THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale n°168 – Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche Pathogénèse et Contrôle des Infections Chroniques et Emergentes (PCCEI) – UMR 1058

Infection de la barrière hémato-encéphalique par différents virus émergents, neuroinflammation et contexte de circulation

Présentée par Orianne CONSTANT
Le 18 novembre 2022

Sous la direction de Yannick SIMONIN et Sara SALINAS

Devant le jury composé de

Pierre-Yves LOZACH, Directeur de recherche, INRAE	Président de jury
Pierre-Emmanuel CECCALDI, Professeur, Université Paris Cité	Rapporteur
Nolwenn DHEILLY, Directrice de recherche, ANSES	Rapportrice
Maxime RATINIER, Maître de conférences, UMR 754, IVPC, EPHE, INRAE	Examinateur
Yannick SIMONIN, Maître de conférences, Inserm UMR 1058, Université de Montpellier	Directeur de thèse
Sara SALINAS, Chargée de recherche, Inserm UMR 1058	Co-Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier les membres de ce jury, aux rapporteurs, Dr. Nolwenn Dheilly et Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi, merci d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon manuscrit. Merci aussi aux Dr. Pierre-Yves Lozach et Dr. Maxime Ratinier pour avoir accepté d'être évaluateurs de ce travail. J'espère que ce manuscrit sera assez agréable à lire. J'aimerai aussi remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Dr. Lauriane Ulmann et Dr. Jean-Luc Battini, merci pour avoir suivi ce projet et pour vos conseils.

A mes directeurs de thèse, Sara et Yannick, merci pour m'avoir donné cette opportunité, après avoir passé 8 mois dans votre équipe à mes débuts dans la recherche, vous m'avez fait confiance pour la réalisation de ce (ces !) projet. Merci pour m'avoir permis de réaliser une thèse débouchant sur 7 publications, une présentation internationale, des projets de vulgarisation avec la fête de la Science et le concours MT180, peu d'étudiants ont cette chance et je vous en suis très reconnaissante !

Sara, merci pour ta gentillesse, ton soutient, ta disponibilité, et tes idées de projet. Merci d'avoir partagé ton amour pour les cellules et le cerveau, pour m'avoir permis d'apprendre de nouvelles techniques, pour m'avoir poussé à faire cette revue, et pour les moments de team building !

Yannick, je me rappelle encore mon 1er stage en 2016, depuis j'ai pu travailler sur les virus Zika, Usutu, West-Nile et SARS-CoV-2, j'ai pu apprendre de très nombreuses méthodes d'études, j'ai pu devenir autonome et prendre un peu plus confiance en moi. Merci beaucoup pour toutes les opportunités que tu m'as données et tout ce que j'ai pu accomplir. Merci à Caroline pour son aide moléculaire mais surtout pour m'avoir laissé mettre un 1er pied dans la recherche !

John un grand merci pour TOUTE ton aide, sans toi cette thèse n'aurait pas pu fonctionner c'est sûre ! Merci pour les quelques milliers de plaques de titrages et séroneutralisations, les coups de main au CIRAD, la prise en charge des animaux, tout le support matériel et humain au labo, les séances psy, et les concerts… ! Je te souhaite le meilleur pour la suite, dans la recherche, dans la musique, mais surtout avec ta famille !

Merci à Bachirou pour le soutient dans notre fin de thèse et pour avoir partagé un peu de ta culture Burkinabé, j'attends ton invitation pour ce cours sur les arbovirus !

Merci à Jordan pour tes coups de pouces, ravie d'avoir vécue ta victoire au concours MT180, tu l'as bien mérité ! Et surtout bon courage pour la suite de ta thèse, je suis sûre que tout se passera bien pour toi.

Le bureau des étudiants est bien vide au moment où j'écris ces lignes, mais je n'oublie pas tous ceux qui y sont passés, Marion, merci pour m'avoir permis de me remettre dans le bain après 1 année loin des paillasses, merci aussi pour ton aide et ta motivation, travailler avec toi fût très enrichissant ! Constance, une des dernières représentantes de cette époque, merci pour ton soutient, nos petites discussions et les fiches de rédaction. Mélusine merci aussi pour ton soutient pendant tout ce temps où nous étions voisines de bureau, les pharmaciennes de l'unité ! Merci à Audrey, tu étais là à mes débuts puis quand je suis revenue tu avais 3 enfants et maintenant une thèse, bravo à toi ! Merci à Amélie pour ta gentillesse et ton soutient, c'est toujours un plaisir de te voir passer au labo. Aux stagiaires qui ont écumé les chaises de ce bureau, à Grégoire, Jason, Jérémie, Justine, Laura, Mathilde, Mélissa et Sofia, merci pour votre bonne humeur, ce fût parfois compliqué d'être « référente »,

j'espère toutefois vous avoir motivé à continuer dans une voie qui vous comblera. Un merci à tous les autres étudiants qui sont passés par ce bureau et notamment à Souleymane qui m'aura tenue compagnie pendant cet été de rédaction, j'espère que tout se passera bien pour la suite de ta thèse.

Un grand merci à tous les membres de l'unité 1058, aux directeurs de l'unité : Pr Philippe Vande Perre, Dr Nicolas Nagot et Dr Jean-Pierre Molès ; merci pour m'avoir accueillie dans votre unité ; aux gestionnaires, merci à Vanessa, Marion, Sandrine et Valérie pour leur aide administrative sans faille; aux ingés Ségolène, Karine (merci pour ton aide avec les multiplex en particulier !), et Anne-So (désolée j'abandonne mon poste pour les tâches communes ! Bon courage avec ta thèse…) ; aux bureaux des stats, data managers et chefs de projets, un merci tout particulier à Roselyne (chez qui j'ai pu m'évader le temps de quelques jours avec l'impression d'être en vacances) ; merci à vous tous pour avoir fait du labo un endroit dans lequel j'ai aimé travailler !

J'aimerai aussi remercier toutes les personnes rencontrées au CIRAD et au CEMIPAI, qui m'ont permis de découvrir et de travailler dans deux P3 totalement différents. Tous ceux que j'ai croisés dans le couloir Astre, merci d'avoir pris le DATI pour que je puisse faire mes manips. Merci à Christine, pour avoir pris le temps de me montrer comment travailler avec le SARS et les coups de main avec ce projet, et à ceux croiser au CEMIPAI, c'était un plaisir de travailler chez vous !

Merci aux membres de l'Everest pour nos réunions, sources d'inspiration, merci à Fabien, Nathalie et Sébastien, et spécialement pour toutes nos manips cellules immunes et toute votre aide dans ces projets : merci à Ghizlane et Marie-France (je me souviens de notre découverte du 1er cas de Usutu, on n'y croyait pas, et pourtant on a finalement toutes les deux fait nos thèses sur ce virus)!

Un énorme merci à mes amis depuis maintenant 9 ans, Benjamin, Mathilde et Albéric, Thibaud et Arthur, Fanny et Arnaud, et Quentin !! Après avoir usé les amphis de Pharma, participé au WEI, bu des bières à la Maison, bu des plateaux au Scarabée, couru la Ruée des Fadas, voyagé en Europe, voyagé au Togo et été bénévoles pour Pharma Huma, fêté des Nouvel An, assisté à 4 thèses de Pharma, été témoins d'un mariage,… il nous reste encore 2 thèses à célébrées, et je l'espère surtout de nombreux voyages et autres moments ensembles !! Merci pour votre soutient infaillible !!

Merci aux amis avec qui je partage surtout l'amour du rock et des bonnes bières !! A Adri et Oriane, Ale, Guigui, Julien, Juliette et Tristan, Lala, Mathilde et Vince, Martin et Clem, Olivier, Raphaëlle et Benoit, Romain, Seb, Solène, Tim, Val, et aux amis Belges : Biwi, Caro, Michel et Yoann, merci pour tous les bons moments que l'on a partagés, tous ces concerts, ces festivals, ces soirées, sans ça je n'aurai pas tenue alors merci beaucoup et surtout venez nous voir !!

Bien sûr je remercie mes parents qui m'ont permis de faire les études que je souhaitai, même après quelques temps d'hésitation, grâce à vous j'ai pu réaliser mon rêve, et j'arrive finalement au bout de ces études qui ont, je crois, porté leurs fruits. A vous, mais aussi à Greg et Jean-Phi, à mamie Noëlle, à Sophie, aux cousins,… merci pour votre soutient tout au long de ces années. Merci à mon fwère un peu (trop) tête en l'air mais dont je suis très fière aujourd'hui.

Et pour finir, merci à Léo, tu sais mieux que quiconque ce que s'est de me soutenir, de me suivre à travers mes aventures et surtout de me supporter ! Merci pour tout ❤

Résumé

Les virus Usutu (USUV) et West-Nile (WNV) sont des arbovirus émergents transmis principalement par des moustiques du genre Culex. Chez l'humain l'infection peut entrainer des atteintes neurologiques suite à un accès des virus au système nerveux central (SNC) notamment par le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ce projet de thèse s'intéresse à la caractérisation des mécanismes de passage et d'infection de la BHE par USUV et WNV. La neuroinflammation associée à ces infections étant une part importante de la pathogénèse, le rôle des cellules immunes et leur interaction avec la BHE ont aussi été étudiés. Ce travail a permis de mettre en évidence la susceptibilité de plusieurs types cellulaires neuronaux aux différentes lignées d'USUV ainsi que celle de modèles murins. La lignée Europe 2 semble être la plus virulente et son effet sur la BHE a été comparé avec celui de la lignée 2 de WNV, deux lignées associées à l'apparition de symptômes neuronaux lors d'infection humaine. Le modèle de BHE étudié permet la réplication des deux arbovirus avec un passage dans le SNC, WNV conduit aussi à une perturbation de l'intégrité de la barrière et les deux virus sont capable d'induire une forte réponse antivirale avec la sécrétion de molécules inflammatoires comme des cytokines (interleukines, interférons), des chimiokines et des molécules d'adhésion cellulaires. Cette inflammation induit le recrutement de cellules immunes amplifiant la neuroinflammation. D'autre part, USUV est capable d'infecter des cellules dendritiques qui seront aussi recrutées par la BHE à la différence de WNV, et peuvent être des chevaux de Troie lors de l'infection du SNC. Des sérums de patients ayant été infectés par le virus WNV ont été analysés afin de mettre en évidence la neuroinflammation et de trouver de potentiel biomarqueurs d'atteintes neuronales. Les patients infectés présentant des atteintes neurologiques montrent ainsi de fortes concentrations sériques de molécules pro-inflammatoires, persistantes plus de 20 jours après le début de l'infection, et la présence de molécules associées à des maladies neurodégénératives ou neuroinflammatoire. Par exemple, la concentration de TDP-43 pourrait être suivie après une infection par WNV afin d'anticiper les conséquences de son agrégation pouvant favoriser le développement de maladies neurodégénératives. Dans une démarche de « santé globale », ces travaux se sont aussi intéressés à la circulation de ces virus dans le sud de la France. Des tests de séroprévalence ont été menés afin de déterminer l'exposition des vecteurs, des réservoirs et d'autres hôtes à USUV et WNV. Enfin, en s'intéressant aux virus émergents responsables de troubles neuronaux, un travail de recherche sur l'infection de la BHE par le virus SARS-CoV-2 a été réalisé. En effet, ce virus est capable d'induire des symptômes neuronaux pouvant entrainer des séquelles. Les résultats suggèrent une faible infection directe de la barrière. L'ensemble de ces travaux permettent de mieux appréhender les infections virales de la BHE et la neuroinflammation, cela dans un contexte d'émergence avec des problématiques de santé publique soulevant l'importance de ces études.

Mots clés : Infection neuronale, Neuroinflammation, Flavivirus, virus Usutu, virus West-Nile, SARS-CoV-2

Abstract

Usutu (USUV) and West-Nile (WNV) virus are emerging arboviruses mainly transmitted by Culex genus mosquitoes. In human, the infection can lead to neurological impairments following invasion of the central nervous system (CNS) by virus, for example, through the blood-brain barrier (BBB) passage. This thesis project aims to characterize access and infection mechanisms of the BBB by USUV and WNV. Neuroinflammation associated to these infections is an important part of the pathogenesis, consequently immune cell role and their interactions with the BBB have been studied. This work has shown the susceptibility of different cell types of the CNS to different USUV lineages and the susceptibility of murine models. Europe 2 lineage seems to be the more virulent and its effect on the BBB has been compared to the WNV lineage 2 effect, these two lineages being associated to neuronal symptom appearance during human infection. The BBB model used allows the replication of both arbovirus with passage in the CNS, WNV also leads to integrity perturbations of the barrier, and the two viruses are able to induce strong antiviral response with secretion of inflammatory molecules as cytokines (interleukins, interferons), chemokines and cell adhesion molecules. This inflammation induces immune cell recruitment and increases neuroinflammation. Unlike WNV, USUV is able to infect dendritic cells that can be recruited by the BBB and that can be Trojan horses during CNS infection. WNV infected patient sera have been analyzed to highlight the neuroinflammation and to search potential biomarkers of neurological impairments. Infected patients with neurological disorders show high serological concentrations of pro-inflammatory molecules, persisting more than 20 days before infection starting date, and of molecules associated to neurodegenerative or neuroinflammatory diseases. The concentration of TDP-43 could be followed after WNV infection in order to anticipate the consequences of its aggregation that can promote neurodegenerative disease development, for example. In a “One Health” approach, this work also studies circulation of these viruses in the south of France. Seroprevalence assays have been done to determine USUV and WNV exposition in vectors, reservoirs and other hosts. Finally, to investigate emerging virus that cause neuronal disorders, a study of the BBB infection by SARS-CoV-2 has been accomplished. Indeed, this virus can cause neuronal symptoms with possible sequels. Results suggest a poor direct infection of the barrier. Taken together, this work allow a better understanding of BBB viral infections and neuroinflammation, in a context of emergence associated to public health concerns that highlights importance of these studies.

Keywords: Neuronal infection, Neuroinflammation, Flavivirus, Usutu virus, West-Nile virus, SARS-CoV-2

Sommaire

Remerciements 1

Résumé 3

Abstract 4

Sommaire 5

Liste des figures, tables et annexes 9

Abréviations 11

Publications 13

Chapitre 1 : Introduction 17

1 Virus émergents 17

1.1 Arbovirus 19

1.1.1 Flavivirus 22

1.1.1.1 Généralités 22

1.1.1.2 Le virus West-Nile 26

1.1.1.2.1 Distribution, épidémiologie 26

1.1.1.2.2 Cycle enzootique 29

1.1.1.2.3 Pathologie 30

1.1.1.3 Le virus Usutu 31

1.1.1.3.1 Distribution, épidémiologie 31

1.1.1.3.2 Cycle enzootique 32

1.1.1.3.3 Pathologie 33

1.2 Virus respiratoires 34

1.2.1 Le SARS-CoV-2 34
1.2.1.1 Classification et généralités 35
1.2.1.2 Epidémiologie 37
1.2.1.3 Pathologie 37
1.2.1.4 Traitement 38
1.3 Importance de la surveillance 39
2 Réponse immune aux infections virales 41
2.1 Réponse antivirale cellulaire 41
2.1.1 Généralités sur l'immunité innée 41
2.1.2 La réponse innée face aux WNV, USUV et SARS-CoV-2 45
2.2 Réponse immunitaire adaptative 46
2.3 Mécanismes de résistance viraux 47
3 Infections virales du système nerveux central 49
3.1 Généralités 49
3.2 La barrière hémato-encéphalique 50
3.2.1 Composition cellulaire et structure 51
3.2.1.1 Les cellules endothéliales de la BHE 51
3.2.1.2 Les Péricytes 54
3.2.1.3 Les Astrocytes 55
3.2.1.4 Autres cellules de l'unité neuro-vasculaire 56
3.3 Le neurotropisme 56
3.3.1 Voies d'accès au système nerveux central 57
3.3.1.1 Transport axonal 58
3.3.1.2 Accès par la voie systémique 59
3.3.1.3 Infections virales et passage de la BHE 59

3.4 Réponse antivirale dans le système nerveux central 60
3.4.1 Réponse antivirale des cellules de l'unité neuro-vasculaire 61
3.4.2 Infiltration des cellules immunes 63
3.4.3 Les cellules dendritiques dans les infections cérébrales 66
3.4.3.1 Généralités sur le lien entre les cellules dendritiques et le SNC 66
3.4.3.2 Le rôle de cheval de Troie 67
3.4.3.3 Le rôle dans la réponse antivirale cérébrale 68
3.4.4 Biomarqueurs de la neuroinflammation 69
3.5 Atteintes de l'unité neuro-vasculaire 70
3.5.1 Infection du SNC par WNV 70
3.5.2 Infection du SNC par USUV 72
3.5.3 Infection du SNC par SARS-CoV-2 72
Chapitre 2 : Objectifs & Hypothèses 75
Chapitre 3 : Résultats 77
1 Infection de la barrière hémato-encéphalique 77
1.1 Interactions du virus SARS-CoV-2 avec la BHE 77
1.2 Neurotropisme de différentes lignées USUV 91
1.3 Sensibilité de la BHE aux virus WNV et USUV 115
2 Neuroinflammation par WNV 159
3 Circulation des virus Usutu et West-Nile 181
3.1 Exposition aux virus USUV et WNV, au zoo de Montpellier 182
3.2 Approche « One Health » pour évaluer le risque arboviral 199
Chapitre 4 : Discussion et conclusion 211

1 Discussion 211
1.1 Infection du système nerveux central 211
1.1.1 Passage et perturbation de la BHE 211
1.1.1.1 Le SARS-CoV-2 212
1.1.1.2 Les *Flavivirus* Usutu et West-Nile 213
1.1.2 Rôle des cellules immunes 216
1.1.3 Biomarqueurs et neuroinflammation 218
1.1.3.1 Le SARS-CoV-2 218
1.1.3.2 Les *Flavivirus* Usutu et West-Nile 219
1.1.4 Conséquences au long terme 221
1.1.4.1 Le SARS-CoV-2 222
1.1.4.2 Les *Flavivirus* Usutu et West-Nile 222
1.1.5 Limites expérimentales 224
1.2 Autres commentaires sur la virulence 226
1.3 Surveillance de la circulation virale 227
1.4 Perspectives 230
2 Conclusion générale 232
Références 233
Annexes 261

Liste des figures, tables et annexes

Figure 1 Les facteurs à l'origine de l'émergence d'un virus 18
Figure 2 Distribution géographique de cinq arbovirus d'importance en santé publique à travers le globe. 21
Figure 3 Arbre phylogénétique des *Flaviviridae*, selon ICTV 23
Figure 4 Représentation schématique d'une particule virale de *Flavivirus*. 24
Figure 5 Organisation génomique d'un *Flavivirus*. 24
Figure 6 Cycle viral de réplication des *Flavivirus* dans une cellule hôte. 26
Figure 7 Localisation des cas humaines d'infection par WNV en Europe en 2018 27
Figure 8 Localisation des cas humains d'infection par WNV en Europe en 2021 28
Figure 9 Distribution du virus Usutu en Europe selon la nature de l'identification 31
Figure 10 Cycle enzootique des virus West-Nile et Usutu via une transmission vectorielle 33
Figure 11 Représentation schématique d'une particule virale de SARS-CoV-2 35
Figure 12 Organisation génomique du SARS-CoV-2 35
Figure 13 Cycle viral des *Coronavirus* dans une cellule hôte 36
Figure 14 Initialisation de la réponse immune 42
Figure 15 Voies d'activation de la réponse à l'interféron 43
Figure 16 Le système nerveux central et les principales cellules le constituant. 49
Figure 17 Schéma de l'unité neuro-vasculaire 51
Figure 18 Jonctions des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique 52
Figure 19 Différentes voies d'accès des virus au système nerveux central 58
Figure 20 Illustrations de mécanismes viraux de passage de la BHE 60
Figure 21 Recrutement et transmigration de cellules immunes 64
Figure 22 Neuroinflammation suite à l'infection virale du SNC 65
Figure 23 Interactions des cellules dendritiques avec la BHE 67
Figure 24 Résumé des voies d'accès au SNC des virus SARS-CoV-2, Usutu et West-Nile 211

Tableau 1 Classification d'arbovirus à l'origine de maladies infectieuses chez l'humain 20

Annexe 1 Revue 261
Annexe 2 Suppléments article portant sur le SARS-CoV-2 276
Annexe 3 Suppléments article de comparaison lignées USUV 278
Annexe 4 Correction article de comparaison lignées USUV 282
Annexe 5 Suppléments article "One Health" 286

Abréviations

A

α-SMA : *α-smooth muscle actin*

ADE: *antibody dependant enhancement*

ADN: acide déoxyribonucléique

ALR: *AIM2 like receptor*

ARN: acide ribonucléique

ASC: *apoptosis-associated speck-like protein*

AVC: accident vasculaire cérébrale

B

BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*

BDV: virus de la maladie de Borna

BHE : barrière hémato-encéphalique

BTV : virus de la fièvre catarrhale ovine

C

CAM: molécule d'adhésion cellulaire

CARD: domaine de recrutement de caspase

CCHV: virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo

CEV: virus de l'encéphalite de Californie

CHIKV: virus Chikungunya

CLR: *C-type lectin receptor*

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CTFV: virus de la fièvre à tiques du Colorado

D

Da: Dalton

DAMP: *danger-associated molecular pattern*

Db: double brin

DC: cellule dendritique

DENV: virus de la Dengue

E

EAE : modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

et al. : abréviation du latin « et les autres »

G

GDF-15 : *growth differentiation factor-15*

GDNF : facteur de survie neuronale

GFAP: protéine acide fibrillaire gliale

GM-CSF: facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages

H

HAS: haute autorité de santé

HCoV: coronavirus humain

HSV: virus de l'herpès simple

HTLV-1: virus T-lymphotrope humain de type 1

I

ICTV: *international committee on taxonomy of viruses*

IFN: interféron

IL: interleukine

IRF : facteur de régulation de l'interféron

ISG: gène stimulé par l'interféron

J-K

JAM: molécule d'adhésion jonctionelle

JEV: virus de l'encéphalite japonaise

kb : kilobase

L

LACV : virus de l'encéphalite de La Crosse

LCR: liquide céphalo-rachidien

Ly: lymphocyte

M

MAVS: *mitochondrial antiviral-signaling protein*

MDA-5: protéine-5 associée à la différentiation du mélanome

MIF : facteur d'inhibition de la migration des macrophages

MMP: métalloprotéase de matrice

MoDC: cellule dendritique dérivée de monocyte

MVEV: virus de l'encéphalite de la Vallée Murray

N-O

NCAM-1 : molécule d'adhésion cellulaire neuronale

NfL: neurofilament

NF-κB: facteur nucléaire kappa-B

NG2: antigène neuronal-glial 2

NK: cellules tueuses

NLR: *NOD-like receptor*

Nsp: protéine non structurale

ORF: cadre de lecture

OMS: organisation mondiale de la santé

P

PAMP: *pathogen-associated molecular pattern*

PBMC : cellule mononucléaire du sang périphérique

PCR: *polymerase chain reaction*

pDC: cellule dendritique plasmacytoïde

PDGFR-β: *platelet-derived growth factor receptor, beta*

P-gp: P-glycoprotéine

PGE2 : prostaglandine E2

PKR : protéine kinase activée par l'ARN

PRR : récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

R

RABV: virus de la rage

RdRp: *RNA-dependant RNA-polymerase*

RLR: *Rig-I-like receptor*

RNAse: enzyme dégradant l'ARN

ROS: espèce réactive de l'oxygène

RT-qPCR: *real-time quantitative polymerase chain reaction*

RVFV: virus de la fièvre de la vallée du Rift

S

SARS: syndrome respiratoire aiguë sévère

SARS-CoV-2: coronavirus-2 du SARS

sb: simple brin

SEP: sclérose en plaque

sfRNA: ARN sous-génomique de *Flavivirus*

SFV: virus de la forêt de Semliki

SLEV: virus de l'encéphalite de St Louis

SNC: système nerveux central

SNP: système nerveux périphérique

T

TBEV : virus de l'encéphalite à tiques

TDP-43 : *TAR DNA-binding protein 43*)

