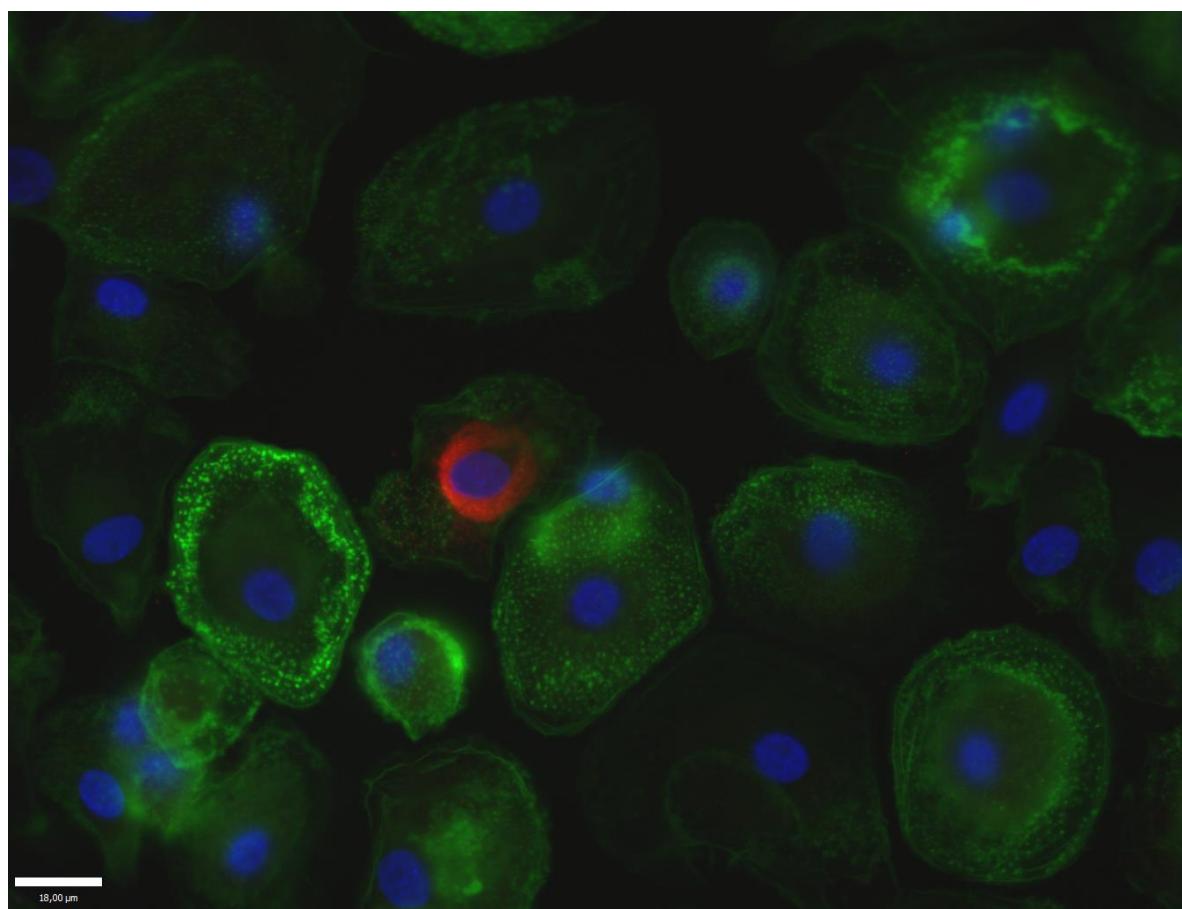


Figure 25 : Microphotographie de MDMs infectés par le virus Zika

Les MDMs ont été marqués avec le DAPI (bleu), l'anticorps D1-4G2-4-15 (rouge) et la phalloïdine (vert). L'image a été obtenue avec un objectif de 40X, 6 jours post-infection. La barre blanche a une longueur de 18μm.

La localisation des particules virales observées tend à être périnucléaire dans les macrophages (voir figure 25). Dans certains rares cas, la localisation des particules virales apparaît comme étant dans une vésicule. Dans tous les cas, l'infection des macrophages par le virus Zika n'affecte pas leur morphologie de façon significative.

4.4 Transfert viral entre différentes cellules immunitaires

Lors du processus d'inflammation, de nombreuses cellules sont mobilisées pour protéger l'hôte du pathogène envahisseur. Une grande quantité de ces cellules sont des neutrophiles. Comme les piqûres d'insectes causent une réaction inflammatoire, il est pertinent de vouloir déterminer si le virus peut s'attacher à une cellule et être transporté pour en infecter une autre. Afin de déterminer la capacité des neutrophiles à transmettre le virus à d'autres cellules, des expériences de transfert viral entre les neutrophiles et les macrophages ont été effectuées. Ces expériences ont fourni des résultats négatifs. Suite à plusieurs répétitions de l'expérience, il apparaît que le virus Zika est incapable de se transmettre des neutrophiles aux macrophages lors de coculture. Les neutrophiles seulement lavés au PBS n'ont pas réussi à transmettre le virus aux MDMs. Logiquement, ceux traités en plus à la trypsine pour enlever les particules virales qui auraient pu adhérer à la membrane plasmique des neutrophiles sans les infecter n'ont pas transmis le virus aux MDMs. Les divers temps de mise en contact des cellules n'ont pas eu d'effet sur la transmission de l'infection. Des contrôles positifs ont été utilisés lors de cette expérience pour valider que le virus mis en contact avec les neutrophiles était bel et bien infectieux.

4.5 Impact de l'autophagie sur la réPLICATION virale

Il a été rapporté que l'autophagie est impliquée dans la réPLICATION virale dans les fibroblastes de la peau⁵³. Cependant, l'autophagie a également un rôle protecteur contre l'invasion par des pathogènes. Quelques exemples de pathogènes qui peuvent être dégradés par le mécanisme de l'autophagie sont les bactéries du genre *Streptococcus*, *Salmonella*, *Shigella* et *Listeria*¹¹⁰. Les macrophages possédant d'importantes fonctions antimicrobiennes, il a été jugé pertinent de vérifier si l'autophagie jouait également un rôle

dans le cycle viral dans ce type de cellules.

Des agents modulateurs de l'autophagie ont été utilisés dans le cadre de ce projet de recherche pour vérifier l'implication de ce mécanisme cellulaire sur la réPLICATION du virus Zika. La molécule INK128 est un agent qui module de façon positive l'autophagie en inhibant directement la protéine mTOR qui forme le complexe mTORc avec d'autres protéines (voir figure 26). La protéine mTOR est un régulateur négatif de l'autophagie, donc son inhibition va augmenter le taux d'autophagie dans les cellules traitées.

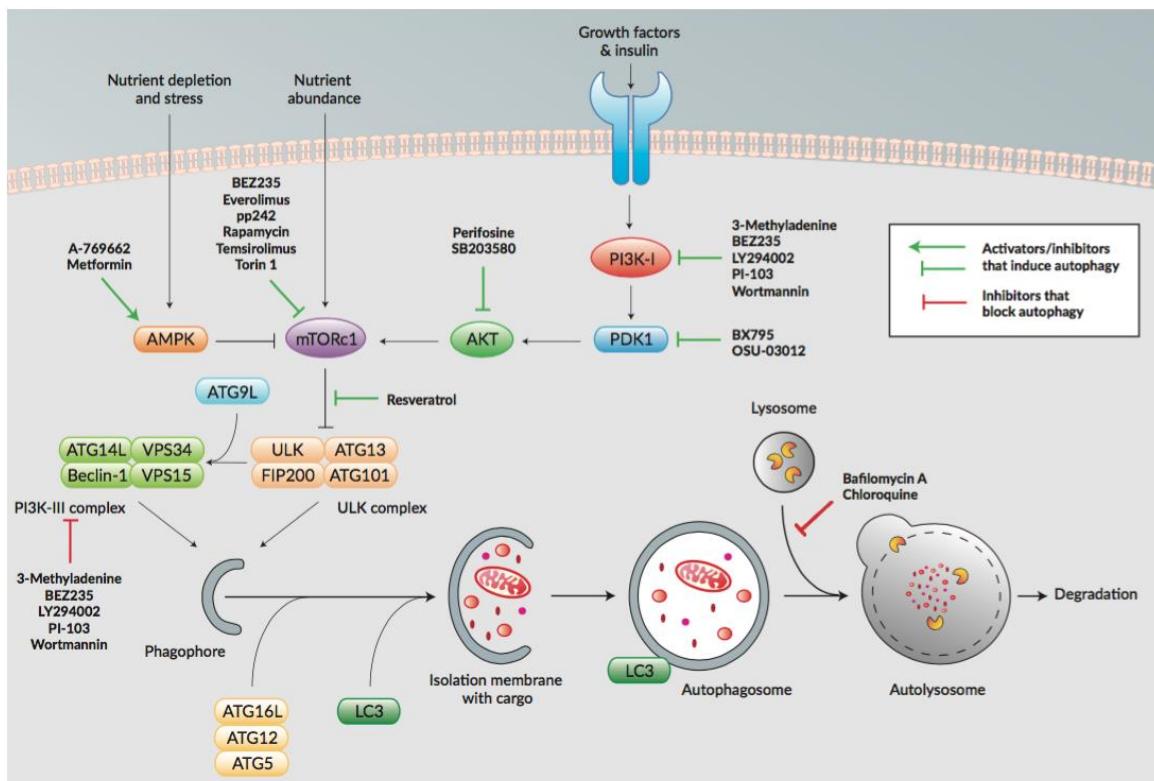


Figure 26 : Représentation schématique du cycle de l'autophagie

De nombreuses protéines sont nécessaires pour compléter le processus de l'autophagie. Il y a également de nombreuses molécules qui peuvent avoir un impact inhibiteur ou activateur de la voie de l'autophagie. Figure tirée de InvivoGen¹¹¹.

Inversement, la molécule SPAUTIN-1 est un agent qui module de façon négative l'autophagie. Il agit de façon indirecte, en inhibant l'action de déubiquitination des protéines USP10 et USP13 qui ciblent la protéine Beclin-1 (voir figure 27). En conséquence, cette dernière sera dégradée et ne pourra jouer son rôle dans les étapes précoces de formation de l'autophagosome. Cela aura comme résultat une diminution du

taux d'autophagie dans les cellules traitées avec cet agent.