TEER: résistance électrique trans-endothéliale

TLR: *Toll-like receptor*

TNF: facteur de nécrose tumorale

TOSV: virus Toscana

TRIF : *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*

U-V

USUV: virus Usutu

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

VSV: virus de la stomatite vésiculaire

W

WNF: fièvre du Nil Occidental

WNND: maladie neuronale du Nil Occidental

Wnt: protéine dont le nom provient de la contraction des mots *Wingless* et *Integrated*

WNV: virus du Nil Occidental

Y-Z

YFV: virus de la fièvre jaune

ZIKV: virus Zika

ZO: *zonula-occludens*

Publications

Revue

Constant Orianne, Maarifi Ghizlane, Blanchet Fabien, Van de Perre Philippe, Simonin Yannick* and Salinas Sara*, **Role of dendritic cells in viral brain infections**, *Frontiers in Immunology*, 13:862053 (2022)

Articles scientifiques

Constant Orianne, Maarifi Ghizlane, Barthelemy Jonathan, Martin Marie-France, Tinto Bachirou, Nisole Sébastien, Van de Perre Philippe, Simonin Yannick* and Salinas Sara*, **Differential effects of USUV and WNV on neuroinflammation, immune cells recruitment and blood-brain barrier disruption**, *Emerging Microbes and Infections* (en révision)

Constant Orianne*, Gil Patricia*, Barthelemy Jonathan, Bolloré Karine, Foulongne Vincent, Desmetz Caroline, Leblond Agnès, Desjardins Isabelle, Pradier Sophie, Joulié Aurélien, Amaral Rayane, Boisseau Michel, Rakotoarivony Ignace, Baldet Thierry, Marie Albane, Frances Benoît, Reboul Salse Florence, Tinto Bachirou, Van de Perre Philippe, Salinas Sara, Beck Cécile, Lecolinet Sylvie, Gutierrez Serafin* and Simonin Yannick*, **"One Health" surveillance of West Nile and Usutu viruses suggests endemisation in the South of France**, *Eurosurveillance*, 27:25 (2022)

Constant Orianne, Barthelemy Jonathan, Nagy Anna, Salinas Sara* and Simonin Yannick*, **West Nile virus neuroinfection in humans: peripheral biomarkers of neuroinflammation and neuronal damage**, *Viruses*, 14, 756 (2022)

Constant Orianne, Barthelemy Jonathan, Bolloré Karine, Tuaillon Edouard, Gosselet Fabien, Chable-Bessia Christine, Merida Peggy, Muriaux Delphine, Van de Perre Philippe, Salinas Sara* and Simonin Yannick*, **SARS-CoV-2 Poorly Replicates in Cells of the Human Blood-Brain Barrier Without Associated Deleterious Effects**, *Frontiers in Immunology*, 12:697329 (2021)

Clé Marion*, Constant Orianne*, Barthelemy Jonathan, Desmetz Caroline, Martin Marie France, Lapeyre Lina, Cadar Daniel, Savini Giovanni, Teodori Liana, Monaco Federica, Schmidt-Chanasit Jonas, Saiz Juan Carlos, Gonzales Gaëlle, Lecollinet Sylvie, Beck Cécile, Gosselet Fabien, Van de Perre Philippe, Foulongne Vincent, Salinas Sara, Simonin Yannick, **Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells,** *Journal of Neuroinflammation*, 18:11 (2021)

Constant Orianne*, Bollore Karine*, Clé Marion, Barthelemy Jonathan, Foulongne Vincent, Chenet Baptiste, Gomis David, Virolle Laurie, Gutierrez Serafin, Desmetz Caroline, Moares Rayane Amaral, Beck Cécile, Lecollinet Sylvie, Salinas Sara, Simonin Yannick, **Evidence of Exposure to USUV and WNV in Zoo Animals in France,** *Pathogens*, 9, 1005 (2020)

Autres contributions

Clé Marion, Desmetz Caroline, Barthelemy Jonathan, Martin Marie France, Constant Orianne, Maarifi Ghizlane, Foulongne Vincent, Bolloré Karine, Glasson Yaël, De Bock Frédéric, Blaquiere Marine, Dehouck Lucie, Pirot Nelly, Tuaillon Edouard, Nisole Sébastien, Najioullah Fatiha, Van de Perre Philippe, Cabié André, Marchi Nicola, Gosselet Fabien, Simonin Yannick, Salinas Sara, **Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier,** *mBio*, 11:e01183-20 (2020)

Chapitre 1 : Introduction

Les virus sont les éléments microbiologiques les plus nombreux sur notre planète, ils font partie intégrante de l'Histoire et de l'évolution des espèces, d'ailleurs 8% du génome humain est constitué de séquences d'origine virale[1]. Ils existent sur Terre depuis des centaines de millions d'années, mais leur nature exacte est constamment remise en cause[2]. Ils peuvent être définis comme des agents nucléo-protéiques infectieux, nécessitant le détournement d'une machinerie cellulaire pour leur croissance et division[3]. Leur génome est constitué d'un seul type d'acide nucléique (ARN ou ADN) et produit des virions, ou particules virales, qui sont constitués *a minima* de ce génome et d'une capside, et peuvent être entourés d'une enveloppe. Au cours de ma thèse je me suis intéressée à l'étude de différents virus émergents pouvant être à l'origine de problèmes majeurs de santé publique.

1 Virus émergents

Une maladie infectieuse est dite émergente ou ré-émergente lorsqu'elle apparait dans une nouvelle population ou dans une zone géographique jusqu'alors indemne pour le pathogène, et que son incidence augmente rapidement et inhabituellement[4]. Certaines émergences de pathogènes ont conduit à des évènements épidémiques qui sont apparus au cours de l'Histoire humaine, comme la Peste Noire ou la grippe Espagnol, et dont une majorité sont d'origine zoonotique[5,6]. Plus généralement, l'émergence d'un virus est un accident, un évènement impromptu parmi les multitudes d'évènement de rencontre entre l'hôte et le virus. Cet évènement peut être dû à un ou plusieurs facteurs de différentes natures : des facteurs extrinsèques liés à l'environnement, des facteurs dits anthropiques et des facteurs intrinsèques relatifs à l'hôte, au vecteur (quand il y en a un) ou au virus lui-même (Figure 1).

Facteurs extrinsèques

Les facteurs extrinsèques sont associés à l'environnement, le climat, les températures, ou les taux de précipitation et d'humidité, et peuvent avoir des effets directs sur les virus (modulation physique) mais aussi sur les hôtes (changement d'environnement d'une espèce animale réservoir, modification ou expansion de la zone géographique d'un vecteur, par exemples).

Facteurs anthropiques

L'activité humaine est un facteur important, en effet elle augmente fortement les probabilités d'émergence virale. Les conséquences de cette activité peuvent être : l'expansion des zones géographiques reliée à la croissance de la déforestation et de l'urbanisation ; l'augmentation des

élevages (aussi associée à la destruction d'habitat naturel de certaines espèces animales et à l'augmentation des probabilités de rencontres entre un réservoir animal et un nouvel hôte comme l'humain) ; le développement des transports de biens, d'animaux ou d'humains rendant la diffusion d'un virus plus rapide ; la vie en zone urbaine qui augmente les probabilités de transmission interhumaine et est associé à des conditions sanitaires plus à risque (comme l'accès à l'eau propre) ; ou le comportement humain vis-à-vis de la prévention des risques et des mesures de santé publique.

Facteurs intrinsèques

Concernant les facteurs intrinsèques de l'hôte, ils peuvent être dus à la voie de transmission (reliée entre autre à la stabilité du virus et le site d'excrétion), à la condition physiologique de l'hôte (par exemples son âge, son statut immunologique, ou encore les comorbidités associées), et aux bagages génétiques (prédispositions à l'infection, réactivité immunologique). Chez le vecteur, lorsqu'il y en a un, les facteurs intrinsèques comprennent le type de transmission ou la réponse immunologique à l'infection. Enfin chez le virus la capacité de mutation est un facteur intrinsèque important lors de l'émergence, par exemple les virus à ARN ont des taux de mutations les plus élevés parmi les êtres capables de réplication, et ces mutations entraînent une adaptation rapide et le développement de mécanismes de résistance.

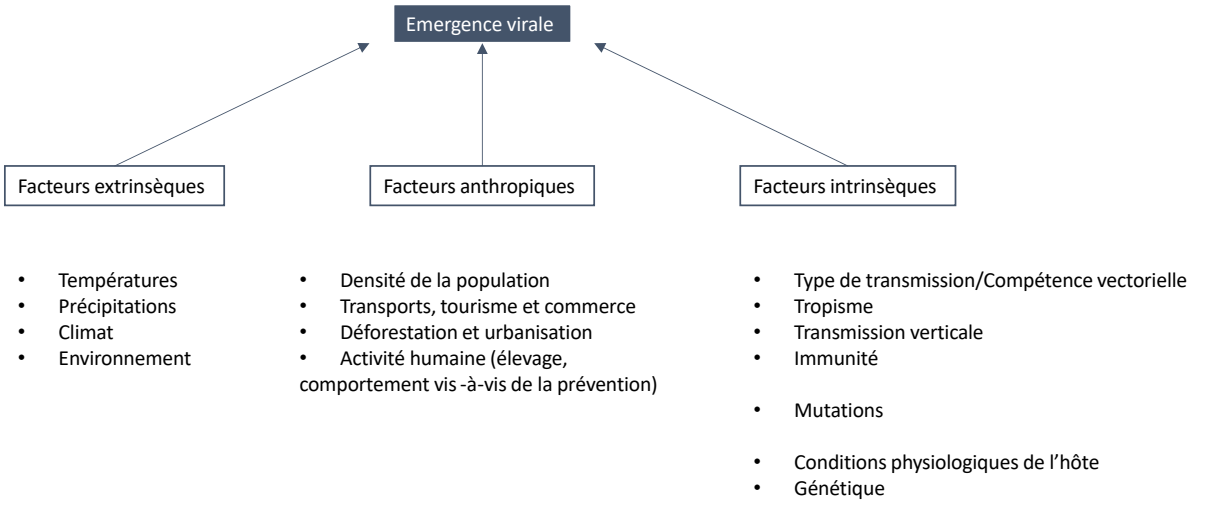


Figure 1 Les facteurs à l'origine de l'émergence d'un virus
Trois principaux types de facteurs peuvent être à l'origine de l'émergence d'un virus, les facteurs extrinsèques relatifs à l'environnement ; les facteurs anthropiques dû aux activités humaines ; et les facteurs intrinsèques propre au virus, à l'hôte et au vecteur quand il existe ; adapté du manuscrit de thèse de M-F Martin (2021).

Exemples d'infections virales émergentes

L'émergence virale est responsable de nombreux problèmes de santé publique et peut être à l'origine de risques épidémiques, voire pandémiques. Les conséquences épidémiques causés par des virus émergents peuvent être illustrés par l'exemple du virus de la fièvre jaune (*Yellow fever virus*,

YFV) : une des premières épidémies humaines contemporaines qui est aujourd'hui encore à l'origine de 30 000 à 60 000 décès par an[7]. Ce virus émergent est devenu endémique dans certaines régions d'Afrique et d'Amérique du Sud et Centrale, mais il reste à potentiel épidémique et donc susceptible d'émerger dans de nouvelles populations ou zones géographiques. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a émergé dans les années 80, et a entrainé une épidémie majeure qui touche encore chaque année entre 1 et 2 millions de personnes.

Ces deux exemples partagent certains facteurs à l'origine de leur émergence comme le commerce triangulaire qui a initié leur transmission vers de nouvelles zones géographiques et le contact avec de nouveaux types d'hôtes (et de vecteurs pour YFV). Une maladie émergente est donc définie comme une infection humaine dont l'incidence au cours des dernières décennies a fortement augmenté ou dont le risque d'augmentation de cette incidence est important.

1.1 Arbovirus

Définition & Classification

Parmi les virus émergents, certains peuvent être transmis par des vecteurs arthropodes hématophages comme les moustiques, les phlébotomes, les culicoïdes ou les tiques, et sont appelés arbovirus. Leur cycle de transmission peut être enzootique, il comprend un hôte primaire, réservoir et amplificateur (tels que des oiseaux ou des rongeurs), et un vecteur responsable de la propagation des virus dans la population hôte. Concernant les vecteurs moustiques, les virus vont les infecter lors d'un repas sanguin sur l'hôte vertébré lui-même infecté, puis ils vont se multiplier dans l'appareil digestif, atteindre les glandes salivaires et pouvoir infecter de nouveaux hôtes lors d'un prochain repas sanguin. Les nouveaux hôtes peuvent être des impasses épidémiologiques (notamment si la virémie de ce nouvel hôte est trop faible pour assurer une nouvelle infection lors d'un autre repas sanguin du vecteur), ou ils peuvent être des hôtes secondaires avec un passage du virus dans une nouvelle population (par exemple chez l'humain) pouvant établir un cycle secondaire. Pour certains arbovirus des transmissions non vectorielles ont pu être décrites, par exemple la transmission par voie sexuelle du virus Zika (ZIKV) ou par transfusion sanguine du virus du Nil Occidental (*West-Nile virus*, WNV)[8,9]. Ces virus ont longtemps circulé dans des zones limitées, tropicales ou subtropicales, où ils sont parfois devenus endémiques, mais ils ont aussi émergé dans des zones plus tempérées comme l'Europe ou l'Amérique du Nord, principalement dû aux facteurs anthropologiques[10].

Sous le terme d'arbovirus, plusieurs familles regroupent au total plus de 530 virus à ce jour. Les principales familles, à l'origine de maladies infectieuses humaines sont : les *Bunyaviridae*, les *Flaviviridae*, les *Reoviridae*, les *Rhabdoviridae* et les *Togaviridae*, quelques exemples sont répertoriés dans le tableau 1, ci-dessous.

FAMILLE	GENRE	EXEMPLE(S) DE VIRUS	VECTEUR	HOTE VERTEBRE
Peribunyaviridae	*Orthobunyavirus*	Virus de l'encéphalite La Crosse (LACV)	Moustique	Rongeurs
		Virus de l'encéphalite de Californie (CEV)	Moustique	Rongeurs
Nairoviridae	*Nairovirus*	Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV)	Tique	Rongeurs
Phenuiviridae	*Phlebovirus*	Virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV)	Moustique	Ruminants
		Virus Toscana (TOSV)	Phlébotome	Non identifiés
Flaviviridae	*Flavivirus*	Virus de la Dengue (DENV)	Moustique	Humains
		Virus de la fièvre jaune (YFV)	Moustique	Humains/Primates
		Virus Zika (ZIKV)	Moustique	Humains/Primates
		Virus de l'encéphalite japonaise (JEV)	Moustique	Oiseaux et Porcs
		Virus du Nil Occidental (WNV)	Moustique	Oiseaux
		Virus Usutu (USUV)	Moustique	Oiseaux
		Virus de l'encéphalite à tiques (TBEV)	Tique	Rongeurs
Reoviridae	*Coltivirus*	Virus de la fièvre à tiques du Colorado (CTFV)	Tique	Rongeurs
Rhabdoviridae	*Vesiculovirus*	Virus de la stomatite vésiculaire (VSV)	Moustique et phlébotome	Bovins, chevaux et porcs
Togaviridae	*Alphavirus*	Virus Chikungunya (CHIKV)	Moustique	Humains/Primates

Tableau 1 Classification d'arbovirus à l'origine de maladies infectieuses chez l'humain
(liste non exhaustive)

Epidémiologie

Les changements climatiques, et les facteurs anthropiques, peuvent être à l'origine de la dissémination des vecteurs arthropodes dans de nouvelles régions et entrainent l'augmentation des risques d'apparition des arbovirus dans de nouvelles populations. Ainsi les modifications de zones géographiques des vecteurs d'arbovirus participent à la croissance du potentiel épidémique de ces virus. Ceci peut être illustré avec les épidémies de WNV aux Etats-Unis en 1999 ou de ZIKV en 2015 au Brésil qui ont vues émerger ces virus jusqu'alors jamais identifié dans ces régions, et ce en lien avec l'apparition du vecteur dans ces territoires[11,12]. La distribution des arbovirus à travers le globe est donc principalement liée à celle de leur vecteur respectif, par exemple aujourd'hui CHIKV, qui est transmis par des moustiques du genre *Aedes*, est retrouvé sur de nombreux territoires alors que JEV, principalement transmis par des moustiques du genre *Culex*, n'est présent qu'en Asie (et commence à émerger en Océanie)[13,14]. Les analyses phylogénétiques menées sur ces virus suggèrent que l'origine géographique pour la plupart d'entre eux, notamment CHIKV, DENV, WNV, YFV ou ZIKV, serait situé en Afrique (Figure 2)[15].

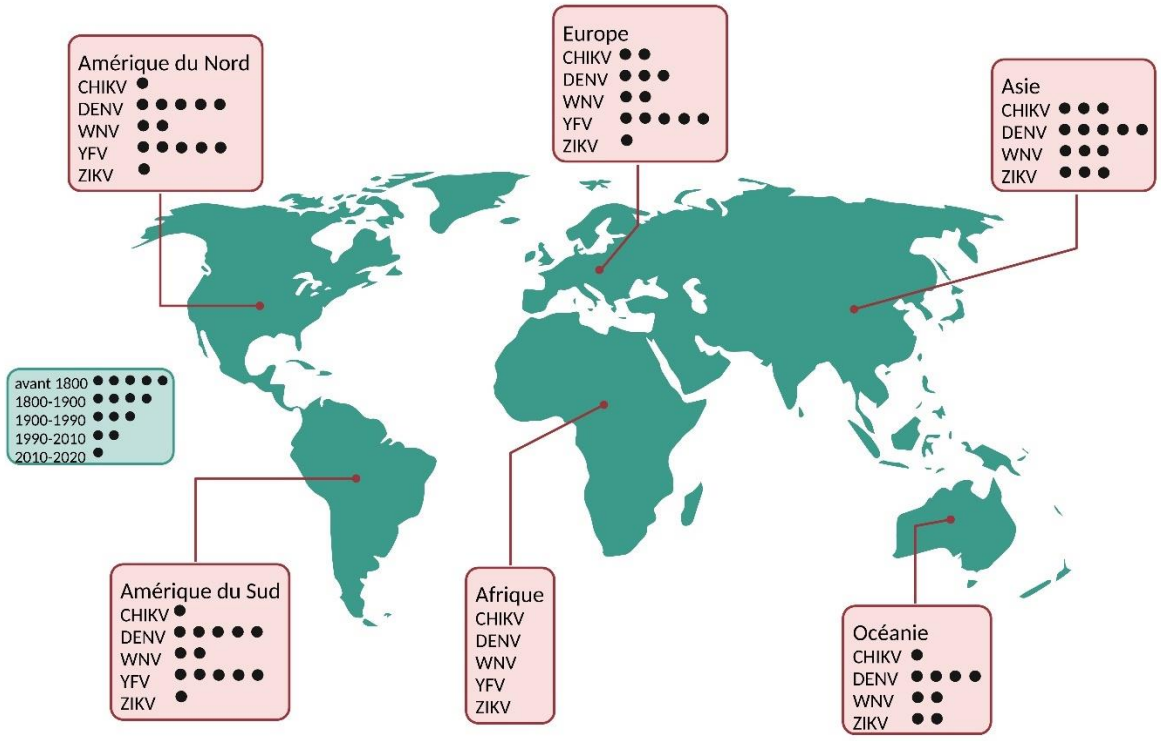


Figure 2 Distribution géographique de cinq arbovirus d'importance en santé publique à travers le globe.
Les cercles représentent la période à laquelle ils ont été identifiés chez l'humain, tous semblent provenir du continent africain et y ont été identifiés. D'après R. Bellone et A. Failloux, 2020, adapté sur BioRender.

Ces virus sont à l'origine d'arboviroses représentant une grande part des maladies infectieuses émergentes. Plus de 150 arboviroses humaines ont été décrites et soulèvent une véritable problématique de santé publique. En effet chaque année on dénombre environ 400 millions d'infection par DENV, 130 000 par YFV, 70 000 par JEV, ou encore entre 50 000 et 330 000 par CHIKV[16,17]. Et comme évoqué précédemment, ces infections conduisent aussi à un nombre important de décès : environ 20 000 par DENV, 30 000 à 60 000 par YFV et environ 25 000 par JEV.

Symptomatologie

Les symptômes liés à l'infection par un arbovirus peuvent être variés : de cas asymptomatiques à des complications sévères voire fatales. Selon leur tropisme notamment, les arbovirus peuvent provoquer trois grands types de symptômes cliniques : un syndrome systémique fébrile, une fièvre hémorragique, ou une atteinte neuronale[10]. Les cas les plus sévères sont souvent associés à une première phase fébrile puis le patient développe des atteintes articulaires, hémorragiques (variant d'un saignement des muqueuses à de sévères complications viscérotropes) ou neurologiques (notamment illustré par des cas de méningo-encéphalites). Ces deux derniers types d'atteintes peuvent conduire à des décès. Cependant, la plupart du temps, et pour la plupart des infections arbovirales, un simple syndrome fébrile, non-spécifique, sera développé avec un rétablissement rapide des patients. On peut aussi noter que l'infection par un seul virus peut entrainer ces différents types de symptômes sur différents individus[18].

Traitement et prévention

Contre les arboviroses il n'existe pas de traitement spécifique. Des vaccins ont néanmoins été développés contre YFV, JEV, TBEV et DENV. Ces vaccins permettent la prévention des infections par YFV, JEV et TBEV mais les couvertures vaccinales restent encore faibles. Pour les vaccins contre la DENV de nombreuses études restent en cours car le virus présente différents sérotypes et a la particularité d'induire des anticorps non neutralisants à l'origine d'aggravation dépendante des anticorps (*antibody-dependent enhancement*, ADE) lors d'infections secondaires[19,20]. Des traitements symptomatologiques de soutient peuvent être utilisés comme : l'utilisation de paracétamol contre les douleurs et/ou la fièvre ; l'hydratation (par voie orale ou parfois en voie injectable) et la prise d'antiémétiques ; la surveillance des normales comme la pression intracrânienne ou le rythme respiratoire ; et des recommandations de repos[21].

Si de nombreux efforts sont mis en place pour trouver des traitements spécifiques ou globaux contre les arboviroses, les méthodes de prévention les plus utilisés sont encore la lutte antivectorielle[22]. Celle-ci repose principalement sur l'utilisation de répulsifs et de moustiquaires, ou l'utilisation d'insecticides qui présentent néanmoins des limites comme la résistance développée par les arthropodes contre les insecticides. D'autres moyens de lutte sont en étude, notamment l'utilisation de vecteurs stériles pour réduire les populations ou encore le développement de vecteur génétiquement modifié ou porteur de bactérie comme *Wolbachia* pour réduire la capacité de réplication virale et de transmission[23,24].

1.1.1 Flavivirus

YFV est le premier virus infectant l'humain découvert (après le virus de la mosaïque du tabac, virus de plante, et celui de la fièvre aphteuse, virus animal), c'est aussi le premier virus isolé et amplifié *in vitro* en 1927, et entièrement séquencé en 1985[25]. Ce virus a donné son nom au genre *Flavivirus* puisqu'il provient du latin *flavus* signifiant jaune et faisant référence à la couleur de peau des patients infectés par YFV suite à l'atteinte et la perturbation du métabolisme hépatique[7]. Aujourd'hui les *Flavivirus* sont retrouvés sur les cinq continents et regroupent les infections arbovirales humaines les plus répandues associées à des répercussions importantes sur la santé publique.

1.1.1.1 Généralités

Les *Flavivirus* appartiennent à la famille des *Flaviviridae* comportant quatre genres : les *Hépacivirus* représenté par le virus de l'hépatite C, les *Pestivirus* tel que le virus de la diarrhée bovine (BDV), les *Pegivirus* dont le Pegivirus équin, et donc les *Flavivirus* regroupant entre autres DENV, YFV et ZIKV (Figure 3). Parmi ceux-ci, le sérocomplexe du JEV comporte plusieurs virus phylogénétiquement proches comme le virus de l'encéphalite de St Louis (SLEV), le virus de l'encéphalite de la vallée de

Murray (MVEV), USUV ou WNV. Ce sérocomplexe peut être à l'origine de réaction croisée des anticorps produit à la suite de l'infection. En effet, les virus appartenant à ce groupe ont de nombreuses similarités, notamment antigéniques, entrainant la reconnaissance par un anticorps produit à la suite de l'infection par un de ces virus d'autres de ces virus[26,27].

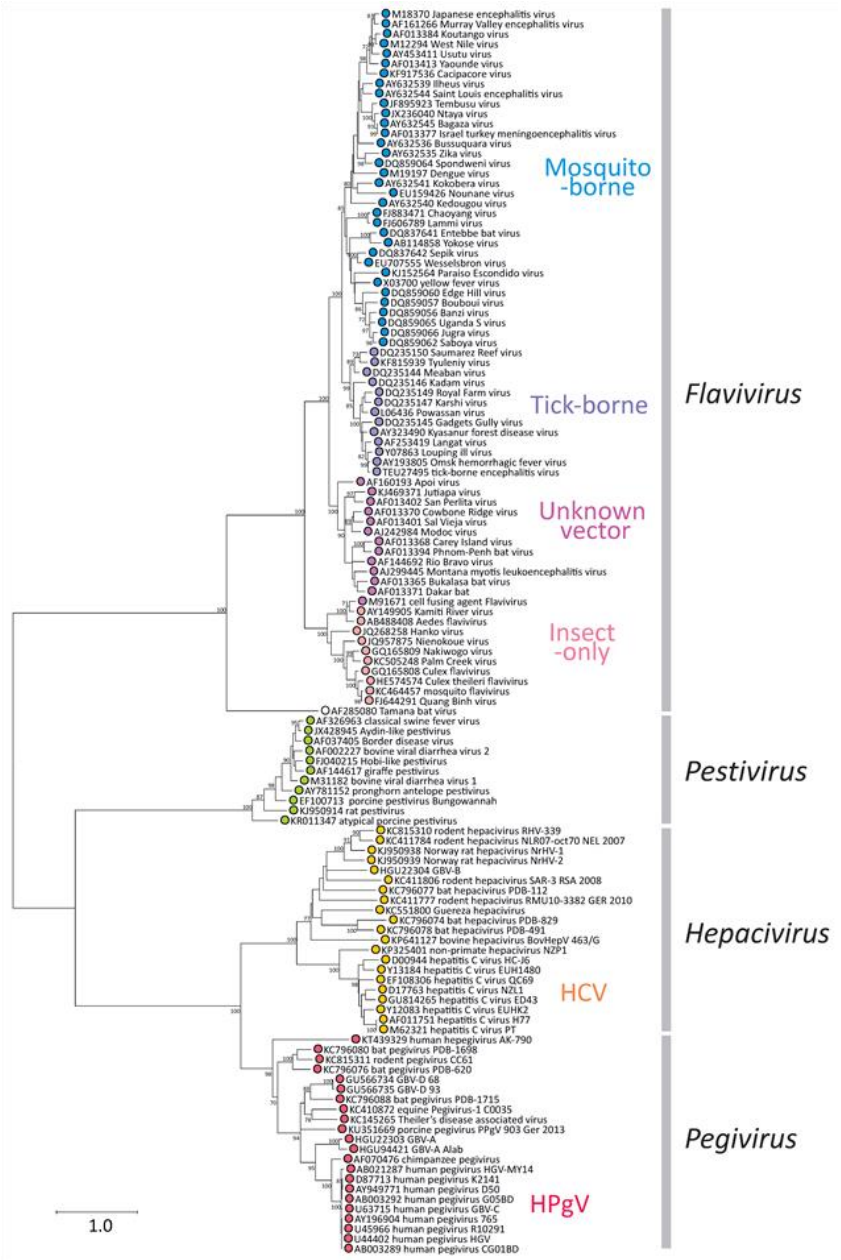


Figure 3 Arbre phylogénétique des *Flaviviridae*, selon ICTV

La particule virale des *Flavivirus* est une structure sphérique, de diamètre compris entre 40 et 60 nm, comprenant une enveloppe et une capside icosaédrique renfermant le génome (Figure 4). Les virions immatures possèdent à leur surface des hétérodimères de protéines d'enveloppe (E) et de pré-membrane (prM) qui seront clivés pendant la maturation. Les virions matures ont ainsi une enveloppe composée des protéines structurales E et M, dans une bicouche lipidique dérivée de la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule hôte, et une capside composée de protéine C[28].

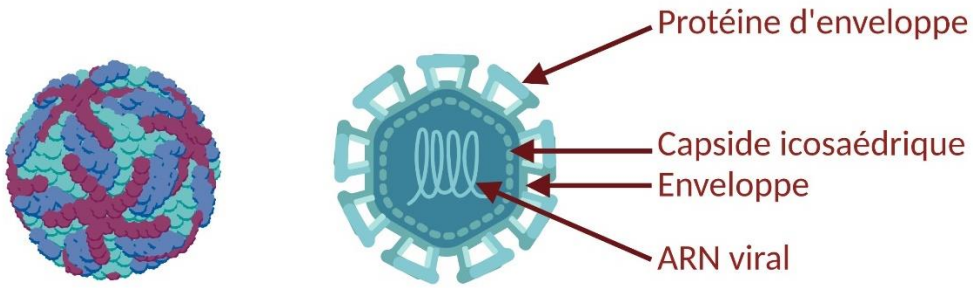


Figure 4 Représentation schématique d'une particule virale de *Flavivirus*.
Image représentant une vue de la surface des *Flavivirus* (à gauche) et schéma représentant l'enveloppe des *Flavivirus* et la capside icosaédrique autour du génome viral (à droite), réalisation BioRender.

Le génome de ces virus contient un ARN simple brin (sb) de polarité positive, d'environ 11kb, flanqué d'une coiffe de type I (m^7GpppAmN) en 5', qui permet la stabilisation et l'initiation de la translation génomique, et dépourvu de queue polyadénylée (polyA) en 3'. Avec un seul cadre de lecture, le génome code pour une polyprotéine d'environ 3 400 acides aminés comportant des régions 5' et 3' non traduites (5'-UTR et 3'-UTR). Cette polyprotéine est clivée pour libérer les 3 protéines structurales C, E et prM, et 7 protéines non-structurales (Figure 5) : NS1 (s'associe à NS4A pour permettre la réplication génomique) ; NS2A (coordonne le passage de l'ARN empaqueté à la réplication) ; NS2B (protéine membranaire, permettant la formation d'un complexe protéase avec NS3) ; NS3 (enzyme avec différentes activités : protéase à serine de type trypsine, hélicase et ARN triphosphatase ; joue aussi un rôle dans la réplication de l'ARN) ; NS4A (s'associe à NS1 pour la réplication génomique) ; NS4B (participe à la résistance antivirale) ; et NS5 (polymérase à ARN dépendante de l'ARN (*RNA dependant RNA* polymerase, RdRp))[29].

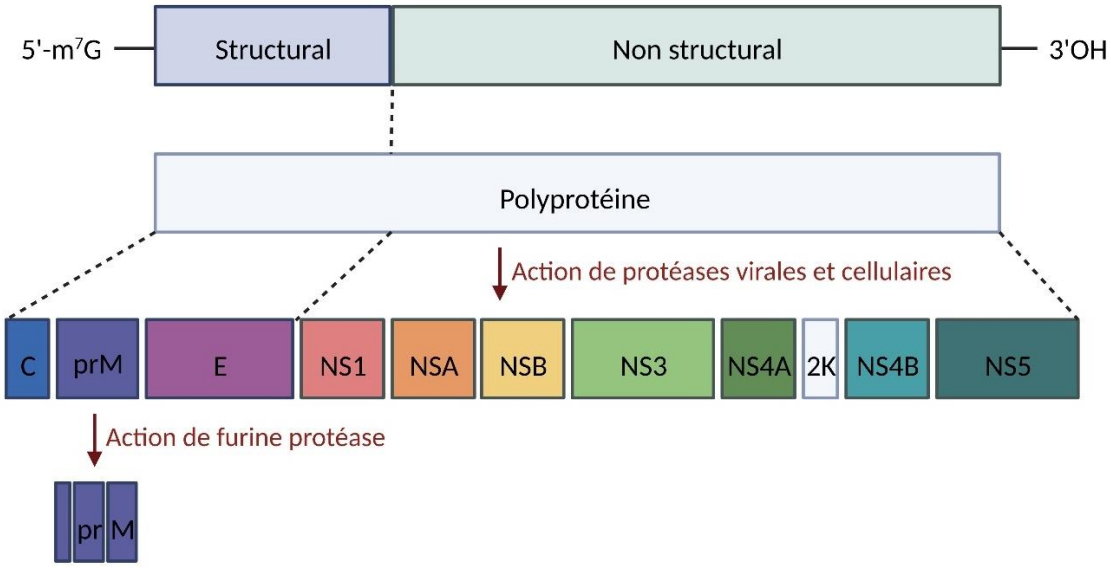


Figure 5 Organisation génomique d'un *Flavivirus*.
Le génome viral des *Flavivirus* comprend un seul cadre de lecture ouvert (ORF) codent pour une polyprotéine. Celle-ci est clivée par des protéases virales et cellulaires donnant 3 protéines structurales (la protéine de capside C, la protéine pré-membranaire prM ensuite clivée pour donner la protéine membranaire M, et la protéine d'enveloppe E) et 7 protéines non structurales (NS1 à NS5), réalisation BioRender.

Cycle viral

L'attachement de la protéine E du virion avec un récepteur cellulaire de la membrane plasmique est la première étape du cycle viral des *Flavivirus*. Certains récepteurs sont souvent associés à l'entrée de certains *Flavivirus*, par exemple, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, les récepteurs aux lectines de type C (récepteurs mannose ou DC-SIGN) ou les glycosaminoglycanes sulfatés (héparine sulfate)[30]. Une endocytose, majoritairement clathrine-dépendante pour les *Flavivirus*, va permettre l'entrée des virions, puis une acidification du milieu endosomale entrainera la fusion de la protéine E avec la membrane endosomale et la libération de la capside dans le cytoplasme. Cette étape sera dépendante du pH de fusion nécessaire à chaque *Flavivirus* et de la composition lipidique des membranes de la cellule hôte[31]. La décapsidation cytoplasmique va alors libérer le génome viral puis permettre une traduction directe de l'ARN + en polyprotéine. Celle-ci sera clivée par des protéases cellulaires et par le complexe NS2B/NS3 pour aboutir à trois protéines structurales et huit protéines non-structurales (7 protéines non-structurales (NS) et 1 protéine accessoire 2K).

A la suite de cette étape de traduction, les protéines NS vont former le complexe de réplication en s'associant aux membranes du réticulum endoplasmique et à d'autres protéines cellulaires de la cellule hôte. La transcription aura alors lieu en commençant par la synthèse d'un ARN sb - et servant de matrice à la synthèse des ARN sb + formant alors transitoirement un ARN double brin (db) appelé dsRNA qui est l'intermédiaire de réplication[32]. Les dsRNA jouent un rôle important dans la réponse antivirale puisqu'ils sont associés à des signatures antigéniques de non-soi (aussi nommées *Pathogen Associated Molecular Patterns,* PAMP). Lors de ces étapes, des substrats nucléotidiques, des enzymes et l'énergie de la cellule hôte sont utilisés.

Il y a aussi formation d'ARN viral non codant, en effet l'exoribonucléase cellulaire XRN1 peut dégrader le génome viral, cependant en région 3'UTR des structures rigides et très conservées vont bloquer l'action de l'enzyme induisant ainsi la formation de plusieurs types de sfRNA d'environ 0,5 kb (ARN sous-génomique de *Flavivirus*)[33]. Ces sfRNA ont été décrit comme ayant un rôle dans la résistance à la réponse antivirale[34].

Par la suite, l'assemblage de l'ARN génomique et des protéines structurales au niveau de niche réplicative du réticulum endoplasmique donne des virions immatures qui peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme des glycosylations de l'enveloppe virale. Le transport dans l'appareil de Golgi va permettre le clivage par une furine cellulaire des protéines prM en M et d'autres modifications post-traductionnelles. Finalement, les particules virales infectieuses, ou virions, sont libérées par exocytose (Figure 6)[32,35,36].

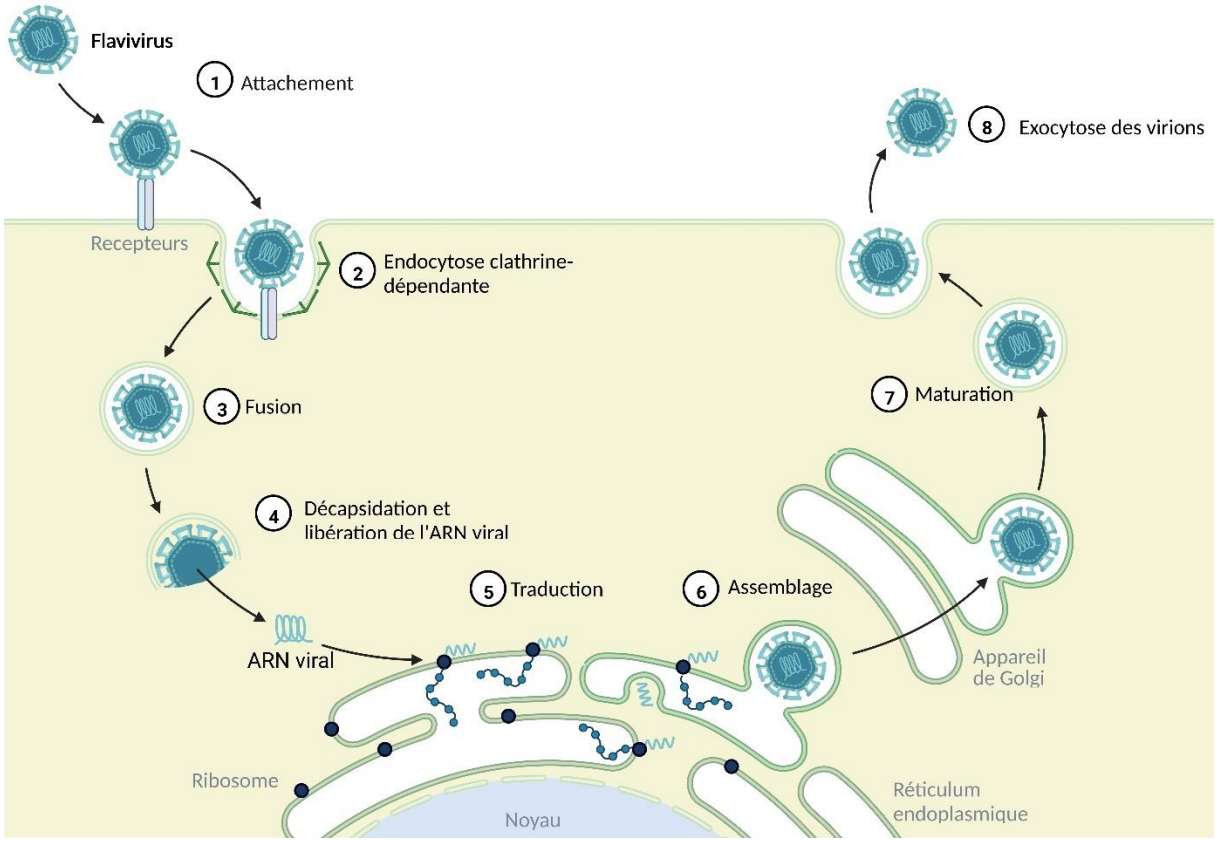


Figure 6 Cycle viral de réplication des *Flavivirus* dans une cellule hôte.
Lors de cycle de réplication, les *Flavivirus* vont dans un premier temps s'attacher à la cellule hôte via des interactions avec les récepteurs, ils sont ensuite endocytés dans des endosomes de manière clathrine-dépendante. L'acidification de l'endosome permettra la fusion, puis la décapsidation libèrera le génome viral. Celui-ci va être directement traduit au niveau des membranes du réticulum endoplasmique, puis la réplication du génome se fera grâce au complexe de réplication faisant intervenir les protéines NS. Enfin les nouvelles particules virales sont assemblées, puis maturent dans l'appareil de Golgi pour être ensuite exocyter, réalisation BioRender.

1.1.1.2 Le virus West-Nile

1.1.1.2.1 Distribution, épidémiologie

En 1937, au nord de l'Ouganda, dans le district West Nile, un patient présentant des symptômes fébriles a révélé le premier cas d'infection par WNV[37]. Dans les années qui ont suivi d'autres cas humains ont été découverts notamment en Egypte[38,39], puis en Europe avec une première apparition en Albanie en 1959[40]. Le virus s'est ensuite répandu plus globalement, jusqu'en France en 1962, plus précisément en Camargue, une région humide du sud de la France comportant des populations importantes de moustiques, d'oiseaux migrateurs et de chevaux[41]. Jusque dans les années 1990, les infections humaines par WNV sont restées anecdotiques, la plupart du temps asymptomatiques ou associées à des syndromes pseudo-grippaux, et limitées au continent africain et au bassin méditerranéen. En 1996, l'Europe connait une première épidémie de WNV en Roumanie avec 835 cas d'infections dont 17 décès[42], puis en Russie, en 1999, des cas de méningo-encéphalites sont associés à des infections par WNV avec environ 40 décès[43]. A la même période, les Etats-Unis connaissent aussi l'apparition du virus, à New-York, 59 patients présentant des troubles neurologiques

(confusion, encéphalites, méningites, paralysies flasques) ont été identifiés et 7 sont décédés[44]. Depuis le virus est devenue endémique de ces régions avec des données montrant la présence du virus au Canada, au Mexique, en Colombie et dans les Caraïbes[45]. Et chaque année, les Etats-Unis enregistrent un certain nombre de cas d'infection associée à des troubles neurologiques, par exemple, en 2021, 2 695 cas ont été identifiés dont 191 décès (données du CDC – ArboNet). En Europe, c'est en 2018 qu'une épidémie majeure a eu lieu touchant 2 083 individus dont 181 décès (Figure 7), alors qu'en 2020, 325 cas humains d'infection par WNV ont été recensés et en 2021, 159 cas dont 13 décès ont été identifiés (données ECDC, Figure 8). Les populations aviaires et équines ne sont pas épargnées par cette circulation de WNV. En effet en Europe des épizooties ont aussi été enregistrés, dont 220 cas d'infection équine et 21 décès en France en 2000[41]. En 1998 en Israël, on note aussi un épisode de mortalité aviaire inhabituelle associé au WNV[46].

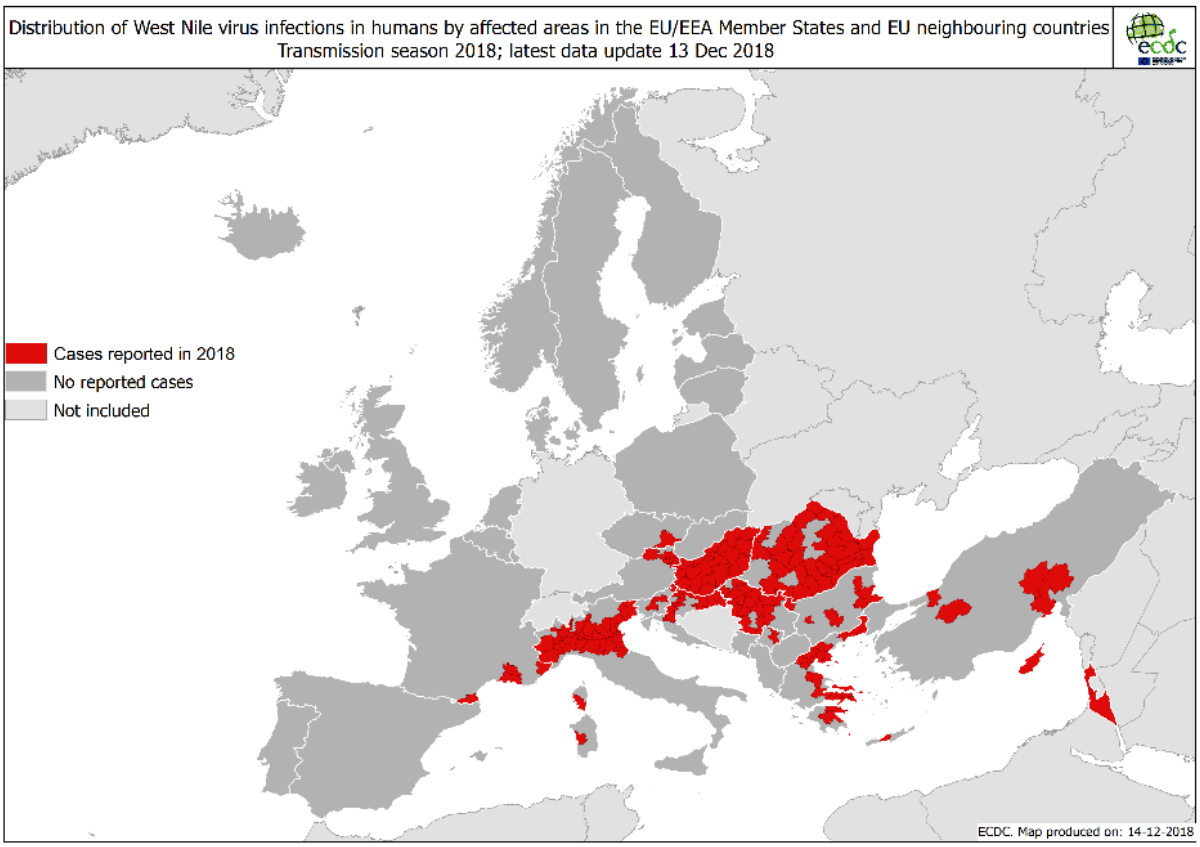


Figure 7 Localisation des cas humaines d'infection par WNV en Europe en 2018
En 2018 en Europe et dans les pays voisins, 2 083 cas d'infection humaine autochtone par WNV ont été recensés ce qui était plus important que le nombre total de cas sur les 7 dernières années, et 7.2 fois plus élevé qu'en 2017. Parmi ceux-ci, environ 68% ont déclaré des atteintes neurologiques et 180 décès ont été comptabilisés, d'après les données ECDC.