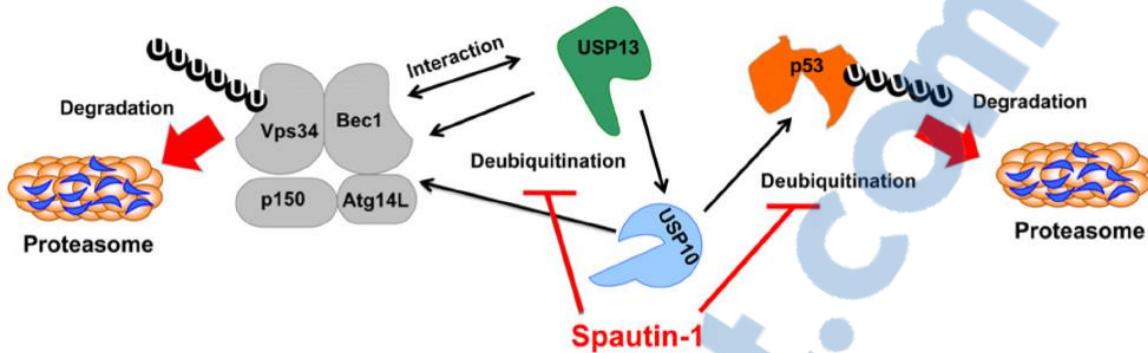


Figure 27 : Mécanisme d'action de la molécule SPAUTIN-1

Représentation du mécanisme d'action de la molécule SPAUTIN-1. En inhibant le processus de déubiquitination de USP10 et USP13, cette molécule va mener à la dégradation du complexe protéique contenant la protéine Beclin-1 (Bec1). Figure tirée de Liu, J. et al¹¹².

Les MDMs ont été traités avec des concentrations croissantes d'un agent stimulateur de l'autophagie, pendant 24h, puis infectés avec la souche PLCAL à différente MOI. Les surnageants ont été récoltés à deux jours post-infection et titrés.

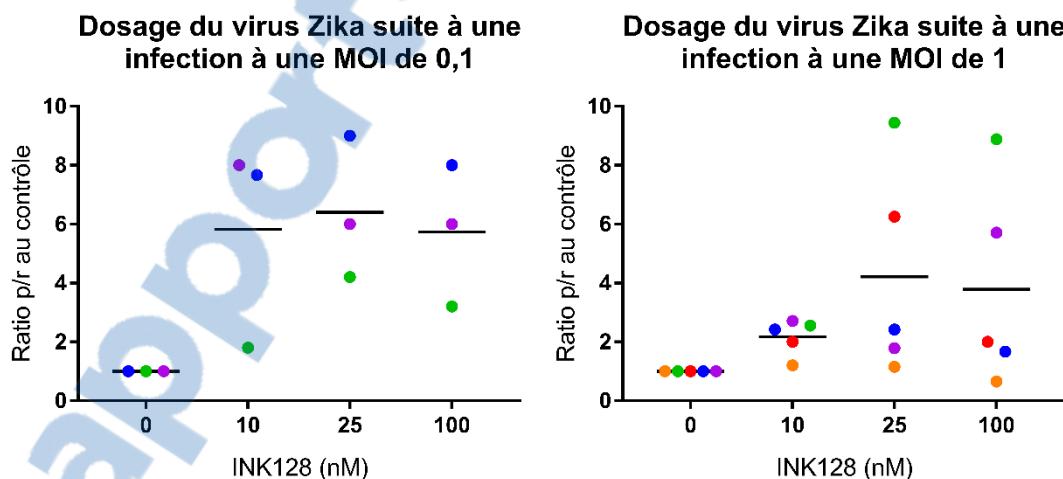


Figure 28 : Effet d'une augmentation de l'autophagie sur la réplication du virus Zika dans les MDMs

Les résultats sont présentés comme étant le ratio de la production virale normalisé sur le contrôle non traité par les agents modulateurs de l'autophagie. Le contrôle a été mis en

contact avec la plus grande concentration de DMSO à laquelle les MDMs ont été exposés lors des traitements. Chaque couleur représente un donneur différent.

L’induction de l’autophagie dans les macrophages occasionne une hausse de la réPLICATION du virus Zika par rapport au contrôle. L’effet est dose-dépendant à une MOI de 1 et plafonne à une concentration de 25 nM. Dans le cas d’une infection avec une MOI de 0,1 il y a aussi une augmentation, mais elle plafonne à la concentration la plus faible utilisée, soit 10 nM.

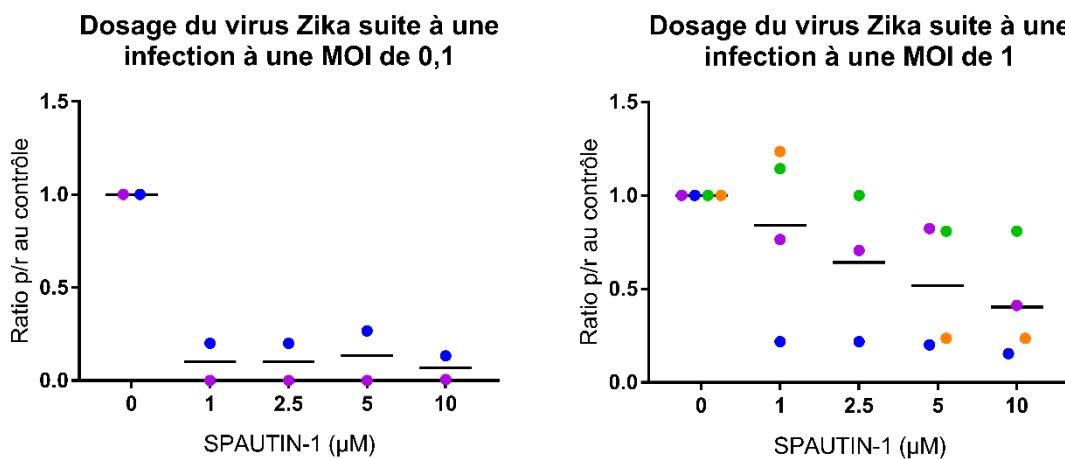


Figure 29 : Effet d’une inhibition de l’autophagie sur la réPLICATION du virus Zika dans les MDMs

Les résultats sont présentés comme étant le ratio de la production virale normalisé sur le contrôle non traité. Le contrôle a été mis en contact avec la plus grande concentration de DMSO à laquelle les MDMs ont été exposés lors des traitements. Chaque couleur représente un donneur différent.

L’effet de la diminution de l’autophagie dans les macrophages a un impact important sur la réPLICATION virale. Une forte tendance à la diminution est observée lors d’une infection avec une MOI de 0,1. Cet effet semble avoir atteint son maximum d’efficacité à la plus petite concentration utilisée, soit 1 μ M. Une augmentation de la concentration de l’agent inhibiteur ne réduit pas davantage la réPLICATION virale lors d’une infection à une MOI de 0,1. Dans le cas d’une infection avec une MOI de 1, on observe une tendance décroissante de la production virale par rapport au contrôle en augmentant la concentration de l’agent

inhibiteur de l'autophagie dans le milieu.

À la lumière de ces résultats, l'autophagie joue un rôle important dans le cycle viral du virus Zika dans les MDMs, car l'augmentation de ce processus mène à une augmentation de la réPLICATION virale. À l'inverse, une inhibition de l'autophagie diminue la réPLICATION du virus.

4.6 Interaction entre le VIH-1 et le virus Zika dans les MDMs

L'éclosion de virus Zika ayant lieu dans des régions où le VIH-1 est endémique, les effets d'une interaction entre une infection existante par le VIH-1 et une infection par le virus Zika nouvellement acquise méritent d'être étudiés.

Dans le but de vérifier les effets lors d'une infection simultanée, des tests de co-infection entre le virus Zika et le VIH-1 dans les cellules qui sont susceptibles à ces deux virus ont été effectués. Les MDMs peuvent être infectés par le VIH-1 et le virus Zika, ils sont donc un choix intéressant pour y étudier les relations entre ces deux virus. Les MDMs ont été infectés préalablement pendant 7 jours avec un clone moléculaire du VIH-1. Cette étape sert à établir une infection par le VIH-1 dans les MDMs pour reproduire une infection déjà existante chez un individu. Ensuite, le virus Zika a été mis en contact avec les cellules pour simuler une infection récente. Les puits ont été lavés à deux reprises avec du PBS et du milieu frais a été remis dans les puits. Les surnageants ont été récoltés à 2 et 7 jours suivant l'infection par le virus Zika et analysés.

RéPLICATION DU VIRUS ZIKA LORS DE LA CO-INFECTION AVEC LE VIH-1

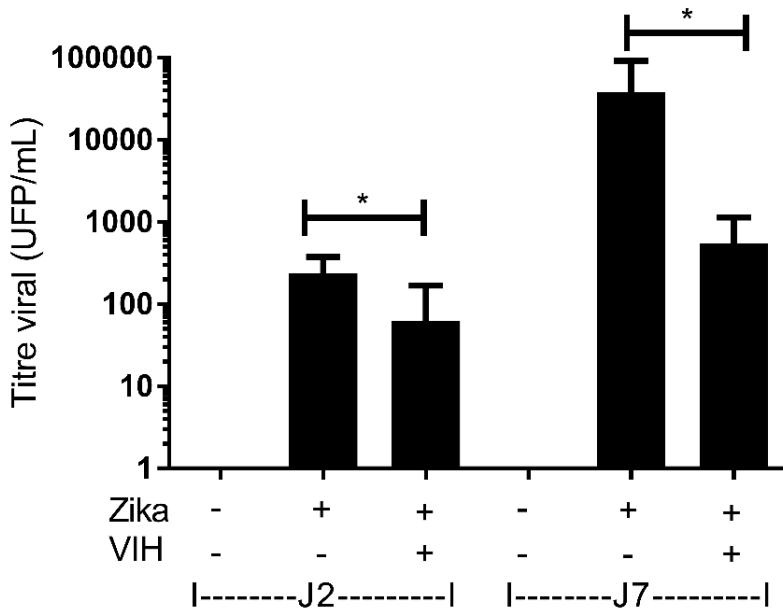


Figure 30 : RéPLICATION DU VIRUS ZIKA EN PRÉSENCE D'UNE INFECTION PAR LE VIH-1 DANS LES MDMs

Les surnageants des MDMs de 6 donneurs différents ont été récoltés 2 et 7 jours suite à la mise en contact avec le virus Zika. Avant d'être en contact avec le virus Zika, les cellules ont été infectées pendant 7 jours avec le VIH-1. L'analyse statistique est un « two-tail paired t-test » *p-value<0,05.