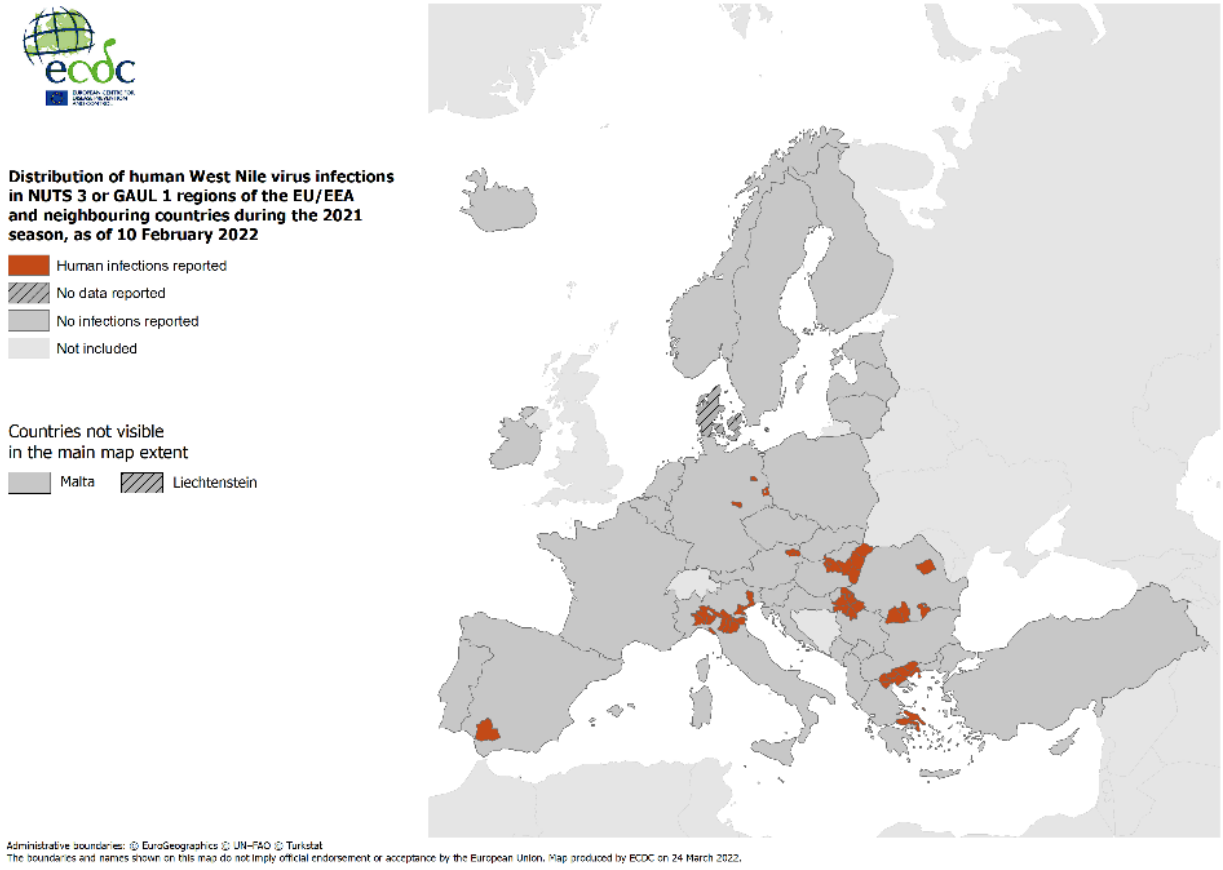


Figure 8 Localisation des cas humains d'infection par WNV en Europe en 2021
En 2021 en Europe et dans les pays voisins, 159 cas d'infection humaine par WNV ont été recensés dont 139 cas d'infection locale : en Grèce (59 cas), en Italie (55), en Hongrie (7), en Roumanie (7), en Espagne (4), en Allemagne (4) et en Autriche (3). Parmi ceux-ci, 13 décès ont été comptabilisés, d'après les données ECDC.

Il existe plusieurs lignées de WNV, neuf ont été identifiées et désignées à ce jour, dont les lignées 1 et 2 qui sont majoritairement représentées et à l'origine de cas neurotropiques[47]. Il se trouve que la lignée 1 est celle à l'origine du plus grand nombre de cas d'infections humaines et équines en Europe jusqu'en 2004, c'est aussi la lignée qui s'est répandue en Amérique du Nord et Centrale[48]. La lignée 2 circulant jusqu'alors dans la population aviaire, apparût dans la population humaine en Hongrie, puis elle se répandit en Europe et sur le pourtour méditerranéen[49]. En effet, en 2004, cette lignée fût à l'origine d'un nombre important de décès dans la population aviaire sauvage en Hongrie[50], puis elle fût à l'origine de plusieurs cas d'atteintes neuronales humaines, mais aussi équines et aviaires, dans le même pays en 2008[51]. La lignée 2 atteint ensuite la Grèce en 2010 et cause le décès de 34 personnes parmi les 197 cas d'infections associées à des atteintes neuronales[52]. Durant l'épidémie de 2018, on retrouve le plus souvent une association entre le développement d'atteintes neurologiques et l'infection par la lignée 2, notamment en Hongrie ou en Espagne[53,54]. En 2020, en Allemagne, une étude a montré une dizaine de cas d'infection dont 7 ayant présentés des complications neurologiques et la moitié ont été associé à des infections par la lignée 2 (les autres n'ont pas pu être identifiées)[55].

1.1.1.2.2 Cycle enzootique

Le cycle de transmission du virus WNV fût décrit pour la première fois en 1956 (Figure 10)[39]. Le réservoir du virus WNV est aviaire, plusieurs espèces d'oiseaux peuvent être retrouvées comme hôtes amplificateurs du virus. Parmi eux, les *Charadriiformes, Falconiformes* (faucon pèlerin), les *Passeriformes* (moineaux par exemple), et les *Strigiformes* (comme les chouettes) sont des réservoirs courant du virus de par le développement d'une forte virémie et de fort taux de transmission suite à l'infection[56,57]. Cependant cette virémie élevée ne s'accompagne pas forcément du développement de la maladie, comme chez les moineaux[58]; par contre certaines espèces sont particulièrement susceptibles à l'infection. Les corneilles d'Amérique ou le Grand Corbeau par exemple ont une mortalité très élevée associée à cette infection qui peut être dû à la virulence de la lignée WNV circulant dans les zones où se trouvent ces espèces[59,60]. Les réservoirs aviaires de WNV sont un facteur important dans l'épidémiologie du virus puisqu'ils sont capables de migrer et donc de transmettre le virus sur de grandes zones, notamment en Europe où on retrouve des régions particulièrement importantes pour la migration des oiseaux comme le delta du Rhône en France[61].

Les vecteurs du virus WNV qui vont s'infecter par un repas sanguin sur les hôtes amplificateurs aviaires, ont été désignés sur de nombreuses espèces et genres différents, avec plus de 60 espèces identifiés aux Etats-Unis dont des moustiques du genre *Culex*[62,63]. En Afrique, les principaux vecteurs sont des *Culex* (*C. univittatus* et *C. theileri*) et en Europe il s'agit du moustique *C. pipiens*[64–66]. Parmi ces différents moustiques, une étude a montré la susceptibilité des espèces *Aedes albopictus*[67]. A la suite du repas sanguin, c'est dans l'estomac que le virus va infecter les cellules épithéliales, puis passer dans l'hémolymphe et atteindre les glandes salivaires[68,69]. Lors du prochain repas, et lorsque le moustique hématophage va chercher les vaisseaux sanguins, il libérera de la salive contenant des particules infectieuses dans l'épiderme, le derme, et dans une moindre mesure, le sang[70].

Les réservoirs aviaires et les vecteurs moustiques sont donc à l'origine du cycle primaire de WNV, cependant les vecteurs peuvent aussi infecter des hôtes accidentels. Ces hôtes seront des impasses épidémiologiques puisque la virémie développée suite à l'infection est trop faible pour permettre l'infection d'un nouveau vecteur[71]. On retrouve des hôtes accidentels principalement parmi les populations équines et humaines[72] mais de façon anecdotique le virus a aussi pu être retrouvé chez d'autres mammifères[73–75], chez des reptiles[76] et des amphibiens[77].

En dehors du cycle enzootique, la transmission humaine du virus WNV a été décrite dans un cadre professionnel, en effet des accidents de laboratoire ont été à l'origine de transmission de WNV[78,79]. Certains *Flavivirus* comme ZIKV sont malheureusement connu pour avoir une transmission verticale intra-utérine, concernant WNV il semble que l'infection de souris pendant la grossesse entraine des avortements, des accouchements prématurés et des décès chez les nouveau-nés.

Cependant, chez l'humain aucun décès n'a été reporté, mais quelques naissances avec des choriorétinites, des troubles neuronaux ou respiratoires sévères ont été recensés[80]. D'autres travaux ont montré une transmission possible par le lait maternel[81] posant alors des questions sur la prévention de cette transmission et les effets de l'exposition de jeunes enfants au virus[82]. Une autre étude plus récente a évoqué la possibilité d'une transmission sexuelle du virus[83]. Enfin une problématique majeure de l'infection par WNV est la transmission lors de transplantation d'organes[84] ou lors de transfusion sanguine[85,86]. Des surveillances renforcées sur les transfusions sanguines ont d'ailleurs été mises en place en période de circulation importante des arbovirus[8,87–89].

1.1.1.2.3 Pathologie

Après inoculation du virus par le vecteur au site d'infection, celui-ci va pouvoir infecter des cellules du derme et de l'épiderme : notamment les kératinocytes, et les cellules immunes résidentes de la peau, majoritairement des cellules dendritiques (*dendritic cell*, DC) ou des cellules de Langerhans. Par la suite, le virus pourra atteindre les ganglions lymphatiques puis la circulation sanguine et différents organes dont la rate et les reins[90]. Dans un second temps, le virus pourra éventuellement atteindre le système nerveux central (SNC) entrainant des complications neurologiques (dans environ 1% des cas) parfois mortelles. Généralement, 80% des cas d'infections humaines sont asymptomatiques, la plupart des autres cas correspondent à une fièvre dite de West-Nile (*West-Nile fever*, WNF) accompagnée de céphalées, fatigue, douleurs musculaires/articulaires, parfois de symptômes gastro-intestinaux ou de rash cutanées. Des cas d'hépatites, pancréatites, myocardites, rhabdomyolyses, orchites et atteintes oculaires ont été reportés[62]. Enfin moins de 1% des patients infectés développent une maladie neuronale qui se manifeste principalement par une méningite, une encéphalite ou une méningo-encéphalite. Les risques de développer une encéphalite augmentent avec les facteurs de risques tels que l'âge, l'hypertension artérielle ou l'immunodépression par exemple[91]. Les patients présentant une encéphalite ont aussi plus de risque de décéder et peuvent subir des symptômes parkinsoniens ainsi que des tremblements. Parmi les patients développant des atteintes neuronales (dit *West-Nile neuro-disease*, WNND), environ 10% peuvent en décéder[92]. L'infection peut aussi se propager dans les neurones moteurs causant des paralysies flasques aigues de type poliomyélite, et des syndromes de Guillain-Barré ont pu être observés dans certains cas[62]. Les patients en convalescence peuvent avoir des séquelles de l'infection avec des maladies rénales chroniques ou des séquelles neurologiques et cognitives[93].

Tout comme chez l'humain, l'infection équine par WNV peut entrainer des complications neurologiques comme des encéphalites avec un taux de mortalité très important[41,94]. Il existe toutefois un vaccin équin qui n'est malheureusement pas encore assez déployé pour permettre une couverture vaccinale efficace.

1.1.1.3 Le virus Usutu

1.1.1.3.1 Distribution, épidémiologie

Le virus USUV fut découvert pour la première fois chez des moustiques *Culex neavei* en 1959, en Afrique du Sud, dans le Swaziland, près de la rivière Usutu[95]. Puis, en 1981, la première apparition humaine est identifiée en République Centre Africaine, avant une seconde en 2004 au Burkina Faso[96]. Par la suite le virus a été identifié dans plusieurs pays d'Afrique (Côte d'Ivoire, Maroc, Nigéria, Ouganda et Sénégal) possédant des programmes de surveillance ce qui suggère une plus importante distribution sur ce continent notamment dans les pays sans programme de surveillance adapté[96]. Le virus a probablement atteint le continent européen pour la première fois dans les années 50, en Espagne, puis il a été réintroduit entre 1970 et 1980 (en Italie et en Autriche), et une identification a été faite en 1996 associée aux décès d'un nombre important d'oiseaux[97,98]. En 2001, la première épizootie européenne apparait en Autriche[99], puis il fût découvert de façon parfois récurrente chez des animaux (oiseaux, chauve-souris et chevaux) et des vecteurs dans plusieurs pays d'Europe (Allemagne, Belgique, Espagne, France, Hongrie, Italie, République Tchèque et Suisse) suggérant son endémisation (Figure 9). En 2016 une nouvelle épizootie a été enregistrée touchant plusieurs pays dont l'Allemagne, la Belgique, la France et les Pays-Bas[100,101]. Concernant le reste du globe, le virus a été identifié dans des vecteurs moustiques (*Cx. perexigus*, *Cx. pipiens* et *Ae. Albopictus)* en Israël[102].

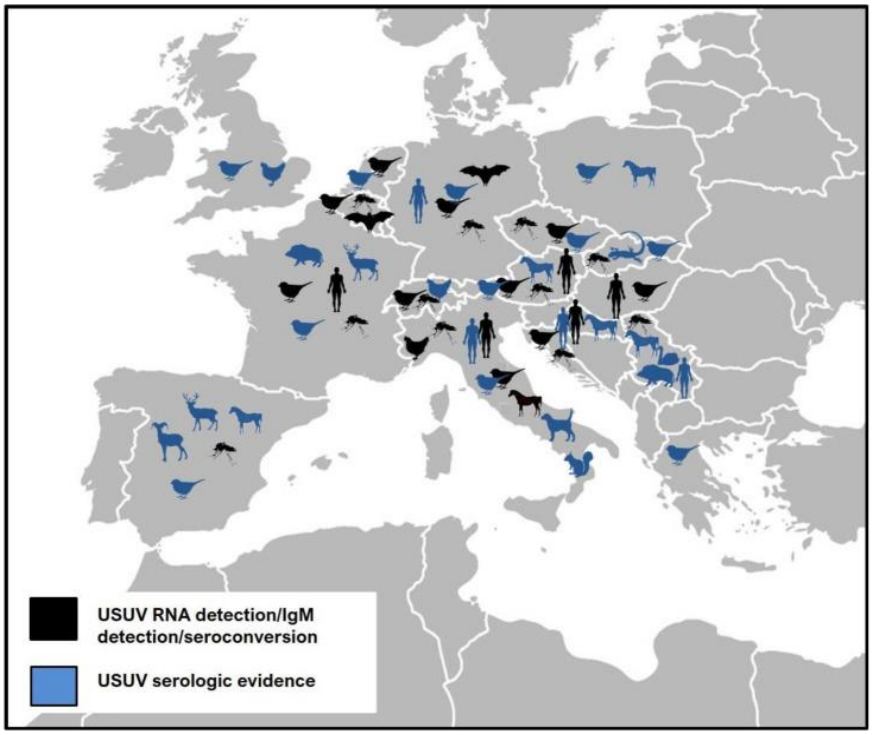


Figure 9 Distribution du virus Usutu en Europe selon la nature de l'identification
L'ARN d'USUV ou des anticorps précoces contre USUV (immunoglobulines de type M, IgM) ont été détectés chez des vecteurs moustiques, des hôtes aviaires et mammifères (humains et chevaux) dans plusieurs pays européens (Allemagne, Autriche, Belgique, Croatie, Espagne, France, Hongrie, Italie, Pays-Bas, République Tchèque, Serbie, Slovaquie et Suisse). De plus, notamment en Angleterre, en Grèce et en Pologne, des anticorps IgG (immunoglobulines de type G) contre USUV ont été retrouvés dans des hôtes aviaires, mammifères (chiens et sangliers) et reptiles ; d'après T. Vilibic-Cavlek *et al.*, 2020.

A la suite des premières détections humaines du virus USUV en Afrique (en République Centre Africaine et au Burkina Faso)[96], c'est en Italie en 2009 que le virus a été identifié comme responsable de maladie chez deux patients immunodéprimés[103,104]. Ensuite d'autres cas humains ont été révélés en Italie, mais aussi en Croatie, avec des patients présentant des méningites ou des méningo-encéphalites et dont la plupart étaient associés à des comorbidités. Cependant lorsque des études plus élargies ont été conduites (sur des patients asymptomatiques), USUV fût identifié en Allemagne et en Autriche, parfois suite à la recherche de WNV[105]. De la même façon, lors d'une étude rétrospective réalisée au laboratoire et sur laquelle j'ai pu participer, nous avons aussi pu identifier un cas d'infection par USUV associé à une paralysie faciale et ainsi mis en évidence le premier cas humain en France[106]. Depuis environ 100 cas d'infection par USUV ont été révélés globalement, dont une trentaine associée à des atteintes neuro-invasives (Figure 9)[53,105,107–110].

Selon leur localisation lors de l'isolement, les différentes lignées d'USUV sont répertoriées en trois Africaines et cinq Européennes. Ainsi on retrouve la lignée Africa 1 (isolée en République Centre Afrique en 1969), la lignée Africa 2 (isolée en Afrique mais aussi en Europe et notamment en France) et la lignée Africa 3 (à l'origine du cas humain en République Centre Afrique mais aussi isolée à plusieurs reprises en Europe et notamment en France). La lignée Europe 1 a été associée à une souche Sénégalaise puis a été retrouvée en Europe et notamment lors de la première épizootie européenne, et chez des humains en Italie. La lignée Europe 2 est, quant à elle, la plus répandue et très souvent associée à des cas d'infections présentant des complications neurologiques comme en République Tchèque et en Italie. En Allemagne, en Belgique et en France, la lignée Europe 3 a été plusieurs fois identifiée ; alors que la lignée Europe 4 a été retrouvée uniquement en Italie et parfois associée à des cas d'infection humaine. Enfin la lignée Europe 5 a été récemment identifiée en Allemagne[100,111].

Tout comme WNV, USUV a vraisemblablement été dispersé à l'aide des migrations de son hôte réservoir aviaire depuis l'Afrique vers l'Europe, et tout comme WNV, il pourrait potentiellement émerger en Amérique du Nord[112] ou en Amérique latine[113]. Ces circulations virales expliquent les multiples introductions du virus en Europe depuis l'Afrique et les différentes lignées apparues qui sont aussi dû au cycle de transmission[111].

1.1.1.3.2 Cycle enzootique

Les oiseaux sont les réservoirs et les hôtes amplificateurs d'USUV. Une étude menée en Allemagne a montré des sérologies positives contre USUV dans plus de 140 espèces aviaires dont des *Passeriformes*, *Falconiformes* et *Strigiformes* (comme WNV)[114], parmi celles-ci les plus susceptibles à l'infection sont les merles noirs chez qui on retrouve des taux de mortalité particulièrement élevés[115], mais aussi les moineaux[116]. De façon générale, l'infection aviaire par USUV entraine des hépatomégalies et des splénomégalies mais aussi des lésions cardiaques, hépatiques, rénales ou des

atteintes de la rate et du cerveau[117], ce qui a conduit aux épisodes d'épizootie aviaire importants en Europe ces dernières années[118,119]. De manière similaire au virus WNV, USUV aurait donc été introduit en Europe par des oiseaux migrateurs infectés comme le faucon crécelle (*Falco tinnunculus*) puis il se serait dispersé en Europe via la circulation d'espèces européennes comme les merles noires et les moineaux[96].

Comme son cousin WNV, les vecteurs principaux de USUV sont les moustiques *Culex* : *C. pipiens*[120], *C. navei* et *C. quinquefasciatus*[121]. L'infection est également possible chez des moustiques du genre *Aedes* comme *A. japonicus* ou *A. albopictus* ou encore chez des anophèles[122] mais ils sont beaucoup moins efficients dans la transmission du virus[123].

Des hôtes accidentels sont aussi retrouvés pour USUV puisque les vecteurs sont capables de transmettre l'infection à plusieurs espèces dont les chevaux[124,125], les chiens[74,125,126], les sangliers[127], des ruminants[128] ou des rongeurs[129]. Enfin, les infections humaines sont aussi possibles comme évoqué précédemment, avec un développement symptomatique dans certains cas (Figure 10)[130]. La transmission non vectorielle d'USUV n'a encore jamais été reportée cependant tout comme WNV le risque de transmission lors de transfusion sanguine n'est pas à exclure même si la virémie semble faible et transitoire[131].

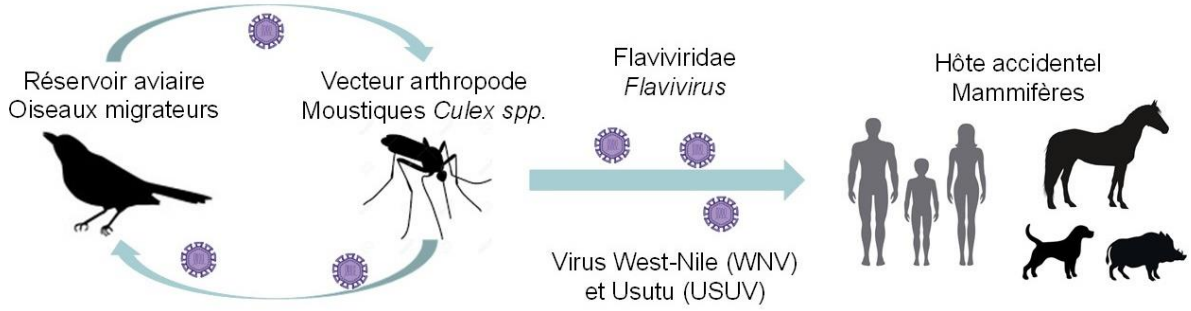


Figure 10 Cycle enzootique des virus West-Nile et Usutu via une transmission vectorielle
Les oiseaux, souvent sauvages et migrateurs, sont les hôtes amplificateurs et réservoirs des virus USUV et WNV, les vecteurs arthropodes de type moustique (et principalement les espèces *Culex spp.*) permettent la transmission et le maintien du cycle enzootique. Ils peuvent aussi infecter des hôtes accidentels comme les mammifères qui représentent des impasses épidémiologiques, réalisation BioRender.

1.1.1.3.3 Pathologie

Lors de la découverte du virus dans les premiers cas humains en Afrique, les patients en question ont présenté un syndrome pseudo-grippal avec de la fièvre et un rash cutané[96]. Puis l'apparition des cas en Italie a révélé des symptômes neuronaux avec des méningo-encéphalites associées aux cinq premiers cas italiens identifiés en 2009[103,104,132]. Toujours en Italie, des manifestations cliniques d'infection par USUV ont montré des encéphalites et d'autres méningo-encéphalites[133]. Plus récemment en France un cas de paralysie faciale *a frigore* a été révélé par notre équipe[106]. Ainsi, le faible nombre de cas d'infection humaine par USUV ne permet pas encore de définir

la pathogénèse du virus mais étant donné les analyses sérologiques effectuées, et comme WNV, il induirait une majorité de cas asymptomatiques, 20 à 30% de cas pseudo-grippaux et enfin environ 1% de cas neuroinvasifs[134]. En effet, s'ajoute aux données cliniques d'infection par USUV, les données sur l'exposition au virus dans les populations européennes. Notamment, en Italie, en Serbie et en Allemagne, des études sur des échantillons biologiques de donneurs de sang, de patients de tout type ou de personnes dites à risque (comme les travailleurs forestiers ou des personnes exposées à la transmission), ont révélé des proportions importantes d'exposition à USUV. La séroprévalence montre une exposition de 0.02% à 1.1% chez les donneurs de sang allemands et italiens[135–137], une proportion de 7.5% chez des individus sains en Serbie[138], et de 18% chez les travailleurs en forêt d'Italie[139]. Et une plus large étude menée sur 900 personnes dont un tiers présentaient une atteinte cérébrale, a révélé 6.5% d'individus porteurs d'anticorps contre USUV[133]. Ces travaux montrent une circulation importante et non négligeable du virus dans la population de plusieurs pays européens[140]. Il est par ailleurs possible qu'une virulence différentielle soit induite chez l'humain en fonction des lignées comme cela a été suggéré par plusieurs études *in vitro* et *in vivo*[141–143].

1.2 Virus respiratoires

Mise à part les virus transmis par des vecteurs comme les arbovirus, il existe aussi de nombreux autres virus émergents à potentiel épidémique et souvent d'origine zoonotique. Parmi ceux-ci, les virus respiratoires représentent un large groupe de virus, pouvant être zoonotiques et associés à des risques importants d'émergence. Par exemple, le virus de la grippe, est à l'origine d'émergence cyclique, il passe régulièrement la barrière animale, et peut rapidement s'adapter à l'humain[144]. De façon générale les virus émergents à l'origine de maladies respiratoires sont une problématique majeure de santé publique, comme l'illustre la pandémie actuelle liée au SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)[145].

1.2.1 Le SARS-CoV-2

Le 31 décembre 2019, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est informée de cas de pneumonie d'origine inconnue provenant de la région de Wuhan en Chine, et ce dans le cadre de son programme de surveillance épidémiologique[146]. Depuis le virus responsable de ces infections a été identifié, sous l'appellation de SARS-CoV-2, et est responsable de la crise sanitaire, associée à la maladie Covid-19 (*Coronavirus disease 2019*)[147].

1.2.1.1 Classification et généralités

Les *Coronaviridae* sont une famille virale regroupant 4 genres connus : alpha, bêta, gamma et delta-coronavirus. Les premiers *Coronavirus* infectant l'humain furent découverts dans les années 1960, actuellement, ces *Coronavirus* se limitent aux genres alpha et bêta[148]. Le SARS-CoV-2 est un β-coronavirus enveloppé. Il possède des protéines d'enveloppe (E) protégées par des protéines membranaires (M) se liant aux nucléoprotéines (N) pour maintenir le génome. L'enveloppe sphérique est parsemée de protéines de surface (S) en forme de spicule aussi connues sous le nom de « spike », visibles en microscopie électronique et qui leur donne un aspect de couronne d'où ils tirent leur nom. La taille du virion est d'environ 80 à 160nm de diamètre (Figure 11)[149].

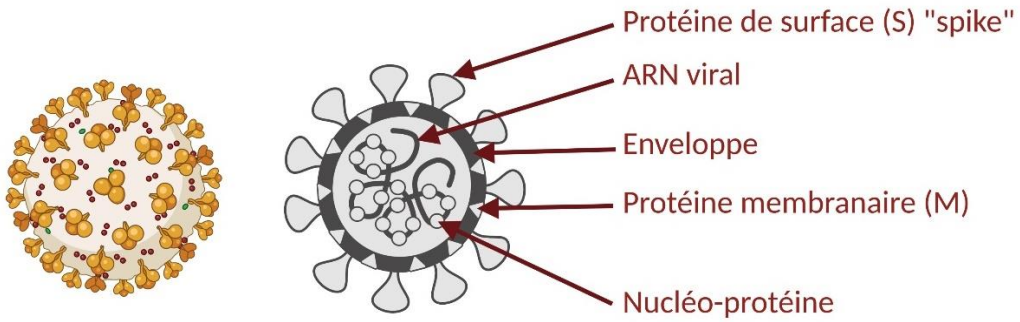


Figure 11 Représentation schématique d'une particule virale de SARS-CoV-2
Image représentant une vue de la surface des *Coronavirus* (à gauche) et schéma représentant l'enveloppe des *Coronavirus* ornée de la protéine de surface leur donnant un aspect de couronne, les protéines membranaires M et d'enveloppe E se lient aux nucléoprotéines pour maintenir l'ARN viral, réalisation BioRender.

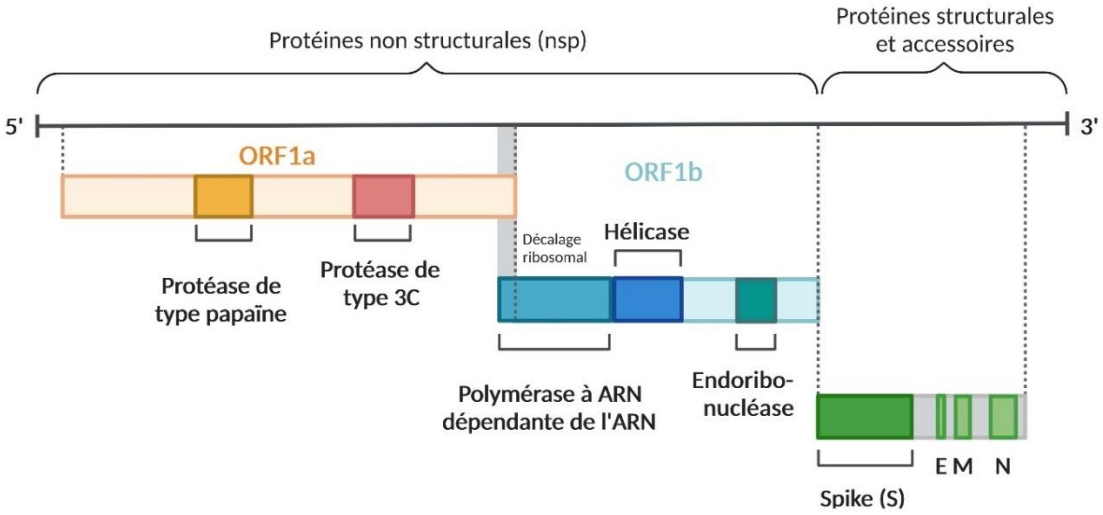


Figure 12 Organisation génomique du SARS-CoV-2
Le génome viral des *Coronavirus* est le plus grand connu parmi les génomes à ARN. Il comprend deux cadres de lecture à l'extrémité 5' (ORF1a et ORF1b) codant pour les 16 protéines non structurales (nsp) ; puis les gènes codant pour les protéines structurales de surface (S), de l'enveloppe (E), de la membrane (M) et de la nucléocapside (N), réalisation BioRender.

Le génome viral est un des plus grands génomes à ARN connus, sa taille est comprise entre 26 000 et 32 000 paires de bases. Il s'agit d'un ARN sb + comportant une coiffe à l'extrémité 5' et, contrairement aux *Flavivirus*, une queue polyadénylée en 3'. Il présente 2 cadres de lecture (*open*

reading frame, ORF) codant pour 16 protéines non structurales (nsp) (Figure 12). Lors de la traduction, ces nsp s'assemblent entre elles et forment le complexe réplicase-transcriptase qui est fondamental pour la réplication et la transcription de l'ARN génomique viral. Chaque nsp aura une fonction particulière comme nsp12 qui possède l'activité RdRp. Par ailleurs, 4 protéines de structure sont codées : la protéine de surface (S), la protéine d'enveloppe (E), la protéine membranaire (M) et la nucléoprotéine ou nucléocapside (N) ; ainsi que 8 protéines dites accessoires dont les fonctions sont encore étudiées mais qui ont un rôle dans la réplication virale et pourraient moduler la réponse immune de la cellule hôte[150,151].

Cycle viral

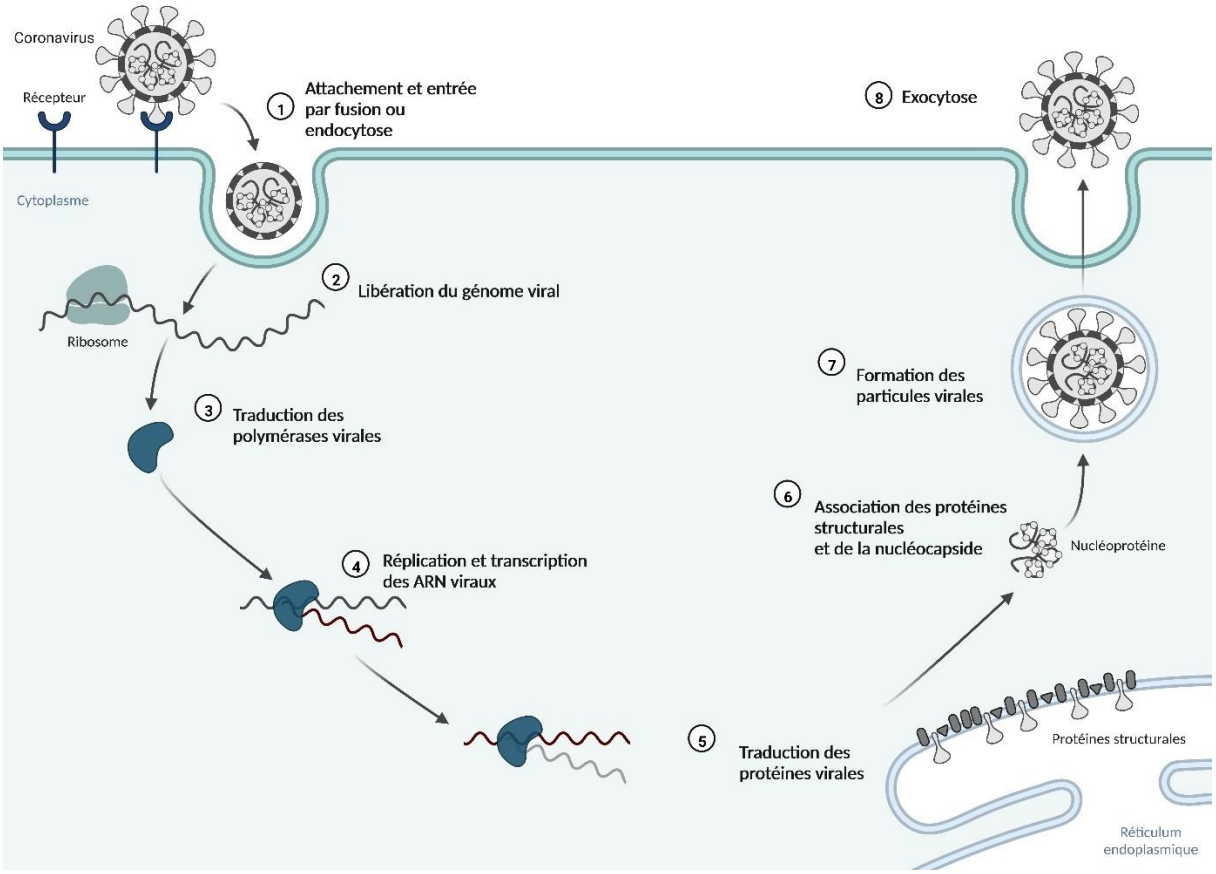


Figure 13 Cycle viral des *Coronavirus* dans une cellule hôte
L'attachement des *Coronavirus* aux cellules hôtes se fait par liaison de la protéine S avec son récepteur, puis l'entrée se fait par fusion membranaire suite à l'action de clivage de TMPRSS2, ou via une endocytose. La libération du matériel génétique entraine une traduction des protéines dont nsp12 permettant la réplication du génome viral dans les vésicules à double membrane dérivées du réticulum endoplasmique. Les ARN sous-génomique issus de la transcription sont traduits en protéines virales permettant l'assemblage des nouvelles particules virales libérées par exocytose, réalisation BioRender.

La liaison de la glycoprotéine S à son récepteur cellulaire ACE-2 va permettre de débuter le cycle viral[152]. L'entrée peut s'effectuer par une fusion directe des membranes suite au clivage de la protéine S par le cofacteur TMPRSS2, ou par endocytose suivie d'une fusion endosomale liée à l'activité des cathepsines B et L[153,154]. Cette fusion libère l'ARN viral dans le cytoplasme qui pourra alors être

traduit et permettre la réplication et la transcription, grâce à la polymérase nsp12. Cette réplication se déroule dans des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique appelées vésicules à double membrane et induites par le virus afin de créer un environnement favorable à la réplication grâce à la protéine nsp4[155]. Finalement la transcription donnera les ARN sous-génomiques, eux-mêmes traduits en protéines structurales et non-structurales, et assemblés au niveau du réticulum endoplasmique. Les particules virales seront ensuite libérées par exocytose ou par voie lysosomale (Figure 13)[156].

1.2.1.2 Epidémiologie

Les *Coronavirus* sont capables d'infecter une grande variété d'animaux dont les chats, les chiens, les chauves-souris, les humains, les porcs et les rongeurs. Les HCoV sont des *Coronavirus* humains endémiques responsables d'infections des voies respiratoires supérieures et de rhumes saisonniers[157,158]. Les *Coronavirus* responsables d'épidémies plus sévères sont à l'origine d'infection des voies respiratoires basses pouvant être associées à des syndromes respiratoires aigües sévères (SARS) et pouvant avoir des effets délétères sur d'autres organes[159,160]. Ces *Coronavirus* épidémiques auraient comme origine la chauve-souris, chez qui il a été trouvé un virus présentant 96.2% de similarité avec le SARS-CoV-2[161]. De façon hypothétique, le SARS-CoV-2 aurait donc émergé chez l'humain de son réservoir, la chauve-souris, via un hôte intermédiaire encore non déterminé[152]. Suite à son émergence, le virus s'est très rapidement dispersé sur l'ensemble du globe[159]. Sa transmission se fait principalement via les aérosols contaminés d'où les mesures de prévention mise en place avec la ventilation, le port du masque et le maintien de distance de sécurité[162]. Du fait de sa circulation extrêmement rapide et de sa nature génomique notamment, le SARS-CoV-2 a connu de nombreuses mutations et plusieurs variants ont donc émergés. On peut citer les variants qui ont été ou qui sont de nature préoccupante actuellement, selon l'OMS : alpha (B.1.1.7), bêta (B.1.351), gamma (B.1.1.28.1), delta (B.1.617.2) ou omicron (B.1.1.529 et ses sous-variants)[147,149].

1.2.1.3 Pathologie

Comme évoqué ci-dessus, l'infection par le SARS-CoV-2 se fait au niveau des voies respiratoires supérieures lors de l'inhalation d'aérosols contaminés, le virus se multiplierait d'abord dans les cellules épithéliales ciliées donnant lieu à l'apparition de rhinite, de toux et parfois de fièvre et de douleurs articulaires[163,164]. Puis il peut atteindre les voies respiratoires basses, et la circulation sanguine. Durant cette période le virus se réplique dans les cellules exprimant le récepteur ACE-2 c'est-à-dire les pneumocytes de type 2 de l'épithélium alvéolaire, mais aussi des cellules cardiaques, rénales, du tractus gastro-intestinal, les macrophages ou encore les cellules des endothéliums sanguins[165,166].

En plus des effets directs sur l'épithélium respiratoire et sur le tractus respiratoire entrainant le SARS, le virus a révélé une multitude d'effets délétères lors de l'infection humaine et notamment des complications cardiovasculaires[167]. Lors de l'infection des poumons, une forte activation des voies interleukines (IL-1β/IL-6) entraine un choc cytokinique qui peut être contrôlé rapidement dans les cas de pneumonie avec récupération des patients mais qui peut aussi induire des effets délétères sur les endothéliums et les organes périphériques[168,169]. Des patients ont aussi montré le développement de complications et d'atteintes neurologiques (anosmie, agueusie, encéphalite, crise épileptique, choc hémorragique) soulevant alors la question du neurotropisme du SARS-CoV-2[170]. Les mécanismes liés à la neuroinfection par ce coronavirus sont encore sous investigation, mais il semblerait que le virus soit capable d'infecter des nerfs en périphérie, notamment au niveau du bulbe olfactif, et que l'inflammation systémique puisse avoir un rôle dans la dérégulation des endothéliums cérébraux, nous reviendrons sur ces aspects dans la section dédiée (en 3.5.3)[171].

Un dernier aspect important dans la pathogénèse de l'infection par SARS-CoV-2 est l'effet et les conséquences au long terme de l'infection. En effet, de nombreux patients vivent aujourd'hui avec des séquelles liées à l'infection par ce *Coronavirus*, dont des états de fatigue prolongés et une perte de qualité de vie[172]. De plus certains patients peuvent présenter des formes chroniques de Covid-19, entrainant alors des résistances face au vaccin ou à l'immunité acquise, et l'apparition potentielle de nouveaux variants[173].

1.2.1.4 Traitement

Trois antiviraux ont été approuvés et sont utilisés dans certains pays pour le traitement de la Covid-19. Le remdesivir cible la polymérase virale dépendante de l'ARN, le paxlovid inhibe la protéase viral 3CL (aussi appelé M^{pro}) et le molnupiravir est un analogue nucléosidique inhibant la réplication virale. D'autres antiviraux sont en cours de recherche ou de développement, dont des inhibiteurs de protéases ciblant en particulier TMPRSS2[174]. Il existe différents anticorps neutralisants et ciblant le SARS-CoV-2, dirigés contre la protéine de surface (S), ils empêchent l'entrée du virus dans la cellule hôte. Leurs régions Fc permet aussi les fonctions effectrices et donc la cytotoxicité contre les cellules infectées[175,176]. En France, les recommandations portent sur l'utilisation du paxlovid en traitement curatif et celle d'anticorps monoclonaux. La Haute Autorité de Santé (HAS) a autorisé l'utilisation du strovimab en curatif, et de la bithérapie tixagevimab/cilgavimab en préventif. Dans les formes plus graves la prise en charge comprend une oxygénothérapie et l'assistance respiratoire.

La stratégie de vaccination utilisée contre la Covid-19 repose aussi sur un ciblage de la protéine S. En France, 4 vaccins sont actuellement utilisés : 2 contiennent des ARN messagers, et les 2 autres sont des vecteurs viraux, ils permettent d'acquérir des anticorps neutralisants contre le virus.

Cependant l'apparition des nouveaux variants (notamment omicron) a révélé une diminution d'efficacité de ces vaccins[177]. Ceci reflète l'importance des rappels dans la prise en charge vaccinale mais aussi l'importance des travaux faits dans la recherche et le développement de nouveaux traitements et vaccins contre la Covid-19[178].

1.3 Importance de la surveillance

Au XXème siècle, avec l'apparition des techniques de vaccination, la mise en place de mesure de prévention s'appuyant notamment sur l'importance de l'hygiène, ou la découverte des antibiotiques, les biologistes ont donné l'illusion que l'éradication des maladies infectieuses étaient possible. Pourtant, on découvre toujours plus d'agents pathogènes, principalement des virus, soulevant de nouveaux défis pour la santé publique en termes de prévention et de soins. Parmi ces défis, les virus émergents sont une problématique majeure pour la santé publique humaine et sont parmi les axes prioritaires de l'OMS. Les maladies infectieuses causées par ces virus émergents peuvent être des zoonoses dont il existe des transmissions inter-espèces régulières, comme pour le virus de la grippe, ou des maladies d'origine animale qui sont issues d'une transmission inter-espèce, mais qui se sont adaptées à l'humain et sont maintenues dans un cycle épidémiologique interhumain. Dans les deux cas, l'agent pathogène provient d'un réservoir animal[179]. Or, comme nous l'avons vu, les facteurs de risque d'émergence peuvent être l'activité humaine et ses liens avec la faune comme la chasse, la vente d'animaux sauvages et domestiques, ou les exploitations agricoles où cohabitent animaux et humains. Ces situations à risques de transmission appuient l'importance de la surveillance[180]. Ainsi, J. Blancou et F.-X. Meslin disaient : « L'étude clinique et épidémiologique immédiate de toute maladie animale émergente et l'évaluation de sa capacité à affecter la santé publique, même si son caractère zoonotique n'est pas avéré, sont essentielles au succès de sa surveillance, de son contrôle et de son éradication éventuelle.»[181].

Concernant les virus d'intérêt dans ce travail, l'étude et la surveillance épidémiologique du SARS-CoV-2 sont des outils indispensables à la préparation, notamment des services hospitaliers et pour la mise en place des mesures de prévention adaptées face aux vagues épidémiques[182]. De nombreux outils de prédiction ont ainsi été développés pour aider à la mise en place de stratégie efficace contre l'épidémie[183]. L'étude du réservoir et de l'histoire de la transmission du virus à l'humain est aussi indispensable à la compréhension de son émergence et pour la prévention de futurs émergences à potentiel pandémique[184]. Aussi, l'histoire de la crise sanitaire actuelle renforce l'idée de l'importance de la mise en place de réseaux plus solides et plus nombreux, à l'interface entre la faune et l'humain, dans un contexte « One Health » pour la surveillance des maladies infectieuses émergentes[185].