Des différences significatives dans le niveau de réPLICATION du virus Zika ont été observées dans les MDMs préalablement infectées par le VIH-1. Des pistes possibles pour expliquer ce phénomène incluent la production d'interféron par les cellules infectées par le VIH-1. Il est connu que les macrophages infectés par le VIH-1 produisent de l'interféron de type I en réponse à l'infection¹¹³. Cette production d'interféron pourrait les rendre réfractaires à une infection par le virus Zika. Il pourrait également s'agir d'une modulation de l'autophagie effectuée par le VIH. La littérature scientifique rapporte que la protéine Nef du VIH-1 inhibe la maturation de l'autophagosome¹¹⁴. Il a été démontré préalablement dans ce projet de recherche que la modulation de l'autophagie avait un impact sur la réPLICATION du virus Zika.

4.6.1 Rôle de l'interféron de type I dans l'infection par le virus Zika

Pour déterminer si la diminution de production virale lors d'une co-infection entre le VIH-1 et le virus Zika est provoquée par une production d'interféron de type I, du B18R a été ajouté avant le moment de l'infection avec la souche PL CAL du virus Zika. Le B18R se lie aux molécules d'interféron de type I qui ont été sécrétées par les cellules. Cela inhibe leur liaison aux récepteurs cellulaires et leur effet antiviral.

Les cellules ont été préalablement infectées pendant 7 jours avec le VIH-1 en présence ou non de B18R avant de les mettre en contact avec le virus Zika pendant une heure. Le traitement au B18R a été maintenu pendant toute la durée de l'expérience. Les puits ont ensuite été lavés avec du PBS à deux reprises et du milieu frais a été remis dans les puits. Les surnageants ont été récoltés 7 jours suivant l'infection avec le virus Zika.

Effet du traitement avec le B18R lors de co-infection dans les MDMs à 7 jours post-infection

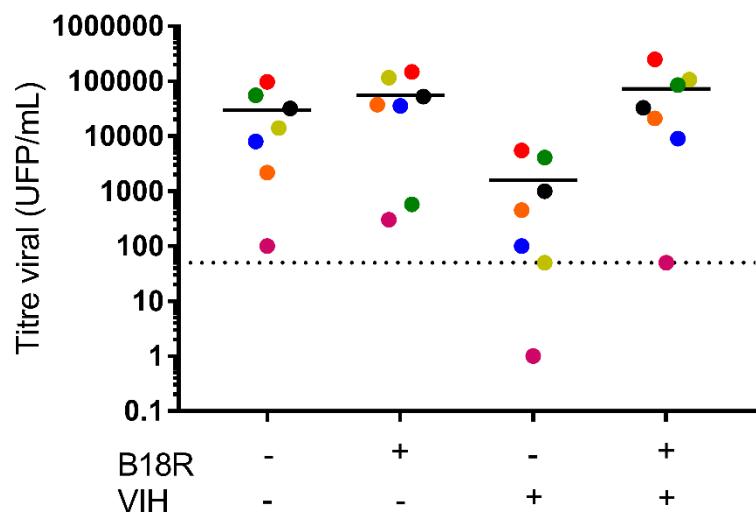


Figure 31 : Production virale dans les MDMs lors d'une co-infection en présence ou absence de B18R

Les surnageants ont été récoltés 7 jours suivant l'infection avec le virus Zika. La ligne pointillée représente la limite de détection de la méthode. Le point situé sous cette ligne représente un échantillon dans lequel aucune particule virale n'a été détectée. Les cellules

de sept donneurs différents ont été utilisées pour obtenir ces résultats.

La présence de B18R ne cause pas de différences significatives dans la production virale des MDMs infectés par le virus Zika. Comme attendu, la co-infection entre le VIH et le virus Zika provoque une diminution du titre viral du virus Zika. La présence de B18R dans les expériences de co-infection permet d'inhiber la diminution de la réPLICATION du virus Zika occasionné par la présence de VIH-1.

La diminution de production virale du virus Zika observée lors d'une infection de macrophages préalablement infectés par le VIH-1 semble donc être occasionnée par la réponse interféron de type I des macrophages lors de l'infection par le VIH-1.

4.7 Effet du virus Zika sur le VIH-1

Une particularité du virus Zika est sa capacité de se transmettre lors de relations sexuelles, ce qui est une voie de transmission commune entre le VIH-1 et le virus Zika. Les effets d'une double transmission virale n'ont pas été étudiés jusqu'à présent. Les effets sur le VIH-1 d'une double transmission sont inconnus et méritent qu'on s'y attarde.

L'effet du virus Zika sur le taux d'infection par le VIH-1 et le taux de réPLICATION du VIH-1 dans les cellules infectées par le VIH-1 et le virus Zika a été étudié à l'aide d'un clone moléculaire exprimant la protéine GFP. Les MDMs ont été infectés simultanément par le VIH-1 et le virus Zika souche PLICAL à différentes MOI. Les surnageants ont été récoltés 7 jours post-infection et les cellules analysées par cytométrie en flux.

Taux d'infection des MDMs par le VIH-1 lors de la co-infection avec le virus Zika

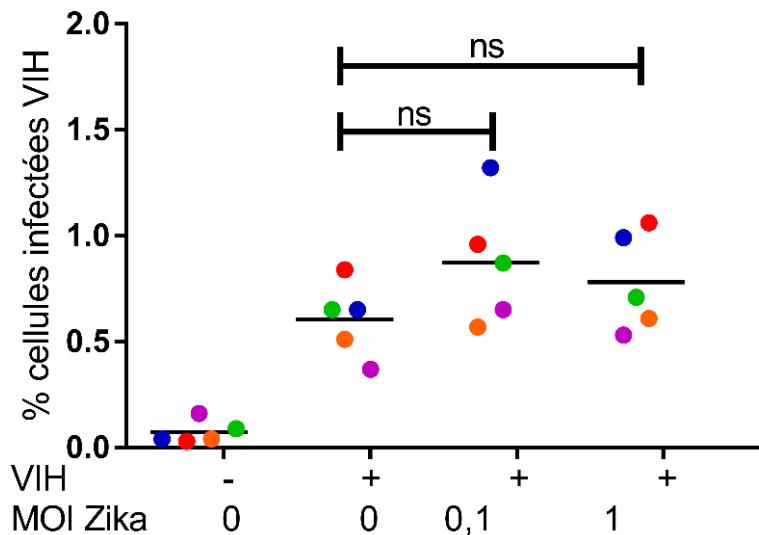


Figure 32 : Taux d'infection des MDMs par le VIH-1 lors de co-infection.

Le taux d'infection des MDMs par le VIH-1 a été déterminé par cytométrie de flux en analysant les cellules exprimant la protéine GFP. Les cellules positives pour l'expression de la protéine GFP sont considérées comme étant productivement infectées.

Le faible taux d'infection rend peu probable la présence du virus dans la même cellule, mais cela a été démontré comme possible par microscopie à fluorescence (données non montrées). La présence des deux virus lors d'une infection simultanée ne modifie pas le taux d'infection du VIH-1.

Comme le taux d'infection n'est pas nécessairement corrélé avec la production virale, un ELISA ciblant la protéine de la capsid p24 du VIH-1 a été réalisé sur les surnageants de culture des différentes conditions testées à 7 jours post-infection.

Production de la protéine p24 lors de la co-infection entre le virus Zika et le VIH

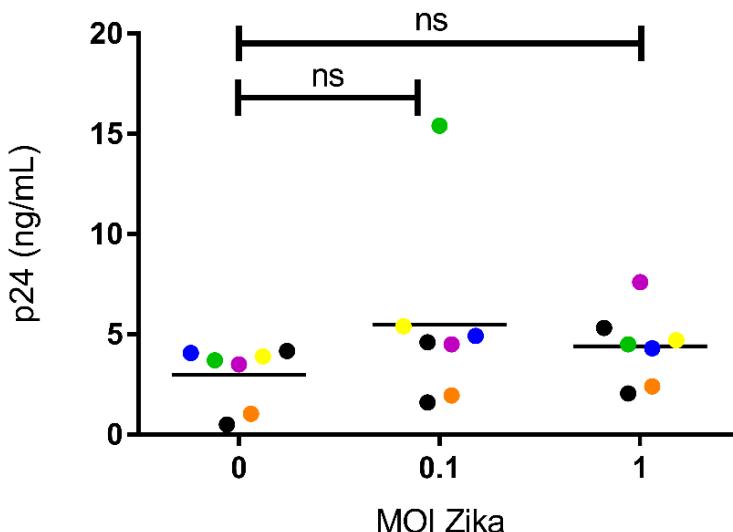


Figure 33 : Taux de réplication du VIH-1 lors de co-infection

La production de la protéine de capside p24 a été analysée par un ELISA. Une courbe standard a été utilisée permettant de quantifier la réplication du virus par la concentration de protéine virale dans le surnageant de culture.

Il n'y a aucune modification significative dans la production de particules virales du VIH-1 lors d'une co-infection avec le virus Zika.

En résumé, il apparaît que la co-infection du VIH-1 avec le virus Zika n'a pas d'effet sur le taux d'infection des cellules par le VIH-1 et que la production virale du VIH-1 n'est pas affectée de façon significative.

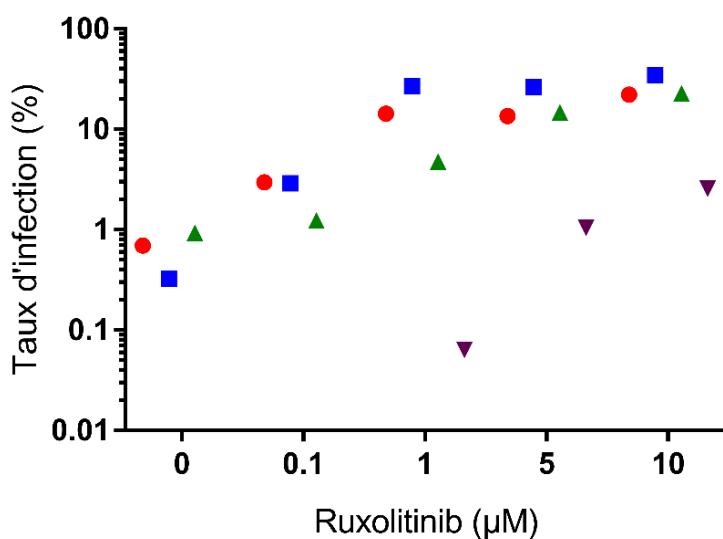
4.8 Inhibition de la signalisation des récepteurs de l'interféron

Suite aux expériences avec le B18R qui bloque la réponse interféron de type I, il nous apparaissait pertinent de s'attarder à la réponse interféron des macrophages. Comme il existe plusieurs types d'interférons, un inhibiteur à plus large spectre a été choisi pour étudier les effets de l'interféron sur le virus Zika.