Les études séro-épidémiologique effectuées sur WNV et USUV ont révélé que les virus étaient devenus endémiques dans plusieurs pays européens, malgré cela WNV est aussi régulièrement à l'origine d'épidémie[186]. Ces *Flavivirus* partagent des conditions de transmission et de circulation très similaires, en 2018, quand l'épidémie de WNV toucha 16 pays européens, faisant 2 083 cas d'infection humains dont 181 décès (données ECDC), USUV fut lui à l'origine d'une épidémie aviaire majeure en Europe[134,187]. Dans le cas de WNV, la transmission non vectorielle ayant été montrée par transfusion de sang ou transplantation d'organe par exemple, la vigilance par rapport à la circulation du virus est d'autant plus importante pour pouvoir contrôler et diagnostiquer les personnes susceptibles de transmettre le virus aux plus à risque comme les patients transfusés ou transplantés[47].

Pour mesurer l'impact de leur circulation et anticiper les épidémies il est donc important de mettre en place des systèmes de surveillance. Des modèles de prédiction sont notamment établies afin d'anticiper les cycles saisonniers de ces virus, suivant les cycles des vecteurs, ou l'émergence dans un nouveau territoire suite au mouvement humain (par exemple le suivie des voyageurs)[188,189]. Pour cela la recherche d'une exposition antérieure ou actuelle aux virus peut se faire chez les réservoirs animaux. Nous disposons de techniques permettant la recherche de matériel génétique viral, qui présentent quelques limites notamment dans le cas des *Flavivirus* dû au fait que leur virémie est assez faible et très transitoire. On utilise plus souvent des techniques recherchant les anticorps dirigés contre les virus, là aussi il existe quelques limites dont la faible spécificité des tests ELISA existants dû aux réactions croisées rencontrées avec les *Flavivirus*, par exemple. Des tests de séroneutralisation plus spécifiques peuvent être utilisés pour affiner les résultats obtenus[190]. Par exemple, entre 2017 et 2018, en Allemagne, un nombre important d'échantillons aviaires ont révélé la présence d'ARN viraux d'USUV mais aussi la présence d'anticorps neutralisant contre USUV et WNV. Les résultats de cette étude, montrant une circulation locale et active de ces deux virus chez leurs réservoirs aviaires, appuient l'importance de la surveillance et renforcent la vigilance portée aux dons de sangs par exemple[114].

De manière générale, la surveillance de la circulation des virus émergents dans l'environnement, la faune et la population humaine deviennent des outils essentiels dans l'étude de ces virus, pour la prévention de leur émergence ou des épidémies, et la sauvegarde de ces mêmes domaines dont la santé publique[191].

2 Réponse immune aux infections virales

Face aux infections par des pathogènes, et notamment par des virus émergents, l'immunité innée et adaptative sont les deux grands pans de la réponse immunitaire humaine. La première comprend des mécanismes de défenses intracellulaires reposants sur des molécules pro- ou anti-inflammatoires, et elle est soutenue par des cellules immunes comme les macrophages, les monocytes, les DC, ou les cellules tueuses (*natural killer*, NK). Dans le cas de la défense contre les infections virales, l'immunité innée est particulièrement importante. L'immunité adaptative comprend les cellules lymphocytaires (ou lymphocytes) qui assurent une défense au long terme notamment par les mécanismes d'immunité humorale. Elle peut être mise en place suite à l'inflammation lors de la réponse innée[192]. Dans cette partie nous tenterons d'apporter des informations sur les généralités concernant le système immunitaire, les mécanismes de défenses antiviraux et les deux types de réponses immunitaires qui sont étroitement reliées.

2.1 Réponse antivirale cellulaire

2.1.1 Généralités sur l'immunité innée

Pour contrer les infections virales, des mécanismes sont mis en œuvre par les cellules hôtes. Elles peuvent détecter les agents étrangers par différents moyens. En effet, les agents infectieux étrangers possèdent des motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP) ou à un danger (*danger-associated molecular pattern*, DAMP) et peuvent être détectés via les récepteurs de reconnaissance de motif (*pattern-recognition receptor*, PRR) qui initient la réponse immunitaire innée. Les PAMP peuvent être des protéines bactériennes, parasitaires, fungiques ou virales par exemple ; en ce qui concerne les PAMP viraux il peut s'agir de protéines de l'enveloppe virale, d'enzymes virales, ou du génome viral lui-même[193].

Les PRR peuvent être de différents types, il peut s'agir de récepteurs cytoplasmiques comme les *NOD-like receptors* (NLR), majoritairement impliqués dans la reconnaissance bactérienne, de récepteurs transmembranaires et parfois solubles comme les récepteurs des lectines de type C (CLR)[194], ou de récepteurs spécialisés dans la détection de certains types de pathogènes, comme les *AIM2-like receptors* (ALR) détectant les virus à ADN. Dans la surveillance antivirale, les plus importants sont ceux de la famille Toll (*Toll-like receptor,* TLR) et ceux de la famille Rig-I (*Rig-I-like receptor,* RLR)[195,196]. Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires possédant un domaine à l'origine de la reconnaissance des PAMP et un domaine intracellulaire (TIR) activant des voies de signalisation telles que la voie MyD88 ou TRIF (*TIR-domain containing adaptor-inducing IFN-β*). Par exemple, les ARN db viraux présents dans des exosomes peuvent être détectés par le TLR-3, qui peut se coupler avec la

protéine TRIF alors que la détection des ARN sb viraux peut se faire grâce aux TLR-7 et -8 qui interagissent avec la protéine MyD88[197]. Dans le cytoplasme, les ARN sb et db viraux peuvent aussi être captés par des RLR comme le récepteur Rig-I ou MDA-5. Ces récepteurs possèdent des domaines CARD (*caspase activation and recruitment domain*) à l'extrémité N-terminale, un domaine hélicase (permettant la discrimination entre un ARN viral et du soi) et un domaine C-terminal (CTD). C'est ce domaine qui peut détecter l'ARN[198], et qui va enclencher l'interaction du domaine CARD avec le domaine CARD de la protéine MAVS (*mitochondrial anti-viral signaling*)[195,199]. Ces différentes réactions vont, *in fine* : activer NF-κB (*nuclear factor kappa B*) qui va induire la production de cytokines pro-inflammatoires ; et IRF-3/IRF-7 (*IFN regulatory factor-3/7*) qui activent la transcription d'interférons (IFN) de type 1 et d'ISG (*IFN stimulated genes*) (Figure 14)[200–202].

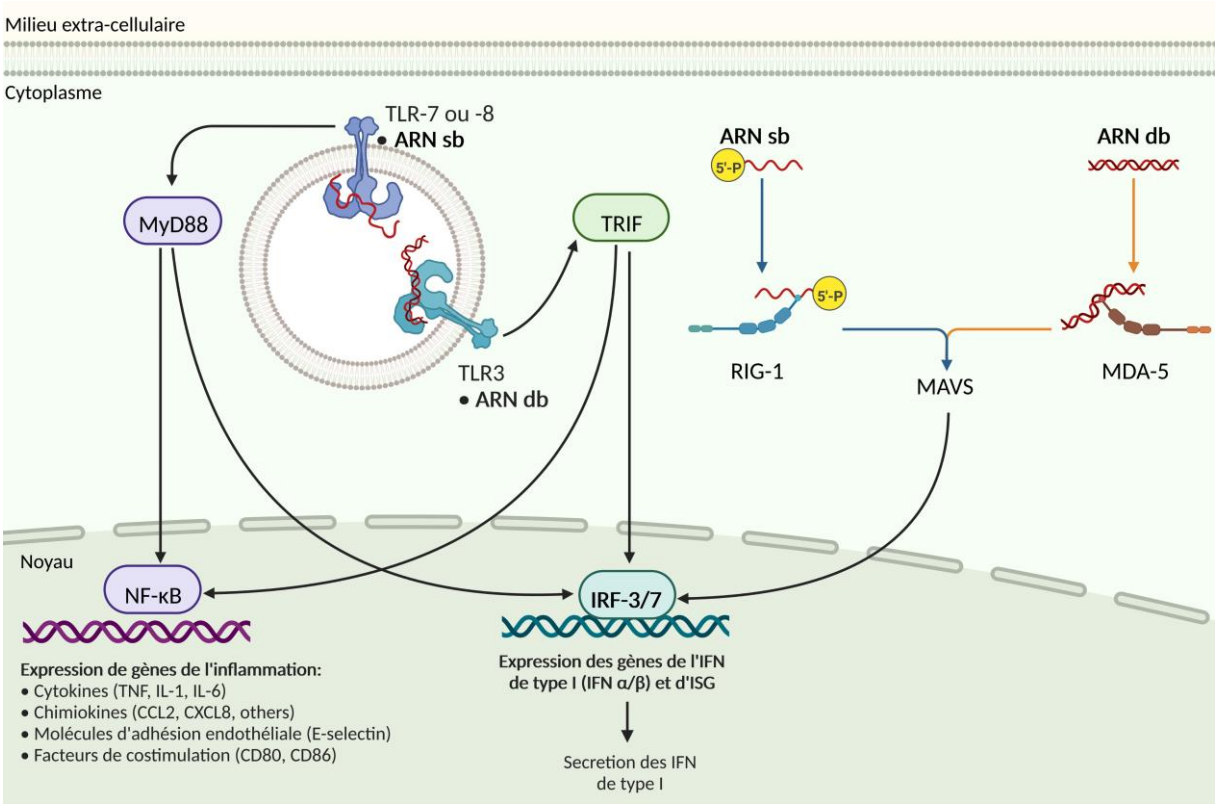


Figure 14 Initialisation de la réponse immune
Après détection de l'ARN viral sb par des PRRs (TLR-7 ou -8) il y a une activation de MyD88 alors que les ARN db détectés par TLR-3 permettent l'activation de TRIF. MyD88 et TRIF vont activer NF-κB permettant l'expression des gènes codant pour des protéines de l'inflammation (comme des cytokines ou des chimiokines) ou activer des IRF entrainant l'expression des gènes codant pour les IFN de type I. Dans le cytoplasme, les ARN sb peuvent être captés par RIG-I et les ARN db par MDA-5, ces deux détections activent la protéine MAVS qui induira aussi IRF et donc l'expression d'IFN, réalisation BioRender.

Les IFN peuvent interagir à toutes les étapes de la réplication virale[203–205]. Il s'agit d'une famille de molécule découverte en 1954 par Nagano Y. et Kojima Y., et en 1957 par Lindenman J. et Isaacs A. Ces chercheurs ont montré qu'une molécule pouvait être sécrétée par des cellules infectées pour communiquer avec d'autres cellules et interférer avec l'invasion du virus, ils l'ont appelée interféron[206,207]. Il existe trois types d'IFN : les IFN de type I sont l'IFN-α, l'IFN-β, l'IFN-ω, l'IFN-ε et l'IFN-

κ ; l'IFN- γ est de type II ; et les IFN de type III comprennent l'IFN λ[208]. Ils sont tous sécrétés par diverses cellules et peuvent se lier à des récepteurs distincts appelés IFNAR (pour les IFN de type I) ou IFNGR (pour les IFN de type II), par exemple[209]. Respectivement, les récepteurs IFNAR 1 et 2 peuvent interagir avec les protéines tyrosines kinases TYK2 et JAK1[210]. Ainsi l'IFN de type I qui se lie à son récepteur engendre la dimérisation de celui-ci qui activera la voie JAK1 via une phosphorylation[211]. A la suite de cela, les protéines STAT peuvent être phosphorylées à leur tour ce qui implique la formation de dimères pouvant collaborer avec IRF-9, migrer dans le noyau et interagir avec l'ADN cellulaire pour induire l'expression des ISG et ISRE (*IFN-stimulated response elements*) (Figure 15)[212,213].

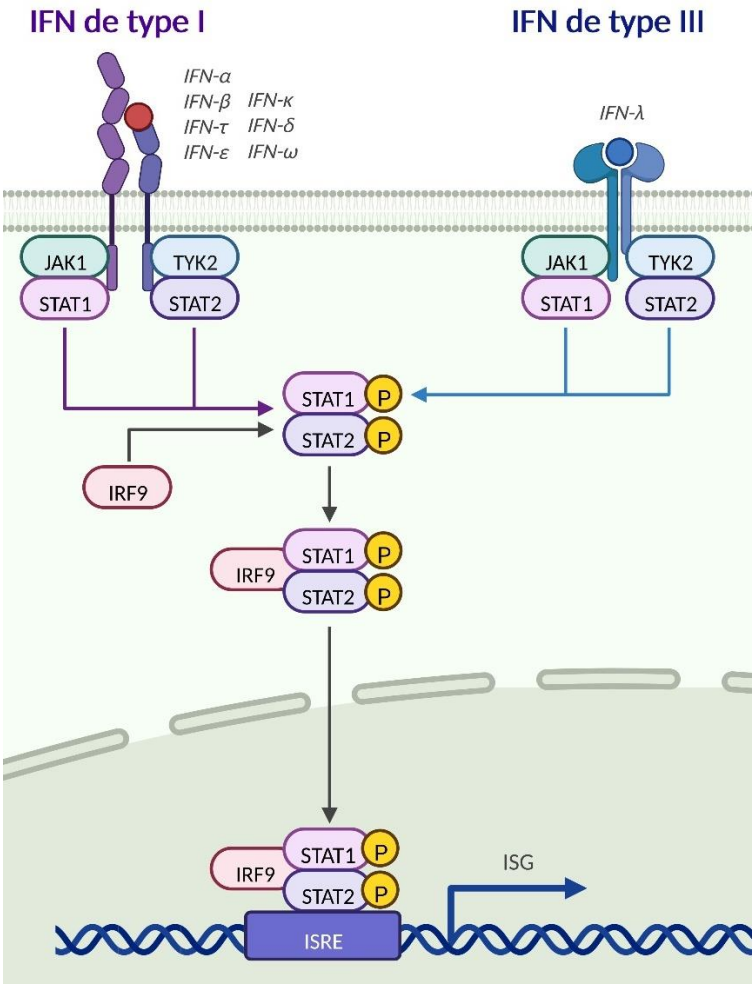


Figure 15 Voies d'activation de la réponse à l'interféron
Les IFN se liant à leur récepteur entrainent une interaction avec las protéines tyrosines kinases JAK1 et TYK2 ce qui donne lieu à la phosphorylation des protéines STATs alors capables de recruter l'IRF-9. Ce recrutement permet la migration nucléaire et l'expression des ISG (comme les OAS et PKRs) via l'interaction avec ISRE, réalisation BioRender.

Les ISG peuvent coder pour différents types de molécules qui peuvent être régulatrices sur la production d'IFN, et surtout leur fonction antivirale, générale ou spécifique, peut intervenir sur toutes les phases de réplication du virus[214]. Leur expression sera fonction du type de cellules, de la concentration en IFN et de la durée d'exposition à ces IFN[213]. Les protéines 2'-5' oligoadénylate

synthétases (OAS) vont ainsi être régulées par l'IFN[215,216]. Ces protéines ont une activité enzymatique permettant l'inhibition de l'expression protéique par hydrolysation des ARN messagers (ARNm) suite à la détection des ARN db viraux. Parmi celles-ci, OAS1 peut activer une RNase L qui dégrade les ARN viraux et induit l'apoptose[217]. Les IFN de type I et III peuvent aussi permettre l'expression des protéines sérines/thréonines kinases (PKR) qui lors de la détection de ligands, dont les ARN db viraux, vont se phosphoryler et se dimériser pour donner une forme enzymatique active[218,219]. Les PKR activées peuvent alors inhiber le facteur d'initiation de la traduction eIF2α par phosphorylation, limitant ainsi la traduction des ARNm et donc la synthèse protéique virale[220].

Les cytokines sont des molécules qui permettent la transmission de messages par voie paracrine, autocrine, endocrine, juxtacrine ou intracrine (du cytoplasme vers le noyau). Il en existe de plusieurs types, les IFN en font parties ainsi que les interleukines, les facteurs de nécrose tumorale (TNF) ou les facteurs hématopoïétiques comme le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF)[221]. Un autre grand groupe de molécules pro-inflammatoires sont les chimiokines dont la fonction principale est le recrutement de leucocytes au site d'infection par exemple dans le cas d'infection virale[222]. Malheureusement ces molécules sont aussi impliquées dans l'inflammation parfois délétère liée à une infection et dans de nombreuses pathologies.

D'autres cytokines peuvent être produites par les cellules primo-infectées suite à l'activation de l'inflammasome[223]. Il s'agit d'un complexe protéique comprenant un récepteur PRR, un adaptateur et une caspase inflammatoire (caspase-1). Les PRR impliqués peuvent être des NLR, des ALR ou des RLR[224–226]. La protéine adaptatrice est appelé ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) et contient un domaine N-terminal nommé PYD et un domaine CARD en C-terminal. Lors de l'activation de cette protéine par interaction avec le récepteur, la pro-caspase-1 est recrutée puis activée en caspase-1[227]. Cette enzyme clive et libère l'IL-1β et l'IL-18, et induit la pyroptose[228].

La réponse innée est rapide et permet de limiter les infections grâce à des protéines antivirales mais aussi des cellules non-lymphoïdes (comme les macrophages, neutrophiles, mastocytes, ou cellules NK). Parmi ces cellules les plus efficientes sont les DC qui sont de véritables sentinelles à la surface des barrières. Elles peuvent capturer les antigènes, établir une réponse immunitaire innée avec la sécrétion d'IFN, de cytokines et de chimiokines et elles peuvent migrer dans les ganglions lymphatiques afin de faire le lien avec la réponse immune adaptative[229]. Les monocytes font aussi partie des cellules immunes myéloïdes du sang, on les retrouve dans les cellules mononuclées circulantes du sang périphérique (PBMC) et ils peuvent représenter jusqu'à 10% des leucocytes. Comme les DC, les monocytes sont des sentinelles dans le sang afin de détecter les pathogènes, ils peuvent éventuellement recruter d'autres cellules immunes via une fonction de présentation d'antigène, et ont aussi une fonction de phagocytose permettant l'élimination des agents étrangers[230].

2.1.2 La réponse innée face aux WNV, USUV et SARS-CoV-2

Lors de l'infection par WNV, une des voies principalement activée suite à la reconnaissance de l'ARN viral passe par la signalisation d'IRF-3 et IRF-7 qui vont permettre une première expression et sécrétion importante d'IFN-α et -β[231]. Dans un modèle de cellules myéloïde, il a été montré un contrôle de la réplication de WNV grâce à cette primo-réponse. L'infection de cellules dérivées de monocytes va en effet entrainer la sécrétion d'IFN de type 1 (IFN-β) qui auront un rôle antiviral prépondérant mais qui vont aussi pouvoir réguler l'inflammation par interaction avec l'IL-1β[232]. L'IFN-γ a aussi un rôle dans la réponse à l'infection par WNV, il permet l'activation de lymphocytes pour limiter la dissémination du virus ; et lors du prétraitement de DC, on observe une réduction importante de la réplication virale[233]. Les PRR impliqués dans cette réponse semblent être initialement Rig-I puis MDA-5, avec un rôle important de MAVS et MyD88, notamment montré *in vivo* où leur absence entraine une réplication incontrôlable du virus[234,235]. D'ailleurs, les macrophages semblent pouvoir activer IRF-1, suite à la détection de WNV par ces PRR. Cela donne lieu à une production d'IFN de type I et aussi l'activation de cellules immunes comme les lymphocytes T $CD8^+$ (dont nous évoquerons le rôle dans le chapitre suivant)[236]. Aussi l'activation des ISG par les IFN, suite à l'infection par WNV, entraine l'activation de OAS1 qui elle-même initiera la RNAse L pour dégrader les ARN viraux[217]. L'infection cellulaire par WNV induit donc la production de cytokines. Les kératinocytes, un des premiers types cellulaires cutanés infectés lors de la piqûre du moustique, vont produire de l'IFN-β, de l'IL-6, du TNF-α ou des chimiokines comme CXCL10 ou CCL20[237]. Lors de l'infection expérimentale de DC dérivés de monocytes (MoDCs), WNV induit aussi la sécrétion d'interleukines, d'IFN de type I et de TNF-α[238–240].

Si les données sur la réponse anti-USUV suggèrent de très fortes similitudes avec WNV, quelques différences sont à noter. L'infection de MoDC par USUV induit une plus forte réponse antiviral via l'IFN-α et les ISG, et le virus est aussi plus sensible aux IFN de type I et III que WNV[238]. D'ailleurs l'infection par USUV est fortement associée à l'augmentation de l'activité de glycolyse des cellules infectées qui sera elle-même impactée et contrée par la réponse IFN[241]. Au niveau du SNC, des souris infectées par USUV ont montré une forte expression d'IFN-β, d'IL-28A, d'IL-6, et de chimiokines au niveau de la moelle épinière[242]. Les DC plasmacytoïdes (pDC) reconnaissent les virions immatures sécrétés par les cellules infectées via le TLR-7 et produisent de l'IFN de type I (principalement IFN-α)[243]. Lors des infections par des arbovirus comme USUV et WNV, les DC résidentes de la peau, ainsi que les cellules de Langerhans, une sous-famille de DC spécifiquement retrouvée dans l'épiderme, vont avoir un rôle prépondérant pour la réponse anti-virale[244].

Comme vu précédemment, le SARS-CoV-2 se réplique dans le cytoplasme, or les protéines virales (comme ORF3a) semblent déclencher de l'apoptose et de la pyroptose via l'activation des caspase 8 et 3[245,246]. Cette activation conduit aussi à la sécrétion de cytokines dont IL-1β. Le PRR

principal du *Coronavirus* semble être le MDA-5 reconnaissant l'ARN db et conduisant à la production d'IFN de type I et III. Les cas les plus sévères d'infection par le SARS-CoV-2 semblent d'ailleurs être associés à une faible réponse à l'IFN de type I et III. Les cytokines retrouvées suite à l'infection sont l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF-α[167]. Les pDC jouent aussi un rôle important dans la réponse antivirale en produisant de grande quantité d'IFN-α suite à l'infection par le SARS-CoV-2 et via la voie de signalisation du TLR-7[247]. Un autre mécanisme particulièrement important dans le cas des infections par le SARS-CoV-2 a été décrit[248] et peut être à l'origine de cas clinique grave engageant le pronostic vital. Il s'agit du choc cytokinique qui se déclenche suite à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées, attirant les cellules immunes, déclenchant des signaux de danger pour les cellules adjacentes, elles-mêmes envoyant ces signaux de danger et créant ainsi une production continu de ces cytokines pro-inflammatoires[249]. Parmi ces molécules, TNF-α, IL-1β, IL-6 et IL-18 semblent particulièrement importantes[250,251]. Le choc cytokinique a des impacts sur les différents organes mis en jeu dans ce processus, par exemple au niveau du SNC il participe à la neuroinflammation et à l'apparition des complications neurologiques[252]. Les cellules infectées peuvent aussi activer l'inflammasome, dans le cas du SARS-CoV-2 il s'agit de l'activation du récepteur NOD-like NLRP3, qui via le domaine de recrutement CARD active la pro-caspase 1 en caspase 1 induisant ainsi la production d'IL-1β et d'IL-18. Les monocytes, qui présentent peu d'expression du récepteur ACE-2, semblent internaliser le virus via les interactions de la protéine S avec les anticorps anti-spike et le récepteur FcγR[253]. Cette infection participe aussi au choc cytokinique notamment via l'activation de l'inflammasome et est probablement à l'origine des pneumopathies et du SARS[254].