Lorsqu'une molécule d'interféron se lie à un récepteur cellulaire, le signal transmis passe par la voie des Janus Kinase (JAK). Un autre moyen de vérifier l'impact de l'interféron sur la réPLICATION et l'infection des cellules par le virus Zika est d'inhiber cette transmission de signaux. Le ruxolitinib (Enzo Life Sciences) est une molécule qui inhibe les protéines JAK1 et JAK2. Par conséquent, cette molécule inhibe la signalisation de l'interféron α , β , γ et λ , soit l'interféron des types 1, 2 et 3, mais elle n'est pas spécifique à la voie de signalisation de l'interféron.

Les cellules cultivées sur des lamelles de verre ont été traitées avec du ruxolitinib à différentes concentrations simultanément à l'infection par la souche PLCAL du virus Zika. Les cellules ont été conservées pendant 7 jours post-infection avant d'être fixées et marquées pour les observer en microscopie. Le ruxolitinib a été rajouté lors de changements de milieu afin que la molécule soit constamment dans le milieu.

Taux d'infection des MDMs en présence de Ruxolitinib



Le taux d'infection augmente en fonction de la concentration de ruxolitinib. Cela suggère qu'une réponse interféron autre que l'interféron de type I, car le B18R n'a pas d'effet, ou une autre réponse antivirale médiée par JAK1 et JAK2 chez les macrophages diminue le taux d'infection de ces cellules par le virus Zika.

Pour vérifier si la modulation de l'infection observée est occasionnée par un autre type d'interféron que le type I, un anticorps neutralisant ciblant les interférons $\lambda 1$ et $\lambda 3$ a été utilisé. L'anticorps a été ajouté 24h avant l'infection et maintenu tout au long de l'expérience. Le surnageant a été prélevé à 3 jours post-infection et analysé.

Production virale dans les MDMs traités avec anti IFN-lambda

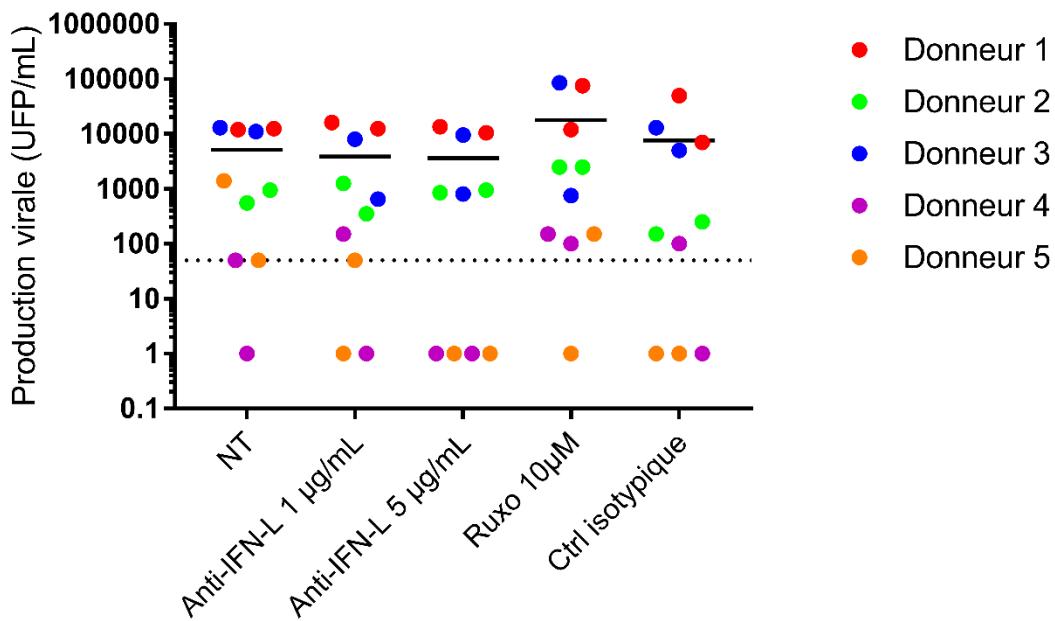


Figure 35 : Production virale dans les MDMs traités avec un anticorps ciblant les interférons $\lambda 1$ et $\lambda 3$.

La ligne pointillée représente la limite de détection de la méthode. Tous les points situés sous cette ligne représentent des puits dans lesquels aucune particule virale n'a été détectée. Chaque couleur représente un donneur différent. L'expérience a été effectuée en duplicita.

Aucune différence significative n'a été observée entre le contrôle isotypique et les cellules traitées avec l'anticorps neutralisant les interférons lambda. Une tendance à la hausse de la

production virale a été observée lors d'un traitement au ruxolitinib. Une grande variabilité entre les donneurs rend difficile l'interprétation des résultats, mais il semble peu probable que le ruxolitinib ait cet effet en modulant la réponse de l'interféron de type III.

En parallèle, des MDMs des mêmes donneurs ont été cultivés sur des lamelles, traités comme précédemment avec l'anticorps ciblant les interférons lambda et marqués pour être observé en microscopie suite à 7 jours d'incubation.

Taux d'infection des MDMs par le virus Zika traités avec un anti-IFN- λ

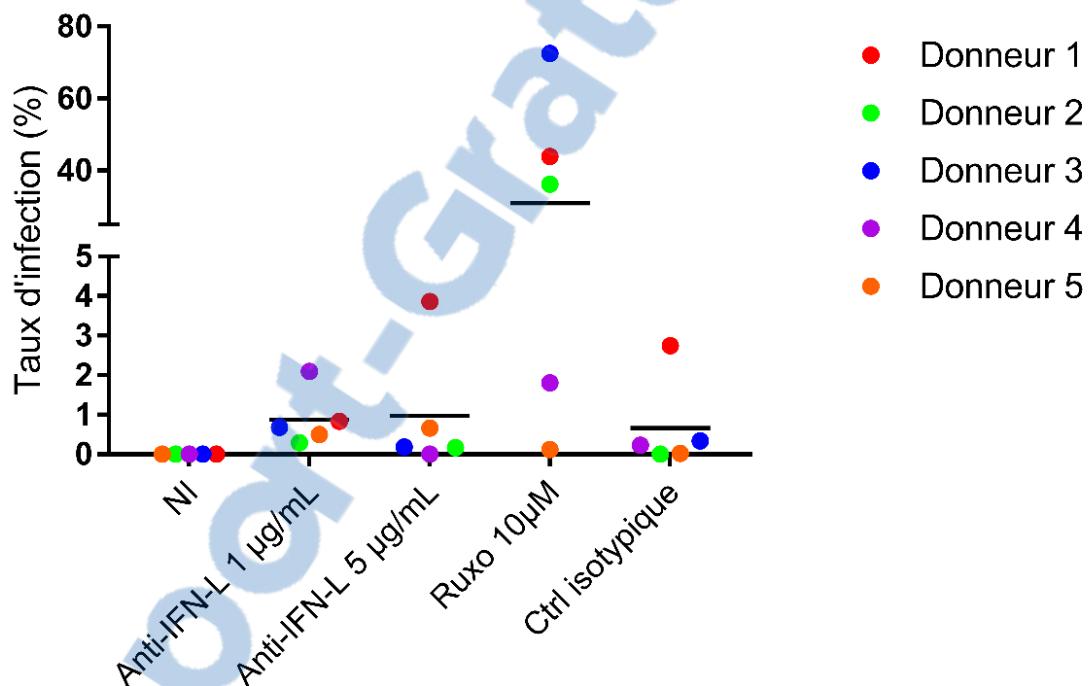


Figure 36 : Taux d'infection dans les MDMs traités avec un anticorps ciblant les interférons $\lambda 1$ et $\lambda 3$.

Les cellules de 5 donneurs différents ont été utilisées pour obtenir ces résultats. Les taux d'infection sont déterminés en divisant le nombre de cellules infectées sur le nombre de cellules totales.

Les résultats de cette expérience confirment ce qui a été obtenu précédemment au niveau de la production virale. Il n'y a pas de différence significative au niveau du taux d'infection du contrôle isotypique et des MDMs traités avec l'anticorps ciblant l'interféron lambda. Cependant, une forte augmentation du taux d'infection a été obtenue avec le ruxolitinib. Encore une fois, une grande variabilité entre les donneurs a été observée.

Dans le but de vérifier si la souche HS-2015-BA-01 pourrait profiter d'une absence de réponse interféron des MDMs pour les infecter, des cellules ont été traitées avec différentes concentrations de ruxolitinib et infectées par cette souche pendant 7 jours. Les surnageants ont été récoltés et titrés sur cellule VERO.

Production virale dans les MDMs infectés par la souche HS-2015-BA-01

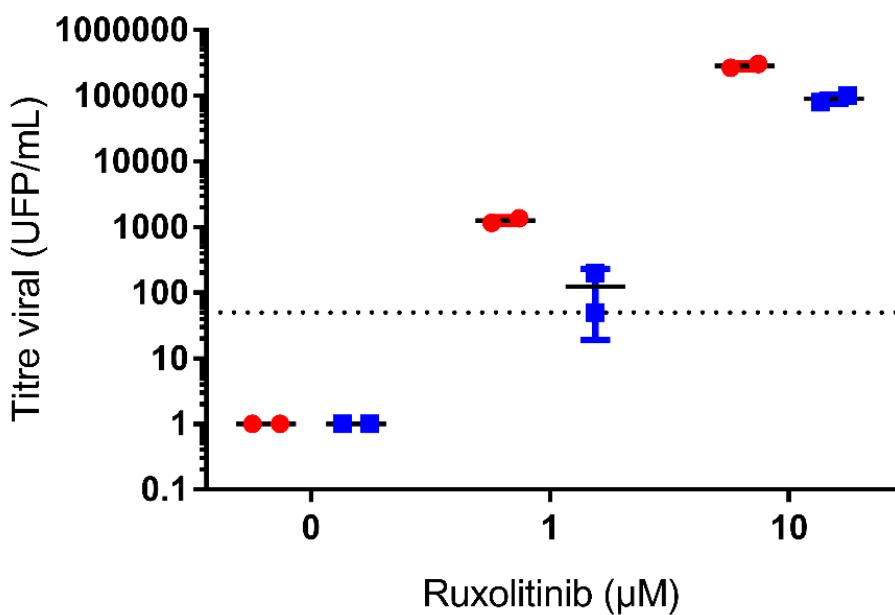


Figure 37 : Production virale de la souche HS-2015-BA-01 dans les MDMs en présence de différentes concentrations de ruxolitinib.

La ligne pointillée représente la limite de détection de la méthode. Tous les points situés sous cette ligne sont considérés comme des résultats négatifs, soit une absence de particule virale infectieuse dans le surnageant. Chaque couleur représente un donneur de cellules différent. L'expérience a été effectuée en duplicita.

Ce résultat démontre clairement que le ruxolitinib a un effet dépendant de sa concentration sur l'infection et la réPLICATION de la souche HS-2015-BA-01 dans les MDMs. En absence de ruxolitinib, aucune production virale n'est détectée ce qui concorde avec les résultats obtenus précédemment. Lors de cette expérience, une forte mortalité cellulaire a été observée dans les puits traités à 10 µM.

5. Discussion

5.1 Cellules susceptibles à l'infection

Lors des expériences d'infection de cellules immunitaires extraites du sang, il est apparu que seulement les macrophages étaient susceptibles à une infection par le virus Zika parmi celles étudiées. Les lymphocytes T CD4⁺ ne sont pas susceptibles à l'infection par le virus Zika dans des conditions *in vitro*, qu'ils soient activés ou non activés. L'absence de réplication d'ARN viral dans ces cellules peut s'expliquer par une absence de récepteurs nécessaire à l'infection ou par des facteurs de restriction virale protégeant la cellule contre le virus Zika qui sont exprimés dans les lymphocytes T CD4⁺. Ce résultat concorde aussi avec ce qu'un autre groupe a démontré dans des analyses d'infection de cellules de donneurs sains par le virus Zika. Les PBMCs du sang de ces personnes ont été extraits et infectés avec le virus Zika. Environ 6,8% des PBMCs étaient infectés. De ce nombre, une proportion de 0,1% des cellules infectées étaient des lymphocytes T. En ce qui concerne les cellules NK, ces cellules n'ont pas démontré de susceptibilité face au virus Zika. Ce résultat est également concordant avec la littérature. Les cellules NK représentaient environ 0,7% des PBMCs infectés¹¹⁵. Ces très faibles pourcentages démontrent que ces cellules ne sont pas des cibles privilégiées par le virus Zika.

En ce qui concerne les monocytes, qui lors des expériences *in vitro* ont démontré une absence de réplication d'ARN viral et de production de particules infectieuses, les résultats ne concordent pas avec ce qui a été obtenu par les autres groupes^{115,116}. La différente méthodologie utilisée peut expliquer cette différence avec la littérature. Tout d'abord, la souche virale utilisée n'est pas la même. L'infection a été effectuée directement sur les cellules purifiées et non sur les PBMCs fraîchement isolés comme dans la littérature. Cela pourrait avoir un impact sur les cytokines auxquels les cellules sont exposées et il y a également des interactions cellules-cellules qui peuvent avoir lieu lors de l'infection directement dans les PBMCs. Chez des personnes infectées par le virus Zika, il y a une plus grande proportion de monocytes CD14⁺CD16⁺ qui sont infectés par le virus. Cela favorise l'hypothèse que l'infection des cellules isolées ne représente pas la réalité *in vivo*.

5.1.1 Macrophages

Les macrophages sont les cellules qui ont démontré un certain potentiel d'infection tant par le niveau de réPLICATION de l'ARN viral que par leur capacité à produire des particules virales infectieuses. Ils sont également capables de supporter une infection virale sans effet significatif sur leur métabolisme et leur taux de survie. Cette résilience leur permet de produire des virions pendant une longue période. Les macrophages ont un taux d'infection relativement faible se situant entre 0,1% et 4% dépendant de la souche virale. Une grande variabilité est observée entre les cellules provenant de différents individus. En comparaison, les cellules souches neuronales ont un taux d'infection de 1,5% ; 8% ; 10% 20-80% dépendant des souches virales utilisées. Ces cellules ont une production virale après 4 jours d'infection de l'ordre de 10^5 à 10^7 TCID50/mL¹¹⁷. La TCID50 est la dose virale requise pour causer la mort de 50% d'une culture de cellule sensible à l'infection. Chez les astrocytes, le taux d'infection varie entre 40% et 75%, puis la production virale après 4 jours d'infection est autour de 10^7 TCID50/mL¹¹⁸. La production virale dans les macrophages est de l'ordre de 10^3 TCID50/mL après 3 jours d'infection, soit une quantité beaucoup plus faible que les autres types cellulaires. La souche HS-2015-BA-01 est la seule qui n'infecte pas les macrophages dans des conditions normales. La littérature démontre que les macrophages résidents du placenta, nommés cellules de Hofbauer peuvent être infectés par le virus Zika^{119,120}. L'infection de macrophages tissulaires est un signe encourageant quant à la validité du modèle des MDMs dans l'étude du virus Zika.

Les observations en microscopie à fluorescence démontrent une localisation périnucléaire des sites de réPLICATION virale. Cette localisation de la réPLICATION concorde avec la littérature qui spécifie que le virus Zika, comme de nombreux autres *Flavivirus* se réPILE dans le réticulum endoplasmique¹²¹. Il a également été observé que le virus Zika était à l'occasion responsable d'une vacuolisation souvent associée à la mort cellulaire dans d'autres types cellulaires¹²². Dans les macrophages, une telle vacuolisation n'a pas été observée et ces cellules ne démontrent pas d'effet cytopathique majeur. Cette différence avec des cellules plus sensibles n'est pas déterminée. Il pourrait s'agir d'une différence entre le niveau de réPLICATION virale qui est plus faible dans les macrophages que dans les astrocytes ou les cellules progénitrices neuronales qui les rendent moins susceptibles à la

destruction. Des facteurs de restriction ou la présence de facteurs de l'immunité innée en plus grande concentration dans le macrophage peuvent également participer à lui conférer sa résistance à la mort occasionnée par le virus Zika.

Dans les macrophages, les différentes souches virales étudiées ont des cinétiques de réPLICATION différentes. En règle générale, la production virale atteint un sommet entre 6 et 9 jours post-infection. La différence observée peut s'expliquer par des mutations qui peuvent jouer un rôle dans la cinétique de réPLICATION virale. Comme les virus ont été isolés sur une longue période, le virus a pu s'adapter à divers hôtes, ce qui peut modifier son efficacité à se réPLiquer chez l'homme. Ces mutations pourraient également expliquer en partie la variation observée dans le taux d'infection des macrophages avec différentes souches de virus Zika. Les adaptations à divers hôtes à travers le temps ont pu pousser le virus à élargir ou rétrécir ses récepteurs potentiels, sa capacité à inhiber l'immunité cellulaire, dont la réponse interféron et l'efficacité de sa machinerie de réPLICATION.

La souche HS-2015-BA-01 a été isolée au Brésil et présente diverses mutations uniques. Il a également été rapporté que cette souche était particulièrement plus pathogène que les autres dans différentes lignées cellulaires¹²³. Ces mutations rendent peut-être cette souche virale plus susceptible à une réponse interféron des cellules. Une autre piste pour expliquer cette différence peut être que cette souche virale est détectée plus facilement par les récepteurs intracellulaires de l'immunité innée. De nombreuses mutations sont observées dans la séquence protéique virale en comparaison avec la souche PL CAL (voir figure 38). Les mutations de la protéine NS5, qui est impliquée dans la réPLICATION virale et dans l'inhibition de la réponse interféron de la cellule infectée pourraient expliquer pourquoi cette souche ne peut infecter les MDMs.

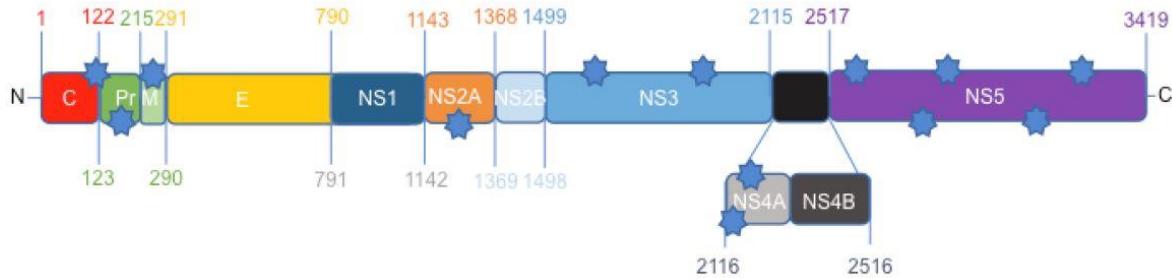


Figure 38 : Mutations de la souche HS-2015-BA-01 par rapport à la souche PLCAL

De nombreuses mutations sont observées dans les protéines non structurelles du virus, plus particulièrement dans la protéine NS5. Figure tirée de Alpuche-Lazcano, S. P. et al¹²³.

Lors de l'expérience d'infection des MDMs avec le ruxolitinib, une production virale a été détectée. Cependant, une grande mortalité a été observée lors de cette expérience dans les puits traités avec une forte concentration de ruxolitinib. Ces résultats pointent dans la direction d'une infection très cytotoxique avec cette souche virale dans les MDMs et probablement une forte réponse interféron. Comme le ruxolitinib inhibe la signalisation de la voie de l'interféron, cela suggère que le virus a perdu sa capacité à inhiber la réponse à l'interféron ou qu'il a perdu son efficacité pour échapper à la détection par les récepteurs intracellulaires de l'immunité innée.