2.2 Réponse immunitaire adaptative

Les lymphocytes représentent la majorité des autres PBMC jouant un rôle dans les réponses adaptatives, spécifiques vis-à-vis d'un antigène et systémiques, et qui mettent plus de temps à se développer. Deux sous-famille de lymphocytes existent : les lymphocytes B à l'origine de la réponse humorale, c'est-à-dire la production d'anticorps spécifiques contre des antigènes présentés, par exemple viraux ; et les lymphocytes T qui ont une fonction plus effectrices contre les antigènes présentés. Ces réponses adaptatives peuvent être initiées grâce aux DC avec leur fonction de cellule présentatrice d'antigène (CPA) via l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et II, et de molécules de co-stimulation. Ainsi, les DC présentent des antigènes exogènes aux lymphocytes T $CD4^+$ avec le CMH de type II et des antigènes endogènes et exogènes aux lymphocytes T $CD8^+$ par le CMH de type I. Pendant cette présentation, les DC sécrètent aussi des facteurs de prolifération et de différentiation des lymphocytes T.

Les lymphocytes T $CD4^+$ ont montré un rôle particulièrement important dans la réponse à l'infection par WNV puisqu'ils participent à l'activation de la réponse humorale et des lymphocytes T $CD8^+$, et assurent une fonction cytotoxique directe[255]. La réponse humorale contre les *Flavivirus* va elle particulièrement cibler les protéines d'enveloppe E, prM ou NS1. En effet, les protéines exprimées à la membrane plasmique comme E et prM seront facilement identifiable lors du développement de la réponse humorale, et il en est de même pour la protéine NS1 qui peut être exprimée sous forme dimérique à la membrane ou sous forme soluble hexamérique[256]. Si cette réponse va permettre la génération d'anticorps neutralisants dans la plupart des cas, elle peut aussi engendrer des anticorps avec une réactivité croisée (ciblant plusieurs *Flavivirus*) ou de façon plus grave le phénomène appelé ADE. L'ADE est un phénomène apparaissant lors d'une seconde infection par un même virus mais qui présente des différences de séquences de sa protéine E par exemple. En effet, dans ce cas les anticorps neutralisants, développés lors de la primo-infection, ne seront pas suffisant pour neutraliser le virus mais ils vont tout de même se lier aux particules virales et faciliter leur internalisation via les récepteurs Fcγ[255]. Ainsi l'infection de macrophages, de monocytes et de DC sera facilitée et entrainera une augmentation de la réplication et de la sécrétion virale[30].

Pour le SARS-CoV-2, les premières cellules répondants aux signaux d'infection sont les monocytes, potentiellement différenciés en macrophages, puis les cellules NK et les neutrophiles[257,258]. Les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ seront recrutés suite à la production des cytokines pour participer à la réponse antivirale de façon plus spécifique mais surtout à la réponse adaptative[259]. L'activation des lymphocytes B suite à la primo-réponse entraine la synthèse d'anticorps neutralisants dirigés contre la protéine S. L'efficacité de cette protection sera d'autant plus importante que les symptômes développés pendant la primo-infection sont sévères. Malheureusement, il semble que les taux d'anticorps diminuent rapidement après l'infection, d'où les risques de réinfection et l'instauration de rappel dans le cadre des vaccinations qui utilisent aussi ce mécanisme[175].

2.3 Mécanismes de résistance viraux

Les virus peuvent utiliser différentes stratégies afin d'échapper aux réponses immunes innées et adaptatives mises en place par les cellules hôtes[260]. La stratégie la plus importante cible la réponse IFN, et pour cela, différentes approches sont utilisées. Dans le cadre de la reconnaissance par des récepteurs RLR cellulaires, les virus peuvent développer certains mécanismes de défense : en mimant des ARN du soi (par intégration d'une coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN par exemple), en dissimulant les ARN db ou en interférant avec les voies de signalisation. Par exemples : la protéine NS1 du virus de la grippe peut inhiber l'ubiquitination de Rig-I[261] ; et les entérovirus peuvent cliver la protéine MAVS grâce à leur protéase virale[262]. Concernant WNV, il est capable d'utiliser plusieurs stratégies lui

permettant une défense contre les IFN[263] et pouvant impliquer des mécanismes relatifs aux RLR. Les CLR DC-SIGN et DC-SIGNR reconnaissent la protéine E de WNV, or cette reconnaissance peut entrainer une diminution d'expression de TLR-3 par les macrophages suite à l'activation de la voie STAT-1. Chez les personnes âgées, ce mécanisme d'autorégulation est déficient, et l'infection par WNV est associée à des niveaux élevés de cytokines pouvant entrainer différents effets secondaires[264]. *In vivo*, la délétion du gène codant MAVS entraine aussi une réponse inflammatoire désorganisée avec une perturbation de la réponse des cellules immunes suite à l'infection par WNV[265]. Dans le même ordre d'idée, le polymorphisme du gène *OAS1* est impliqué dans les différences de résistance face à l'infection par WNV[266]. La protéine NS5 des *Flavivirus* a un rôle prépondérant dans la résistance aux réponses antivirales d'IFN de type I[267]. Il semblerait que ces virus aient évolués pour ajouter l'enzyme 2'-O-méthyltransférase (2'-O-MTase) au sein de la protéine NS5 permettant ainsi l'ajout d'un groupement méthyle sur la coiffe en 5' et de mimer l'ARN du soi[268]. De façon générale, les protéines NS de certains *Flavivirus* comme WNV ou DENV peuvent dégrader la protéine STAT-2 ou bloquer la phosphorylation de celle-ci ou de JAK1 et TYK2[269]. Les *Flavivirus* sont aussi capables d'utiliser les vésicules à double membrane dérivées du réticulum endoplasmique afin de protéger leur ARN nouvellement répliqué et de retarder la réponse à l'IFN, ceci a été observé pour DENV et WNV[260,270]. Ils peuvent interagir avec certaines fonctions cellulaires relatives aux organelles sans membrane afin de tirer profit de ces fonctions ou d'échapper à la réponse immune[271]. Ils peuvent aussi produire des micros ARN viraux, ou induire l'activation de micros ARN cellulaire, appelés miARN, qui peuvent réguler certaines fonctions cellulaires par modulation des activités de transcription pour promouvoir la réplication virale par exemple[272]. Les ARN de *Flavivirus* sous-génomiques sont des ARN non codants de 0.3 à 0.5 kb issus de la dégradation incomplète de l'ARN viral par l'exoribonucléase-1 5'-3' (Xrn1). Ils sont aussi à l'origine d'une forte résistance par inhibition de la réponse IFN entre autre, comme cela a pu être montré pour WNV[33].

Le SARS-CoV-2 semble induire une réponse IFN de type I et III via sa reconnaissance par le récepteur MDA5. Or de nombreux travaux font état de mécanismes de résistance développés par le virus. En effet plusieurs protéines virales semblent à l'origine d'interaction avec la voie de signalisation de MDA5 et la réponse IFN[273]. Les protéines nsp1 et ORF6 semblent pouvoir déréguler les réponses à l'IFN de type I en interférant au niveau des voies de signalisation et notamment sur l'import nucléaire de STAT-1[274]. Les protéines N et ORF9b pourraient aussi être impliquées dans des mécanismes de résistance. Par exemple, ORF9b interagit avec la protéine cellulaire TOM70 empêchant l'activation de MAVS dans la réponse immune innée de l'hôte[275]. Par ailleurs, le développement des vaccins et les travaux effectués sur la pathogénèse du virus ont montré que les mutations de la protéine S pouvaient se produire rapidement et entrainer des résistances contre la réponse humorale[276].

3 Infections virales du système nerveux central

3.1 Généralités

Certains virus sont capables d'atteindre le SNC et d'y entrainer des effets parfois délétères. Le SNC est composé de deux parties : la matière grise (retrouvée dans le cortex cérébral, cérébelleux, dans le noyau cérébelleux, et regroupant les cellules neuronales et gliales) et la matière blanche (constituée des axones myélinisés, et des cellules gliales de soutient : les oligodendrocytes, la microglie et les astrocytes)[277]. L'unité de base fonctionnelle du SNC est le neurone, il s'agit de cellules nerveuses comprenant un corps cellulaire ou soma, et des prolongements : les dendrites qui sont des extensions membranaires courtes et larges permettant la réception de signaux transmis par d'autres neurones, ainsi qu'un axone qui peut transmettre l'information du corps cellulaire neuronal vers d'autres cellules (Figure 16). Dans le cerveau, on retrouve en plus grand nombre les cellules gliales qui ont différentes fonctions : elles permettent le développement du système nerveux, le maintien de l'homéostasie, la régulation des synapses, l'apport d'énergie aux neurones, et participent aussi à la protection du SNC[278].

De façon plus générale, le SNC est composé de l'encéphale (comprenant le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral) et de la moelle épinière (Figure 16). Cette dernière permet le transport des informations entre le système nerveux périphérique (SNP) et le cerveau, et peut également envoyer des informations aux systèmes moteurs de l'organisme tandis que le cerveau aura un rôle dans le contrôle de l'organisme.

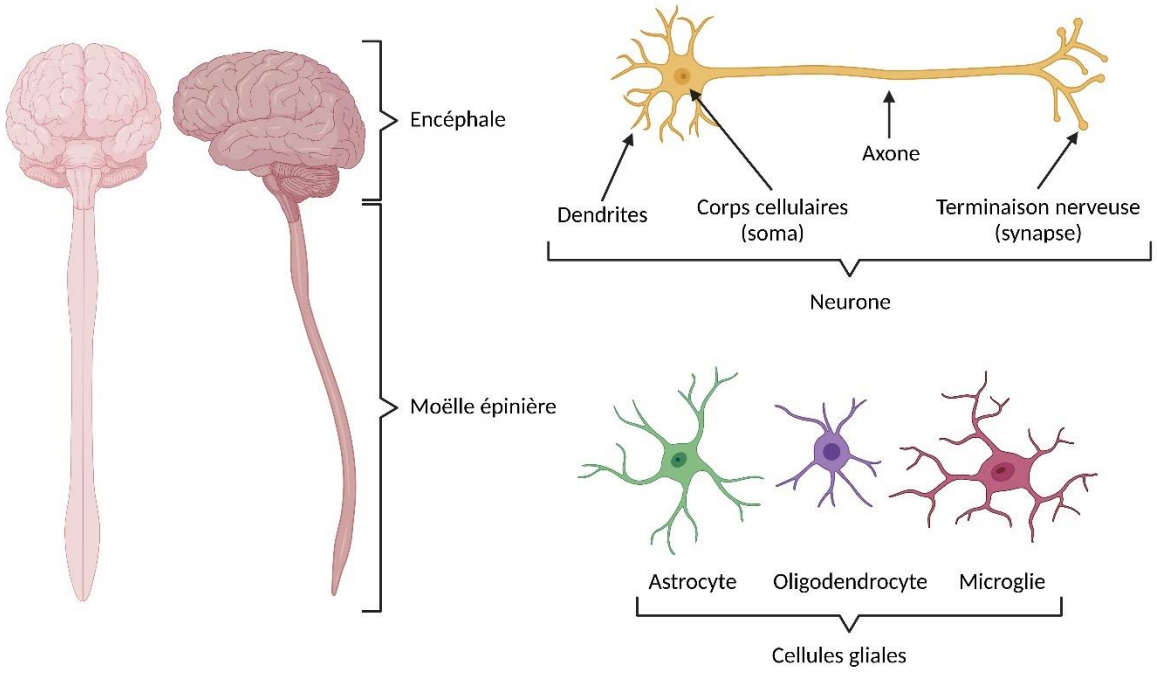


Figure 16 Le système nerveux central et les principales cellules le constituant.
Le SNC comprend l'encéphale et la moelle épinière qui sont constitués principalement par les cellules neuronales contenant un corps cellulaire aussi appelé soma, des dendrites permettant de transmettre des informations, un axone et des terminaisons nerveuses permettant le recueil d'informations. Le SNC compte aussi parmi ses principales cellules des cellules gliales de soutient : des astrocytes, des oligodendrocytes et la microglie, réalisation BioRender.

Historiquement, le SNC est considéré comme un organe privilégié immunologiquement. Même si cette notion est aujourd'hui controversée, le contrôle immunologique du SNC reste unique[279]. En effet, le SNC est protégé physiquement par le crâne et les vertèbres, enveloppé par les méninges constituées de la dure mère (tissu directement lié au crâne), l'arachnoïde (tissu membraneux) et la pie mère (tissu conjonctif vascularisé). Le liquide céphalo-rachidien (LCR) que l'on retrouve notamment dans l'espace sous-arachnoïdien, entre l'arachnoïde et la pie mère, permet une protection mécanique du SNC par l'amortissement des chocs. Il est produit par les plexus choroïdes, localisés dans le système ventriculaire, et contribue aussi à la protection immunologique du SNC par le transport de cellules immunes. Les autres protections fonctionnelles et immunologiques sont assurées par les différentes barrières entre le sang ou le LCR et le SNC. La barrière sang-LCR contrôle les transports entre le sang et le LCR, elle est formée par l'ensemble constitué du plexus choroïde, des cellules endothéliales et du LCR. Au centre du plexus choroïde, on retrouve des fibroblastes, des cellules immunes, du tissu conjonctif et des micro-vaisseaux sanguins[280]. Entre le sang et le LCR spécifiquement, un épithélium de cellules cuboïdales spécialisées produit le LCR et forme la barrière avec une expression accrue de jonctions serrées. L'épithélium arachnoïdien est aussi une barrière de protection pour le SNC entre le sang et le LCR de l'espace sous-arachnoïdien. Enfin, la BHE se situe directement entre le sang et le SNC, et sera développée dans la section suivante.

3.2 La barrière hémato-encéphalique

La conception d'une barrière étanche entre le SNC et le sang fut suggérée suite à diverses observations. Dr. Paul Ehrlich, chercheur allemand, mis en évidence, en 1885, ce qu'il pensait être une faible affinité pour le cerveau et la moelle épinière de certains colorants hydrosolubles injectés chez des rats en systémique et qui coloraient tous les organes à l'exception du SNC[281]. Puis, un étudiant d'Ehrlich, Edwin Goldmann reproduisit l'expérience en injectant cette fois-ci les colorants directement dans le LCR. L'observation fût alors à l'inverse avec une coloration du cerveau et de la moelle épinière uniquement[282]. Dans un même temps, Dr. Lewandowsky, chercheur allemand lui-aussi, commença à parler de « bluthirnschranke » signifiant la barrière (*die schranke*) entre le cerveau (*das hirn*) et le sang (*das blut*), lorsqu'il travaillait avec le bleu de Prusse et qu'il n'observait pas de passage du colorant du sang vers le SNC[283]. Puis l'apparition de la microscopie électronique permis l'étude structurale de cette barrière montrant ainsi un tissu fin dans les vaisseaux sanguins cérébraux et composé de cellules endothéliales non fenestrées[284]. De plus, il fut mis en évidence une structure intercellulaire particulière comportant des jonctions serrées permettant de restreindre le passage de molécules 3 fois plus petites que dans d'autres organismes.

Les cellules endothéliales particulières de la BHE sont maintenues et la structure de l'endothélium est organisé à l'aide d'autres cellules : les péricytes et les astrocytes, l'ensemble formant la BHE et pouvant interagir avec d'autres cellules neuronales et gliales (microglie principalement) donnant alors lieu à l'appellation d'unité neuro-vasculaire (Figure 17)[285].

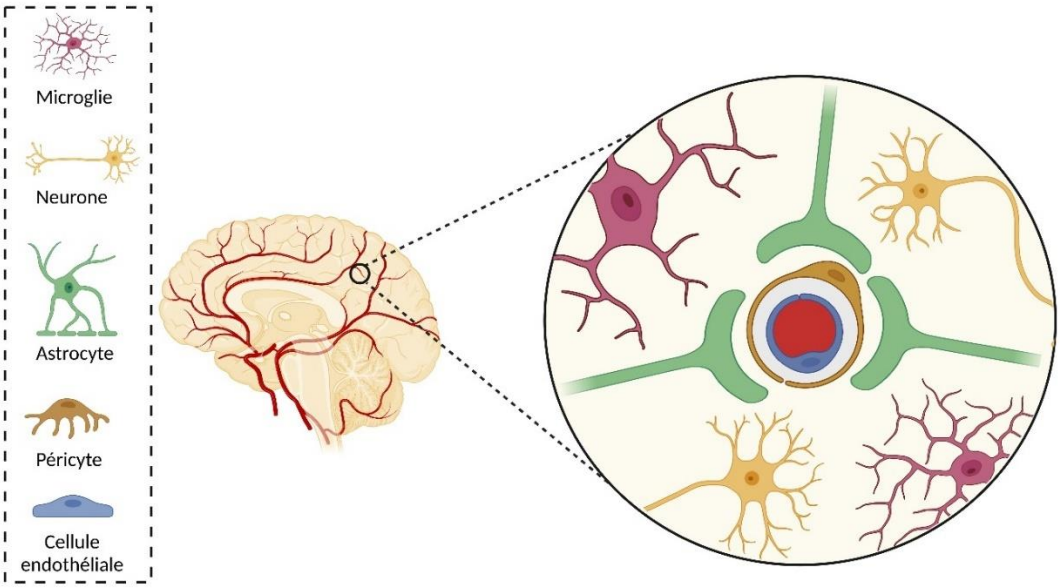


Figure 17 Schéma de l'unité neuro-vasculaire
L'unité neuro-vasculaire au sein de l'encéphale comprend le microvaisseau cérébral entouré par les cellules endothéliales fortement maintenues entre elles par les jonctions. Ces cellules sont elles-mêmes soutenues par les péricytes et les pieds astrocytaires, et peuvent interagir avec les neurones et la microglie, réalisation BioRender.

3.2.1 Composition cellulaire et structure

La BHE est une structure étanche recouvrant les vaisseaux sanguins cérébraux, composée d'une couche unicellulaire et continue de cellules endothéliales, maintenues entre elles par des jonctions serrées et reposant sur une matrice extracellulaire. Cette matrice contient des péricytes cérébraux et des astrocytes, dont la fonction est fondamentale au maintien des propriétés de la BHE[286].

3.2.1.1 Les cellules endothéliales de la BHE

En comparaison au reste de l'organisme les cellules endothéliales cérébrales sont uniques : elles forment une paroi hermétique entre le sang et le SNC à l'aide de l'expression des jonctions serrées, elles ne sont pas fenestrées et possèdent de faible taux de transcytose et une absence de pinocytose limitant et contrôlant ainsi le passage des molécules, pathogènes ou cellules immunes[287]. Parmi les caractéristiques de ces cellules endothéliales, elles expriment des molécules de types lectines[288], le facteur de von Willenbrand impliqué dans les mécanismes de coagulation[289], la neurothéline (glycoprotéine membranaire)[290] et la caveolin-1[291]. Possédant un grand nombre de mitochondries pour assurer leur important métabolisme énergétique[292], les cellules endothéliales expriment des transporteurs spécifiques comme le transporteur de glucose GLUT-1, le récepteur de la

transferrine ou celui de l'albumine[293]. La régulation de l'homéostasie du SNC est aussi assurée par des transporteurs permettant le passage des toxines du SNC vers le sang : on y retrouve les pompes à efflux P-glycoprotéine (P-gp) et MRP-1[294]. Pour assurer le contrôle immunologique du SNC, les cellules endothéliales peuvent produire des facteurs de réponse inflammatoire suite à divers stimuli (comme suite à une infection), elles peuvent donc exprimer et sécréter des chimiokines et des cytokines et augmenter l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (*cell adhesion molecules*, CAM)[295]. Les CAM sont d'ailleurs faiblement exprimées à l'état physiologique normal par les cellules endothéliales cérébrales afin de limiter les interactions avec les cellules immunes circulantes du sang dont l'entrée dans le SNC doit être strictement contrôlée[296].

L'existence de jonctions serrées et adhérentes permet aux cellules endothéliales de la BHE d'avoir une imperméabilité particulièrement élevée (Figure 18)[297].

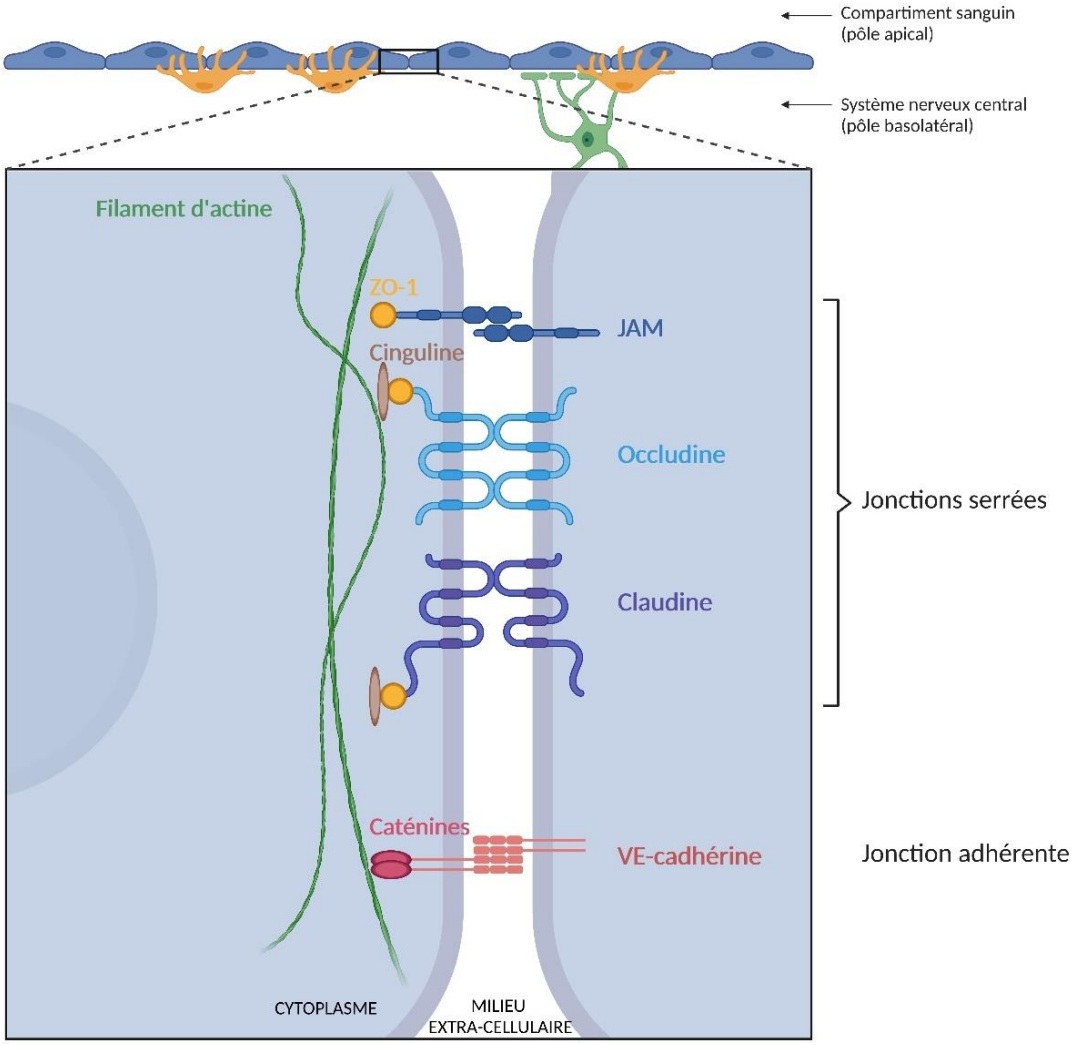


Figure 18 Jonctions des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique
Entre le sang et le SNC, les cellules endothéliales de la BHE sont maintenues entre elles par une forte expression de jonctions. Du pôle apical (ou sanguin) vers le pôle basolatéral (ou cérébral) on retrouve majoritairement : les jonctions serrées JAM qui se lie à ZO-1 en intracellulaire ; les occludines et les claudines qui lient aussi la protéine ZO-1 elle-même interagissant avec la cinguline ; enfin des jonctions adhérentes composées de la liaison extracellulaire de cadhérines avec des caténines en intracellulaire ; réalisation BioRender.