5.2 Implication de l'autophagie sur l'infection

Les résultats obtenus dans les expériences de modulation de l'autophagie dans les MDMs pointent vers une implication de ce mécanisme dans le cycle de réPLICATION du virus Zika. L'autophagie serait nécessaire dans les macrophages pour le bon déroulement du cycle viral puisque l'ajout d'un activateur de l'autophagie augmente le niveau de production virale et l'inhibition du cycle de l'autophagie diminue la réPLICATION virale. Ce processus est également impliqué dans la réPLICATION du virus de la Dengue qui est un autre membre des *Flavivirus*¹²⁴. Des expériences dans d'autres types cellulaires, dont des fibroblastes et des cytotrophoblastes et des trophoblastes démontrent que l'autophagie a un effet positif sur la réPLICATION virale. Dans certains cas, une augmentation du flux de l'autophagie a même été détectée suite à l'infection par le virus Zika¹²⁵. Par contre, dans une lignée de cellule épithéliale de poumon l'infection par le virus Zika n'induit pas une augmentation du flux de

l'autophagie et la modulation pharmacologique de l'autophagie n'affecte pas le niveau de réPLICATION virale¹²⁶. Il y aurait donc des variations de l'importance de l'autophagie selon les types cellulaires. Les résultats obtenus dans les MDMs concernant l'importance de l'autophagie dans le cycle viral sont cohérents avec ceux de nombreux autres types cellulaires qui sont décrits dans la littérature.

Le rôle précis de l'autophagie dans le cycle viral du virus Zika reste à être élucidé. Le rôle de l'autophagie dans le cas d'une infection par le virus de la Dengue a déjà été étudié. Comme ces deux virus sont relativement semblables, il est possible de proposer que des événements similaires aient lieu dans le cycle viral des deux virus. Dans le cas du virus de la Dengue, l'autophagie pourrait inhiber l'apoptose, réguler la réponse antivirale innée et favoriser la production d'énergie de la cellule hôte pour créer plus de particules virales¹²⁷. L'inhibition de la réponse antivirale innée permet au virus de se répliquer plus aisément dans la cellule, ce qui améliore ses chances de compléter son cycle de réPLICATION. De plus, les membranes lipidiques pour faire les vésicules de l'autophagie proviennent du réticulum endoplasmique¹²⁸. Donc, les changements apportés à la membrane du réticulum endoplasmique peuvent faciliter la formation d'usine de réPLICATION virale. Comme le virus se réplique dans le réticulum endoplasmique, il est probable que la modulation à la hausse de l'autophagie affecte la capacité du virus à bourgeonner du réticulum endoplasmique et à quitter la cellule. Le virus a développé la capacité d'inhiber la dégradation du réticulum endoplasmique par l'autophagie pour éviter de subir les effets antiviraux de l'autophagie ciblant le réticulum endoplasmique¹²⁵.

5.3 Effet du virus Zika sur le VIH-1

Les effets du virus Zika sur le VIH-1 se sont avérés être indétectables dans les expériences de co-infection. La présence de virus Zika ne perturbe pas la capacité du VIH-1 à infecter les macrophages et il ne module pas la réPLICATION virale du VIH-1.

Ces résultats sont rassurants dans l'optique où l'élosion de virus Zika ne va pas aggraver l'épidémie de VIH-1 dans les pays d'Amérique du Sud. L'absence de différences peut être occasionnée par de nombreux phénomènes. Le premier étant le faible taux d'infection des

deux virus dans les macrophages. Le VIH-1 et le virus Zika infectent chacun les macrophages avec un taux d'infection qui dans la majorité des cas est inférieur à 5%. Les cellules co-infectées sont donc peu fréquentes, mais il peut y avoir des effets indirects causés par une production de facteurs solubles (ex. cytokines) de la part des cellules infectées.

Une seconde piste pour expliquer ces résultats se retrouve au niveau des différences entre les cycles viraux des virus en question. Comme décrit dans l'introduction de ce document, le virus Zika se réplique dans le cytoplasme, plus particulièrement dans le réticulum endoplasmique, puis complètera son cycle de réPLICATION en quittant la cellule par exocytose. Le VIH-1 en s'intégrant dans le génome des cellules infectées va se répliquer de façon différente du virus Zika. Ultimement, les particules virales du VIH-1 formées dans les cellules vont quitter la cellule par bourgeonnement. L'absence de similitude importante entre les virus diminue les interactions possibles entre eux.

Dernièrement, le VIH-1 est bien adapté à l'hôte humain. Ce virus possède des protéines accessoires et régulatrices qui lui permettent d'échapper à la réponse immunitaire qui pourrait être occasionnée par la présence du virus Zika.

5.4 Effet du VIH-1 sur le virus Zika

Les résultats obtenus démontrent que la présence d'une infection par le VIH-1 dans les macrophages module négativement l'infection de ces cellules par le virus Zika. Il serait intéressant de continuer les recherches et de vérifier si cette diminution est causée par une diminution du taux d'infection des macrophages par le virus Zika ou par une modulation de la production virale. Ces résultats de co-infection entre le VIH-1 et le virus Zika sont les premiers effectués à notre connaissance.

Il est déjà connu que les macrophages déploient une réponse interféron de type I suite à une infection par le VIH-1¹¹³. L'ajout de la protéine recombinante B18R, qui capture l'interféron de type I retrouvé dans le surnageant de culture lors de l'infection permet de retrouver un niveau de production virale similaire à celui sans présence de VIH-1. C'est

donc la production d'interféron de type I par les macrophages infectés par le VIH-1 avant l'infection par le virus Zika qui occasionne cette modulation négative de la production virale dans le cadre des co-infections entre le VIH-1 et le virus Zika. Le virus Zika peut inhiber la réponse interféron de type I dans les cellules infectées par la dégradation de STAT2⁸⁹. Cette capacité du virus ne lui est donc d'aucune utilité dans ce cas, car la réponse interféron est déjà enclenché et ses effets antiviraux activés lorsque le virus va pénétrer dans les cellules. La réponse interféron déjà activée va empêcher la cellule d'être infectée par le virus Zika, mais dans le cas où une cellule infectée serait stimulée par l'interféron de type I, le virus inhiberait cette réponse et continuerait d'infecter la cellule¹²⁹.

5.5 Rôle de l'interféron dans l'infection

Les expériences avec le B18R démontrent le caractère important de la réponse interféron de type I dans le cadre de l'infection des macrophages par le virus Zika. Le virus Zika étant très sensible à ce type d'interféron comme démontré dans la littérature⁵³ et dans nos résultats, il a été envisagé d'élargir les recherches pour vérifier l'effet des réponses interféron de type I, II et III à l'aide du ruxolitinib dans les macrophages.

Nos résultats démontrent qu'en présence de ruxolitinib, le taux d'infection des cellules est augmenté de façon dose-dépendante. D'autres expériences avec le B18R ont confirmé que le taux d'infection n'augmentait pas par rapport aux cellules non traitées (voir figure 31). L'augmentation du taux d'infection serait donc possiblement reliée à l'interféron de type II ou III que le ruxolitinib inhibe de plus que le B18R. Cependant, le ruxolitinib en inhibant JAK1 et JAK2 peut altérer la signalisation de nombreuses cytokines en plus des interférons¹³⁰. Il se pourrait alors que d'autres molécules soient impliquées dans cette susceptibilité accrue lors du traitement avec le ruxolitinib. Nos résultats obtenus avec un anticorps neutralisant l'interféron lambda dans les surnageants démontrent que la modulation du taux d'infection observé n'est pas dépendant de la réponse interféron $\lambda 1$ et $\lambda 3$. Un groupe de recherche a analysé l'impact de l'interféron de type II sur la réPLICATION du virus Zika et les résultats prouvent que l'interféron gamma augmenterait le niveau d'ARN viral dans des lignées de glioblastome et de choriocarcinome¹³¹. Il apparait donc peu probable que l'interféron de type II permettent d'augmenter le taux d'infection des

macrophages. Tous ces résultats suggèrent donc que la modulation observée lors du traitement avec le ruxolitinib dépendrait d'une autre voie que celle de l'interféron.

Un autre groupe a démontré l'implication du ruxolitinib et de la voie JAK-STAT dans l'infection par le virus Zika dans les cellules Hofbauer, les trophoblastes et les cellules de neuroblastome¹³². Des mécanismes similaires seraient donc utilisés dans différents types cellulaires. Nos résultats dans les MDMs vont dans le même sens que ceux de ce groupe.

6. Conclusion

En conclusion, ce projet avait comme but principal d'acquérir de nouvelles informations sur les cibles potentielles du virus Zika, d'approfondir les connaissances sur les mécanismes cellulaires employés lors de la réPLICATION virale et de chercher la présence d'interactions entre ce virus et le VIH-1 dans les cellules susceptibles d'être co-infectées.

De nombreuses cellules peuvent être infectées par le virus Zika, dont les macrophages. Les mécanismes cellulaires impliqués dans la réPLICATION virale sont partiellement connus et impliqueraient l'autophagie dans les macrophages. Dans le contexte de co-infection dans les MDMs, la présence du virus Zika ne perturbe pas le VIH-1. Cependant, une infection préalable par le VIH-1 diminue la capacité du virus Zika à infecter les macrophages à cause d'une réponse à l'interféron de type I produit par les macrophages infectés par le VIH-1. Des cytokines différentes des interférons pourraient être impliquées dans la résistance des macrophages à l'infection par le virus Zika.

Ce projet a donc permis de mieux connaître les cibles du virus Zika, les mécanismes impliqués dans la réPLICATION du virus dans les macrophages et d'avoir de l'information pertinente sur l'effet d'une co-infection entre le virus Zika et le VIH-1. Pour approfondir nos connaissances, il pourrait être intéressant d'étudier davantage le rôle de l'autophagie dans le cycle viral ainsi que de trouver par quel moyen le ruxolitinib permet d'augmenter le taux d'infection des macrophages par le virus Zika. Cela permettrait peut-être de trouver un traitement pour contrôler l'infection et protéger les fœtus de ce virus ou les personnes infectées présentant de graves symptômes. De plus, les récepteurs du virus Zika ne sont pas connus avec certitude chez le macrophage. Il serait pertinent d'approfondir les recherches pour expliquer la différence du taux d'infection et de la résistance aux effets cytopathiques entre les macrophages et les cellules souches neuronales. L'implication des récepteurs intracellulaires de l'immunité innée pourrait être en cause. Pour sortir du contexte *in vitro*, il pourrait être intéressant d'étudier si les macrophages sont également susceptibles à l'infection *in vivo*. Finalement, le rôle des macrophages dans la dissémination du virus dans les différents organes cibles du virus reste à être élucidé.

Bibliographie

- 1 Dick, G. W. A., Kitchen, S. F. & Haddow, A. J. Zika Virus .1. Isolations and Serological Specificity. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509-520, doi:10.1016/0035-9203(52)90042-4 (1952).
- 2 Dick, G. W. A. Zika Virus .2. Pathogenicity and Physical Properties. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 521-534, doi:10.1016/0035-9203(52)90043-6 (1952).
- 3 Dick, G. W. A. Epidemiological Notes on Some Viruses Isolated in Uganda (Yellow Fever, Rift Valley Fever, Bwamba Fever, West Nile, Mengo, Semliki Forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda-s and Zika Viruses). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **47**, 13-43, doi:10.1016/0035-9203(53)90021-2 (1953).
- 4 Smithburn, K. C. Neutralizing Antibodies Against Certain Recently Isolated Viruses in the Sera of Human Beings Residing in East Africa. *J. Immunol.* **69**, 223-234 (1952).
- 5 Smithburn, K. C., Kerr, J. A. & Gatne, P. B. Neutralizing Antibodies Against Certain Viruses in the Sera of Residents of India. *J. Immunol.* **72**, 248-257 (1954).
- 6 Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S. & Dye, C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization* **94**, 675-686C, doi:10.2471/BLT.16.171082 (2016).
- 7 Duffy, M. R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536-2543, doi:10.1056/NEJMoa0805715 (2009).
- 8 Organization, P. A. H. Zika - Epidemiological Report Brazil, 25 septembre. (PAHO/WHO, Washington, D.C., 2017).
- 9 Organization, P. A. H. *Regional Zika Epidemiological Update (Americas)* August 25, 2017, <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599%3Aregional-zika-epidemiological-update-americas&catid=8424%3Acontents&Itemid=41691&lang=en> (2017).
- 10 Haddow, A. J., Williams, M. C., Woodall, J. P., Simpson, D. I. H. & Goma, L. K. H. Twelve isolations of Zika virus from Aedes (Stegomyia) africanus (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization* **31**, 57-69 (1964).
- 11 Wong, P.-S. J., Li, M.-z. I., Chong, C.-S., Ng, L.-C. & Tan, C.-H. Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**, e2348, doi:10.1371/journal.pntd.0002348 (2013).
- 12 Hall-Mendelin, S. *et al.* Assessment of Local Mosquito Species Incriminates Aedes aegypti as the Potential Vector of Zika Virus in Australia. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **10**, e0004959, doi:10.1371/journal.pntd.0004959 (2016).
- 13 Diagne, C. T. *et al.* Potential of selected Senegalese Aedes spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infectious Diseases* **15**, 492, doi:10.1186/s12879-015-1231-2 (2015).
- 14 Howard, C. R. Aedes mosquitoes and Zika virus infection: an A to Z of emergence? *Emerg. Microbes Infect.* **5**, e16, doi:10.1038/emi.2016.37 (2016).
- 15 Foy, B. D. *et al.* Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado,

- USA. *Emerg. Infect. Dis* **17**, 880-882, doi:10.3201/eid1705.101939 (2011).
- 16 D'Ortenzio, E., Matheron, S. & Yazdanpanah, Y. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2195-2198, doi:10.1056/NEJMc1604449 (2016).
- 17 Hills, S. L. *et al.* Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR-Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 215-216, doi:10.15585/mmwr.mm6508e2 (2016).
- 18 Musso, D. *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg. Infect. Dis* **21**, 359-361, doi:10.3201/eid2102.141363 (2015).
- 19 Murray, K. O. *et al.* Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. *Emerg. Infect. Dis* **23**, 99-101, doi:10.3201/eid2301.161394 (2017).
- 20 Davidson, A., Slavinski, S., Komoto, K., Rakeman, J. & Weiss, D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. *MMWR: Morbidity & Mortality Weekly Report* **65**, 716-717, doi:10.15585/mmwr.mm6528e2 (2016).
- 21 Deckard, D. T. *et al.* Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - Texas, January 2016. *MMWR-Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 372-374, doi:10.15585/mmwr.mm6514a3 (2016).
- 22 Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M. & Musso, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* **19**, 13-16, doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.13.20751 (2014).
- 23 Dupont-Rouzeyrol, M., Biron, A., O'Connor, O., Huguon, E. & Descloux, E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet* **387**, 1051-1051, doi:10.1016/s0140-6736(16)00624-3 (2016).
- 24 Musso, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance* **19**, 6-8, doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.14.20761 (2014).
- 25 Grischott, F., Puhan, M., Hatz, C. & Schlagenhauf, P. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. *Travel Med. Infect. Dis.* **14**, 313-330, doi:10.1016/j.tmaid.2016.07.002 (2016).
- 26 Lessler, J. *et al.* Times to key events in Zika virus infection and implications for blood donation: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization* **94**, 841-849, doi:10.2471/BLT.16.174540 (2016).
- 27 Ladhani, S. N., O'Connor, C., Kirkbride, H., Brooks, T. & Morgan, D. Outbreak of Zika virus disease in the Americas and the association with microcephaly, congenital malformations and Guillain-Barre syndrome. *Arch. Dis. Child.* **101**, 600-602, doi:10.1136/archdischild-2016-310590 (2016).
- 28 Oehler, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* **19**, 20720, doi:doi:<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720> (2014).
- 29 Willison, H. J., Jacobs, B. C. & van Doorn, P. A. Guillain-Barre syndrome. *Lancet* **388**, 717-727, doi:10.1016/s0140-6736(16)00339-1 (2016).
- 30 Araujo, A. Q. C., Silva, M. T. T. & Araujo, A. Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain* **139**, 2122-2130, doi:10.1093/brain/aww158 (2016).

- 31 Walling, A. D. & Dickson, G. Guillain-Barre syndrome. *American family physician* **87**, 191-197 (2013).
- 32 Watrin, L. *et al.* Guillain-Barre Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. *Medicine (Baltimore)* **95**, 8, doi:10.1097/md.0000000000003257 (2016).
- 33 Cao-Lormeau, V. M. *et al.* Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* **387**, 1531-1539, doi:10.1016/s0140-6736(16)00562-6 (2016).
- 34 Mecharles, S. *et al.* Acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet* **387**, 1481-1481, doi:10.1016/s0140-6736(16)00644-9 (2016).
- 35 Carteaux, G. *et al.* Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1595-1597, doi:10.1056/NEJMc1602964 (2016).
- 36 Mlakar, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **374**, 951-958, doi:10.1056/NEJMoa1600651 (2016).
- 37 Woods, C. G. & Parker, A. Investigating microcephaly. *Arch. Dis. Child.* **98**, 707 (2013).
- 38 Cauchemez, S. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–2015: a retrospective study. *Lancet (London, England)* **387**, 2125-2132, doi:10.1016/S0140-6736(16)00651-6 (2016).
- 39 Satterfield-Nash, A. *et al.* Health and Development at Age 19-24 Months of 19 Children Who Were Born with Microcephaly and Laboratory Evidence of Congenital Zika Virus Infection During the 2015 Zika Virus Outbreak - Brazil, 2017. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **66**, 1347-1351, doi:10.15585/mmwr.mm6649a2 (2017).
- 40 Melo, A. S. O. *et al.* Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **47**, 6-7, doi:10.1002/uog.15831 (2016).
- 41 Ventura, C. V. *et al.* Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq. Bras. Oftalmol.* **79**, 1-3, doi:10.5935/0004-2749.20160002 (2016).
- 42 Chibueze, E. C. *et al.* Zika virus infection in pregnancy: a systematic review of disease course and complications. *Reproductive Health* **14**, 28, doi:10.1186/s12978-017-0285-6 (2017).
- 43 Kuno, G. & Chang, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* **152**, 687-696, doi:10.1007/s00705-006-0903-z (2007).
- 44 Zhu, Z. *et al.* Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerg. Microbes Infect.* **5**, 11, doi:10.1038/emi.2016.48 (2016).
- 45 Pijlman, G. P. *et al.* A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host & Microbe* **4**, 579-591, doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.007> (2008).
- 46 Donald, C. L. *et al.* Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **10**, e0005048, doi:10.1371/journal.pntd.0005048 (2016).
- 47 Clarke, B. D., Roby, J. A., Slonchak, A. & Khromykh, A. A. Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Research* **206**, 53-

- 61, doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.026> (2015).
- 48 Cox, B. D., Stanton, R. A. & Schinazi, R. F. Predicting Zika virus structural biology: Challenges and opportunities for intervention. *Antiviral chemistry & chemotherapy* **24**, 118-126, doi:10.1177/2040206616653873 (2015).
- 49 Mittal, R. *et al.* Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **7**, 486, doi:10.3389/fcimb.2017.00486 (2017).
- 50 Bollati, M. *et al.* Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research* **87**, 125-148, doi:10.1016/j.antiviral.2009.11.009 (2010).
- 51 Fernandez-Garcia, M.-D., Mazzon, M., Jacobs, M. & Amara, A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe* **5**, 318-328, doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001> (2009).
- 52 ViralZone-ExPASy. *Zika virus*, <https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species> (
- 53 Hamel, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* **89**, 8880-8896, doi:10.1128/jvi.00354-15 (2015).
- 54 Prasad, V. M. *et al.* Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nature structural & molecular biology* **24**, 184-186, doi:10.1038/nsmb.3352 (2017).
- 55 Sirohi, D. & Kuhn, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *The Journal of infectious diseases* **216**, S935-s944, doi:10.1093/infdis/jix515 (2017).
- 56 Tang, H. *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell stem cell* **18**, 587-590, doi:10.1016/j.stem.2016.02.016 (2016).
- 57 Garcez, P. P. *et al.* Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science (New York, N.Y.)* **352**, 816-818, doi:10.1126/science.aaf6116 (2016).
- 58 Tabata, T. *et al.* Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* **20**, 155-166, doi:10.1016/j.chom.2016.07.002 (2016).
- 59 Miner, J. J. *et al.* Zika virus infection in mice causes pan-uveitis with shedding of virus in tears. *Cell reports* **16**, 3208-3218, doi:10.1016/j.celrep.2016.08.079 (2016).
- 60 Coffey, L. L. *et al.* Zika Virus Tissue and Blood Compartmentalization in Acute Infection of Rhesus Macaques. *PloS one* **12**, e0171148, doi:10.1371/journal.pone.0171148 (2017).
- 61 Bayless, N. L., Greenberg, R. S., Swigut, T., Wysocka, J. & Blish, C. A. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe* **20**, 423-428, doi:10.1016/j.chom.2016.09.006 (2016).
- 62 Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (Elsevier/Saunders, Philadelphia, 2014).
- 63 Akira, S., Bauer, S. & Hartmann, G. (Springer, Berlin, 2008).
- 64 Ginhoux, F. & Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439-449, doi:10.1016/j.jimmuni.2016.02.024 (2016).
- 65 Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* **41**, 21-35, doi:10.1016/j.jimmuni.2014.06.013 (2014).
- 66 Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* **14**, 986-995, doi:10.1038/ni.2705 (2013).

- 67 Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology* **79**, 541-566, doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034339 (2017).
- 68 Tarique, A. A. *et al.* Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **53**, 676-688, doi:10.1165/rcmb.2015-0012OC (2015).
- 69 Verreck, F. A. W. *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4560-4565, doi:10.1073/pnas.0400983101 (2004).
- 70 Johnson, A. R., Justin Milner, J. & Makowski, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunological Reviews* **249**, 218-238, doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01151.x (2012).
- 71 Kelly, B. & O'Neill, L. A. J. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Research* **25**, 771-784, doi:10.1038/cr.2015.68 (2015).
- 72 Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* **6**, 13, doi:10.12703/P6-13 (2014).
- 73 Ferrante, C. J. & Leibovich, S. J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Advances in Wound Care* **1**, 10-16, doi:10.1089/wound.2011.0307 (2012).
- 74 Flanagan, R. S., Jaumouille, V. & Grinstein, S. The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology* **7**, 61-98, doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445 (2012).
- 75 Hirayama, D., Iida, T. & Nakase, H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 92 (2018).
- 76 Dunlop, E. A. & Tee, A. R. mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Seminars in cell & developmental biology* **36**, 121-129, doi:10.1016/j.semcdb.2014.08.006 (2014).
- 77 Rey-Jurado, E., Riedel, C. A., Gonzalez, P. A., Bueno, S. M. & Kalergis, A. M. Contribution of autophagy to antiviral immunity. *FEBS letters* **589**, 3461-3470, doi:10.1016/j.febslet.2015.07.047 (2015).
- 78 Virgin, H. W. & Levine, B. Autophagy genes in immunity. *Nature immunology* **10**, 461-470, doi:10.1038/ni.1726 (2009).
- 79 Richetta, C. & Faure, M. Autophagy in antiviral innate immunity. *Cellular microbiology* **15**, 368-376, doi:10.1111/cmi.12043 (2013).
- 80 Deretic, V. & Levine, B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. *Cell host & microbe* **5**, 527-549, doi:10.1016/j.chom.2009.05.016 (2009).
- 81 Pitha, P. M. (Springer, Berlin, 2007).
- 82 Meager, A. (Wiley-VCH, Weinheim, 2006).
- 83 Ivashkiv, L. B. & Donlin, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology* **14**, 36-49, doi:10.1038/nri3581 (2014).
- 84 Rauch, I., Müller, M. & Decker, T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAK-STAT* **2**, e23820, doi:10.4161/jkst.23820 (2013).
- 85 Green, D. S., Young, H. A. & Valencia, J. C. Current prospects of type II interferon gamma signaling and autoimmunity. *The Journal of biological chemistry* **292**, 13925-13933, doi:10.1074/jbc.R116.774745 (2017).

- 86 Hemann, E. A., Gale, M., Jr. & Savan, R. Interferon Lambda Genetics and Biology in Regulation of Viral Control. *Frontiers in immunology* **8**, 1707, doi:10.3389/fimmu.2017.01707 (2017).
- 87 Lindqvist, R. *et al.* Fast type I interferon response protects astrocytes from flavivirus infection and virus-induced cytopathic effects. *Journal of neuroinflammation* **13**, 277, doi:10.1186/s12974-016-0748-7 (2016).
- 88 Best, S. M. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. *J. Virol.* **91**, e01970-01916, doi:10.1128/JVI.01970-16 (2017).
- 89 Grant, A. *et al.* Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* **19**, 882-890, doi:10.1016/j.chom.2016.05.009 (2016).
- 90 Donald, C. L. *et al.* Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0005048, doi:10.1371/journal.pntd.0005048 (2016).
- 91 Kumar, A. *et al.* Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO reports* **17**, 1766-1775, doi:10.15252/embr.201642627 (2016).
- 92 Bowen, J. R. *et al.* Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. *PLoS pathogens* **13**, e1006164, doi:10.1371/journal.ppat.1006164 (2017).
- 93 Katsoulidis, E., Kaur, S. & Platanias, L. C. Dereulation of Interferon Signaling in Malignant Cells. *Pharmaceuticals* **3**, 406-418, doi:10.3390/ph3020406 (2010).
- 94 ONUSIDA. *Fiche d'information — Dernières statistiques sur l'état de l'épidémie de sida*, <<http://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet>> (2017).
- 95 CATIE. *L'épidémiologie du VIH au Canada*, <<http://www.catie.ca/fr/feuillets-info/epidemiologie/epidemiologie-vih-canada>> (2017).
- 96 Klaver, B. & Berkhout, B. Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**, 3830-3840 (1994).
- 97 Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007).
- 98 Engelman, A. & Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews. Microbiology* **10**, 279-290, doi:10.1038/nrmicro2747 (2012).
- 99 Robinson, H. L. New hope for an AIDS vaccine. *Nature reviews. Immunology* **2**, 239-250, doi:10.1038/nri776 (2002).
- 100 CATIE. *Vivre avec la co-infection VIH/hépatite C*, <<http://www.catie.ca/sites/default/files/co-infection-2016-fr.pdf>> (2016).
- 101 Andreani, G., Lodge, R., Richard, D. & Tremblay, M. J. Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV. *Current opinion in HIV and AIDS* **7**, 276-282, doi:10.1097/COH.0b013e32835211e9 (2012).
- 102 Bruchfeld, J., Correia-Neves, M. & Kallenius, G. Tuberculosis and HIV Coinfection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **5**, a017871, doi:10.1101/cshperspect.a017871 (2015).
- 103 Chang, C. C. *et al.* HIV and co-infections. *Immunol Rev* **254**, 114-142, doi:10.1111/imr.12063 (2013).
- 104 Zhao, C., Papadopoulou, B. & Tremblay, M. J. Leishmania infantum enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **113**, 81-88, doi:10.1016/j.clim.2004.06.003 (2004).

- 105 AVERT. *HIV and AIDS in Latin America and the Caribbean*,
<<https://www.avert.org/professionals/hiv-around-world/latin-america>> (2017).
- 106 Baz, M., Goyette, N., Griffin, B. D., Kobinger, G. P. & Boivin, G. In vitro susceptibility of geographically and temporally distinct Zika viruses to favipiravir and ribavirin. *Antiviral therapy* **22**, 613-618, doi:10.3851/imp3180 (2017).
- 107 Teixeira, M., Herman, B.D., Bassit, L.C. and Schinazi, R.F. *Zika virus isolate HS-2015-BA-01* <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX520666.1>> (2016).
- 108 Emeny, J. M. & Morgan, M. J. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *The Journal of general virology* **43**, 247-252, doi:10.1099/0022-1317-43-1-247 (1979).
- 109 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 110 Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**, 323-335, doi:10.1038/nature09782 (2011).
- 111 InvivoGen. *Autophagy Inducers*, <<http://www.invivogen.com/autophagy-inducers>> (2017).
- 112 Liu, J. *et al.* Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* **147**, 223-234, doi:10.1016/j.cell.2011.08.037 (2011).
- 113 Decalf, J. *et al.* Sensing of HIV-1 Entry Triggers a Type I Interferon Response in Human Primary Macrophages. *J. Virol.* **91**, e00147-00117, doi:10.1128/JVI.00147-17 (2017).
- 114 Kyei, G. B. *et al.* Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *The Journal of Cell Biology* **186**, 255-268, doi:10.1083/jcb.200903070 (2009).
- 115 Michlmayr, D., Andrade, P., Gonzalez, K., Balmaseda, A. & Harris, E. 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**, 1462-1470, doi:10.1038/s41564-017-0035-0 (2017).
- 116 Foo, S. S. *et al.* Asian Zika virus strains target CD14(+) blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nature microbiology* **2**, 1558-1570, doi:10.1038/s41564-017-0016-3 (2017).
- 117 McGrath, E. L. *et al.* Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. *Stem Cell Reports* **8**, 715-727, doi:10.1016/j.stemcr.2017.01.008 (2017).
- 118 Simonin, Y. *et al.* Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine* **12**, 161-169, doi:10.1016/j.ebiom.2016.09.020 (2016).
- 119 de Noronha, L., Zanluca, C., Azevedo, M. L. V., Luz, K. G. & dos Santos, C. N. D. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **111**, 287-293, doi:10.1590/0074-02760160085 (2016).
- 120 Quicke, K. M. *et al.* Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell host & microbe* **20**, 83-90, doi:10.1016/j.chom.2016.05.015 (2016).
- 121 Blázquez, A.-B., Escribano-Romero, E., Merino-Ramos, T., Saiz, J.-C. & Martín-Acebes, M. A. Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded

- protein response and autophagy. *Frontiers in Microbiology* **5**, 266, doi:10.3389/fmicb.2014.00266 (2014).
- 122 Monel, B. *et al.* Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *The EMBO journal* **36**, 1653-1668, doi:10.15252/embj.201695597 (2017).
- 123 Alpuche-Lazcano, S. P. *et al.* Higher Cytopathic Effects of a Zika Virus Brazilian Isolate from Bahia Compared to a Canadian-Imported Thai Strain. *Viruses* **10**, 53, doi:10.3390/v10020053 (2018).
- 124 Lee, Y. R. *et al.* Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology* **374**, 240-248, doi:10.1016/j.virol.2008.02.016 (2008).
- 125 Chiramel, A. I. & Best, S. M. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. *Virus Research*, doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.006> (2017).
- 126 Frumence, E. *et al.* The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN-beta production and apoptosis induction. *Virology* **493**, 217-226, doi:10.1016/j.virol.2016.03.006 (2016).
- 127 Heaton, N. S. & Randall, G. Dengue Virus and Autophagy. *Viruses* **3**, 1332-1341, doi:10.3390/v3081332 (2011).
- 128 Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 759-774, doi:10.1038/nrm3696 (2013).
- 129 Kumar, A. *et al.* Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO reports* **17**, 1766-1775, doi:10.15252/embr.201642627 (2016).
- 130 Murray, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 2623-2629 (2007).
- 131 Chaudhary, V. *et al.* Selective Activation of Type II Interferon Signaling by Zika Virus NS5 Protein. *J Virol* **91**, doi:10.1128/jvi.00163-17 (2017).
- 132 Gavegnano, C. *et al.* Jak Inhibitors Modulate Production of Replication-Competent Zika Virus in Human Hofbauer, Trophoblasts, and Neuroblastoma cells. *Pathogens & immunity* **2**, 199-218, doi:10.20411/pai.v2i2.190 (2017).