Les protéines transmembranaires de la famille des occludines, les molécules d'adhésions jonctionelles (*junctional adhesion molecules*, JAM) et les claudines composent les jonctions serrées. Celles-ci sont plus fortement exprimées du côté apical de l'espace intercellulaire, c'est-à-dire du côté sanguin, elles participent de cette manière à la polarisation des cellules endothéliales de la BHE. Il existe une seule occludine responsable de la formation de jonctions serrées au niveau de la BHE, 3 types de JAM (JAM-A, JAM-B et JAM-C), et plus de 20 types de claudines (claudine-1 à -24) dont les claudine-1, -3, -5 (majoritaires) et -12 impliquées dans les jonctions de la BHE[298,299]. Entre elles, ces protéines peuvent former des interactions homophiles ou hétérophiles. Par exemple, les claudines possèdent deux boucles extracellulaires pouvant former avec d'autres claudines du même type des dimères, alors que les JAM qui possèdent des domaines immunoglobulines dans leur partie extracellulaire, peuvent former des interactions homo- ou hétéro-dimères dans l'espace intercellulaire[300]. Ces protéines de jonctions sont ancrées au cytosquelette d'actine des cellules endothéliales grâce aux protéines accessoires zonula occludens (ZO)-1, -2, -3, avec lesquelles elles se lient par leur extrémité C-terminale et qui sont elles-mêmes ancrées dans le cytosquelette via la cinguline[286,301]. Les jonctions adhérentes de la BHE permettent de stabiliser les jonctions serrées, elles participent à l'organisation du cytosquelette d'actine et elles peuvent initier la polarisation des cellules. Elles incluent des cadhérines-5 (ou *vascular endothelial* (VE)-cadhérine) transmembranaires interagissant avec les cadhérines des cellules voisines de façon homophile et liées au cytosquelette d'actine via leur extrémité C-terminale avec les caténines (alpha, beta, gamma ou delta)[302,303].

L'ensemble de ces interactions protéiques forment les complexes jonctionnels de la BHE lui conférant un phénotype particulier. Elles permettent de limiter le passage des ions et des solutés polaires par transport paracellulaire. Ainsi, la résistance électrique transendothéliale (TEER) de l'endothélium cérébrale peut atteindre des valeurs supérieures à 1 000 ohm/cm contre 2 à 20 ohm/cm dans les vaisseaux sanguins des autres organes[304].

La modification de ces jonctions peut être due à différents facteurs comme les concentrations extracellulaires en calcium, leur état de phosphorylation ou les conditions physiologiques comme l'inflammation, les infections bactériennes ou virales[305]. Par exemple, la présence d'un environnement pro-inflammatoire composé de TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-6 ou IL-17 peut entrainer une diminution d'expressions d'occludine et de ZO-1[306–308]. Ces modifications sont associées au développement de certaines pathologies[309]. Par exemple, la sclérose en plaque (SEP) est liée à une perte de jonctions adhérentes (VE-cadhérine) chez les patients[310]. Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de sclérose latérale amyotrophique ont aussi une dérégulation des jonctions serrées associée à une augmentation de la perméabilité de la BHE[311–313]. Dans des études portants sur les accidents vasculaires cérébrales (AVC) et les traumatismes crâniens, une déstabilisation des jonctions serrées a

été décrite et semble être suivie d'une réorganisation de ces jonctions afin d'assurer une restructuration de la BHE[314,315]. Des maladies héréditaires peuvent aussi être associées à des mutations sur les jonctions de la BHE, par exemple l'étude de patients atteints d'hémiplégie alternante a révélé une mutation dans le gène codant pour la claudine-5[316]. Les autres cellules constituant la BHE et plus largement l'unité neuro-vasculaire peuvent participer au maintien des propriétés jonctionelles. Par exemple, les astrocytes et les péricytes ont des fonctions de régulation de l'occludine, des claudines ou de ZO-1.

3.2.1.2 Les Péricytes

L'élément au centre de la BHE et lui conférant ses principales propriétés est la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux constituée de la monocouche de cellules endothéliales. A la surface des cellules endothéliales, du côté du SNC, se trouve des péricytes cérébraux. Il s'agit de cellules de type musculaire lisse, qui ont des fonctions dans la régulation de l'angiogenèse, la formation de la matrice extracellulaire, la réponse inflammatoire, la régulation de la migration des cellules immunes ou la régulation du flux sanguin[317,318]. Ces cellules dérivent de la crête neurale alors que la plupart des péricytes d'autres tissus dérivent du mésoderme[319]. Elles recouvrent les vaisseaux sanguins cérébraux de manière beaucoup plus importante que pour d'autres organes, le rapport nombre de cellules endothéliales : nombre de péricytes est compris entre 1 : 1 et 3 : 1 alors qu'il est plutôt de 1 : 100 dans les tissus musculaires[320]. En terme de caractérisation, les péricytes du SNC expriment le PDGFR-β (*platelet-derived growth factor receptor-β*) et NG2 (*neuron-glial antigen 2*) parmi d'autres marqueurs (CD13 ou desmin par exemples)[320]. Leur corps cellulaire et leurs extensions leur permettent d'envelopper les cellules endothéliales mais en limitant les contacts directs puisqu'ils se trouvent séparés par la membrane basal[321]. Toutefois des connections existent via des contacts physiques directs ou des voies de signalisation paracrine assurant des échanges d'ions et de petites molécules[322–324]. Les péricytes peuvent aussi posséder des complexes jonctionnels contenant des CAM, de la fibronectine ou des jonctions adhérentes avec la N-cadhérine et les caténines, et permettant la communication mécanique avec les cellules endothéliales[325].

L'activité musculaire des péricytes est assurée par des protéines contractiles (α-SMA, topomyosine ou myosine) permettant de contrôler le flux sanguin en fonction de l'activité du SNC[317,326]. A ce propos, ils possèdent des récepteurs EP4 capable de lier les prostaglandines (PGE2) sécrétées par les astrocytes et permettant de moduler le flux sanguin cérébral[327]. Ils ont aussi un rôle dans l'angiogenèse cérébrale notamment sous l'effet des facteurs TGF-β ou PDGF-BB, sécrétés par les cellules endothéliales pour les guider vers les vaisseaux qui ont besoin de stabilisation ; eux-mêmes peuvent sécréter des facteurs angiogéniques comme VEGF[328]. Ils ont un rôle prépondérant dans le

maintien de la BHE, ils sécrètent des molécules permettant d'ajuster les jonctions serrées des cellules endothéliales et de polariser les astrocytes[329].

3.2.1.3 Les Astrocytes

Parmi les cellules du SNC, les astrocytes représentent 90% des cellules gliales et font aussi partie de la BHE[330]. Elles doivent leur nom à leur forme en étoile puisque ces cellules possèdent de nombreux prolongements[331]. Au sein de la BHE, les astrocytes permettent le support, la protection et le maintien des propriétés de la barrière. Ces cellules peuvent aussi avoir une fonction de neurotransmission, elles participent aux mécanismes immunitaires, à la réparation et à la cicatrisation du SNC[332,333]. Les prolongements des astrocytes aussi nommés pieds astrocytaires peuvent être en contact avec les péricytes et les cellules endothéliales[293], ils peuvent envelopper entièrement les vaisseaux sanguins cérébraux, et ils contiennent un complexe dystroglycane-dystrophine permettant la liaison du cytosquelette astrocytaire à la membrane basale via une liaison à l'agrine (protéine de la matrice extracellulaire). Grâce aux différentes interactions du complexe dystroglycane-dystrophine, il y a un contrôle de la protéine aquaporine-4 qui s'organise alors en réseaux orthogonaux pour réguler l'homéostasie de l'eau au sein du SNC. Cette protéine permet aussi la régulation des concentrations ioniques de la BHE[334]. De plus, les pieds astrocytaires de la BHE ont une expression particulière de transporteurs comme P-gp ou GLUT-1[293,335]. En effet, concernant le métabolisme, les astrocytes assurent plusieurs fonctions de stockage, d'absorption, de sécrétion et de transmission ou notamment le contrôle du pH. Pour cela ils possèdent des transporteurs et des enzymes spécifiques[331,336–338].

Les cellules astrocytaires participent activement à l'activité neuronale, elles modulent les transmissions synaptiques en retenant certains neurotransmetteurs comme le glutamate[339,340]. Au niveau des synapses des neurones ou des vaisseaux sanguins, les pieds astrocytaires peuvent moduler les taux de calcium, et cette coordination est fondamentale au fonctionnement de l'unité neuro-vasculaire et à la régulation de l'activité neuronale et du flux sanguin[341–343]. Entre eux les astrocytes communiquent par des jonctions communicantes inter-astrogliales impliquées dans le contrôle de la vasodilatation ou vasoconstriction, et dans le support de l'hétérogénéité des astrocytes[337,344]. Pour le développement et le maintien de la BHE, les astrocytes arborent différentes fonctions. Ils sécrètent des facteurs de croissance (VEGF ou l'angopoïétine-1) supportant la formation de jonctions serrées ou la polarisation de transporteurs[345,346]. L'angiotensine II est un facteur produit par les astrocytes et important dans le support de la BHE[347]. La sécrétion d'apolipoprotéine par les astrocytes qui se lie au récepteur LRP1 des péricytes participe au contrôle de la perméabilité de la BHE[348].

3.2.1.4 Autres cellules de l'unité neuro-vasculaire

La BHE est en interaction constante avec le SNC notamment via des connexions avec les neurones et la microglie. En effet, les neurones peuvent être en contact physique direct avec la BHE et de manière générale ils restent toujours à proximité des capillaires sanguins[349]. Ainsi en fonction de leurs besoins métaboliques ou de l'équilibre ionique, et en collaboration avec les astrocytes, les neurones peuvent sécréter des facteurs comme l'acétylcholine régulant le flux sanguin afin d'augmenter leur apport en oxygène ou glucose. Ils peuvent aussi entrainer une relaxation ou une contraction vasculaire par action sur les péricytes via le glutamate ou la noradrénaline respectivement[285,317,350].

Au cours du développement, les neurones et les cellules gliales vont participer à la formation de la BHE. Durant la neurogénèse, ces cellules peuvent sécréter des facteurs, comme les protéines Wnts, qui vont induire la transduction de gène codant pour les jonctions serrées ou les transporteurs spécifiques des cellules endothéliales. Lors de l'angiogenèse, les neurones et les progéniteurs neuronaux peuvent interagir avec la BHE via la production de VEGF[351]. Au cours des réponses immunitaires, ils peuvent aussi réagir aux signaux de danger en sécrétant des molécules pro-inflammatoires qui pourront avoir différents effets sur la BHE[352,353]. Les cellules microgliales sont les cellules immunes les plus abondantes du SNC[354]. Ceux sont des cellules myéloïdes qui prennent origine dans le mésoderme avant de se localiser dans le SNC pendant son développement. Ces cellules expriment des protéines de surface de type macrophage comme le récepteur M-CSF-1 (ou CD115), l'intégrine α-M (ou CD11b), le récepteur CX3CR1 et la protéine Iba-1, cela dans un état physiologique normal[355]. Pour les différencier des macrophages périphériques, les facteurs CD44 (cellules infiltrées) ou CD169 (manquant chez les cellules microgliales) ont été proposés[356]. Aussi, lors d'atteintes neuronales, le facteur Tmem119 peut être utilisé pour les reconnaitre parmi les macrophages périphériques recrutés dans le SNC[357]. Plus largement, les cellules endothéliales de la BHE et les cellules microgliales communiquent fortement afin d'assurer dans un premier temps le développement de la barrière mais surtout un suivi constant de son homéostasie.

3.3 Le neurotropisme

Le tropisme cellulaire d'un virus est défini par sa capacité à infecter les cellules d'un organe en particulier ou un type cellulaire dans un organisme. Ceci se caractérise selon la nature du virus mais aussi le site d'entrée du virus, la réponse immune au niveau local, la structure et le type de vascularisation du tissus et notamment la nature des récepteurs cellulaires du virus[358]. Par exemple, le SARS-CoV-2 possède les protéines de surface S qui vont pouvoir se lier au récepteur ACE-2 avant clivage, fusion et internalisation. Le tropisme du SARS-CoV-2 sera donc défini en partie par les cellules

exprimant ce récepteur[359]. Au niveau du SNC, le neurotropisme peut être la conséquence d'une affinité des virus pour des récepteurs neuronaux, ou des cellules gliales ou encore pour des récepteurs situés à la surface des cellules composant les barrières cérébrales[360].

Cependant l'infection du SNC est un évènement rare, comme nous venons de le voir, le cerveau et la moelle épinière qui le composent sont protégés du reste de l'organisme par des barrières et un système immunitaire de surveillance unique et spécifique. Il existe toutefois des virus neurotropes dont de nombreux virus émergents. Les conséquences de l'infection du SNC peuvent être directement liées à l'infection des cellules neuronales ou gliales entrainant la mort cellulaire ou des modifications de prolifération cellulaire. Une détérioration indirecte peut aussi avoir lieu via l'inflammation qui se déclenche suite aux mécanismes de réponse antivirale. Les effets associés peuvent être des encéphalites, des méningites ou des méningo-encéphalites, des troubles neuronaux de type syndrome de Guillain-Barré, paralysies, ou des AVC[361]. Lors de cette infection, les effets seront parfois similaires pour plusieurs pathogènes. Par exemple, une méningite causée par la bactérie *Neisseria meningitidis* pourrait, à première vue, être confondu avec une infection par le virus de l'herpès (HSV)[362]. L'identification de l'agent pathogène peut alors se faire sur le LCR, mais cette technique reste invasive et il est souvent difficile d'identifier le pathogène à ce niveau. L'imagerie est aussi utilisée et mis en rapport avec l'étude complète des données cliniques[363,364].

Un autre aspect lié aux conséquences de l'infection par un virus neurotrope est l'impact au long terme. De plus en plus d'études font rapports d'effets prolongés ou apparaissant plus tardivement suite à des infections virales du SNC, avec des conséquences sur la santé publique notamment par l'augmentation des risques de développement de maladies neurodégénératives[365–367]. En effet, l'infection virale qui entraine de l'inflammation peut aussi entrainer la libération de protéines avec des anomalies de structure dont l'accumulation est liée au développement de maladies neurodégénératives, cela a notamment été montré lors d'infection par HSV de type 1[368]. La présence de virus, comme le cytomégalovirus, peut aussi mener à la production d'anticorps ciblant des auto-antigènes, ces anticorps participent à la détérioration de la myéline par exemple, et donc au développement de maladies neuronales auto-immunes[369]. Une large étude a aussi démontré que les personnes infectées par le virus Epstein-Barr avaient 32 fois plus de risque de développer une SEP, et ce en lien avec la dégénération axonale observée suite à l'infection par ce virus[370].

3.3.1 Voies d'accès au système nerveux central

Les mécanismes d'accès des virus au SNC et leur tropisme pour certains types de cellules vont être déterminants dans la symptomatologie et le développement des troubles neuronaux[371,372]. De manière générale pour accéder au SNC, les virus utilisent deux voies : l'infection des neurones en

périphérie qui leur permet d'accéder au SNC par un transport axonal, ou l'infection via la circulation sanguine qui dépendra donc de la virémie induite lors des primo-infections et de la capacité des virus à traverser les barrières cérébrales (Figure 19).

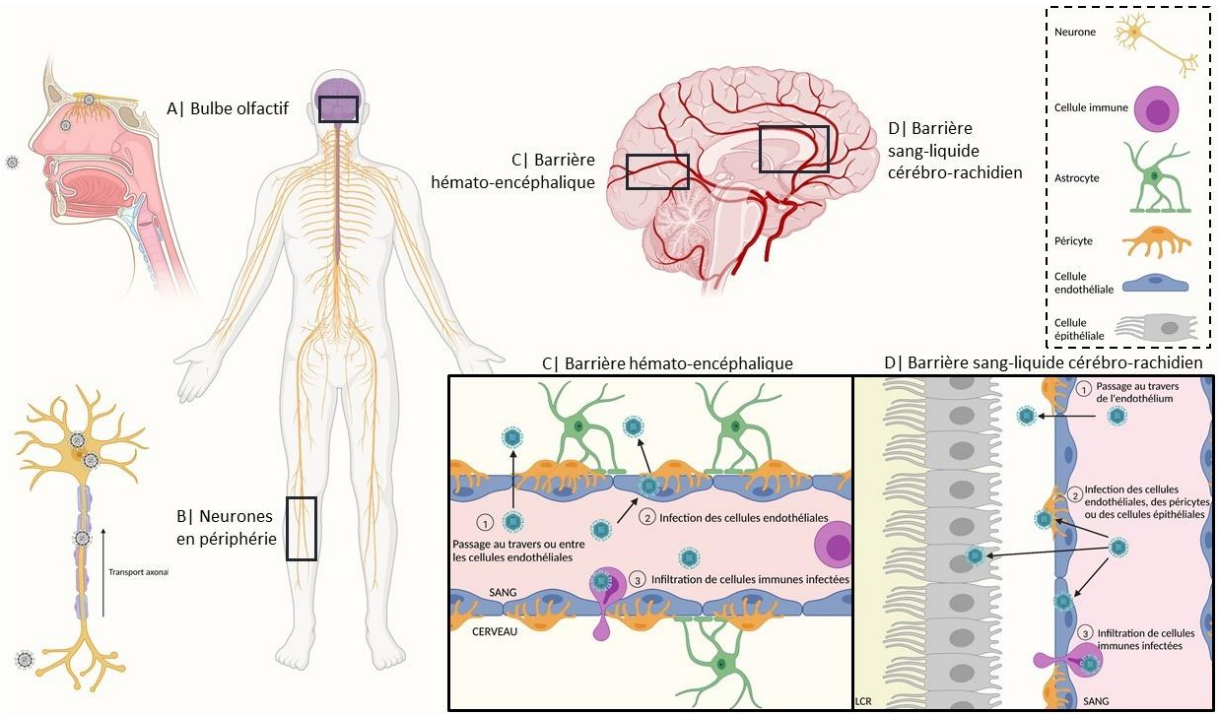


Figure 19 Différentes voies d'accès des virus au système nerveux central
L'infection virale du système nerveux central peut se faire via l'infection de l'épithélium et des nerfs du bulbe olfactif (A), des neurones en périphérie (B) ou à travers les barrières entre le sang et le cerveau. A ce niveau l'infection peut avoir lieu à la barrière hémato-encéphalique (BHE) (C) : par transcytose entre ou au travers des cellules endothéliales (C, 1) ; par infection et réplication au sein des cellules endothéliales, des péricytes ou des astrocytes de la BHE (C, 2) ; ou par le transport dans des cellules immunes infectées et recrutées dans le SNC (C, 3). Dans le choroïde plexus, la barrière sang-liquide cérébro-spinal peut permettre l'infection du SNC par transcytose (D, 1), par infection des différents types cellules (cellules endothéliales, cellules épithéliales du choroïde plexus ou péricytes) (D, 2), ou aussi par recrutement de cellules immunes infectées (D, 3) ; adapté de la revue Constant O. *et al*. 2022, réalisation BioRender.

3.3.1.1 Transport axonal

Un des points délicats de la surveillance renforcée du SNC sont les neurones qui par leurs prolongements axonaux atteignent des organes en périphérie sans rencontrer de barrière. Au niveau des terminaisons axonales, des récepteurs permettant l'internalisation de virus peuvent exister, et, une fois dans le cytoplasme, les particules virales ou les endosomes dans lesquels se trouvent les virus, peuvent être transportés par les organelles cellulaires et les interactions entre protéines motrices et microtubules, en suivant un transport rétrograde pour atteindre le soma. Libérés dans le SNC, les virus peuvent se répandre dans les cellules nerveuses par un transport trans-synaptique, et infecter d'autres types cellulaires. Le transport axonal antérograde peut aussi être utilisé lors des réinfections par exemple avec les herpesvirus[371].

L'accès au SNC par le transport axonal peut donc se faire via l'infection des nerfs en périphérie, au niveau musculaire par exemple, ou via l'infection des neurones du bulbe olfactif, qui sont au contact

direct de l'environnement extérieur (Figure 19 A et B), en outrepassant la surveillance des barrières cérébrales[373]. En plus des herpesvirus, ce moyen d'accès au SNC a été démontré pour d'autres virus[374], dont certains arbovirus (les virus SLEV et WNV)[375,376] et l'infection par le bulbe olfactif est un des mécanismes les plus probablement utilisés par le SARS-CoV-2 pour pénétrer dans le SNC[377].

3.3.1.2 Accès par la voie systémique

Lors de l'infection virale, une concentration importante de particules virales infectieuses peut se retrouver dans la circulation sanguine augmentant alors les possibilités d'interaction des virus avec les barrières cérébrales. Dans l'espace sous-arachnoïdien, la perméabilité des micro-vaisseaux permet le passage d'un plus grand nombre de molécules que ceux présents dans le parenchyme cérébral par exemple. Au niveau de cet espace, les virus suffisamment concentrés dans le sang peuvent donc traverser la barrière et infecter les méninges donnant lieu à des méningites[373]. Le système lymphatique cérébral, notamment présent dans cet espace, peut aussi transporter des virus dans le SNC par des interactions avec le LCR[378]. De la même manière, au niveau des plexus choroïdes des ventricules cérébraux, les virus peuvent passer du sang vers le LCR ou le parenchyme cérébral en franchissant les barrières. Certains virus ont un tropisme important pour les cellules du plexus choroïde comme les arbovirus CHIKV et ZIKV[379,380]. Une fois à ce niveau, ils peuvent infecter les cellules épendymaires puis celles du parenchyme cérébral[373].

En dehors du transport axonal, le passage au travers de la BHE est sans doute le plus étudié, représentant la surface d'échange direct la plus importante entre le sang et le SNC (entre 12 et 18 m^2). L'infection de cette barrière et son étude comme voie d'accès au SNC font l'objet de plusieurs études dans cette thèse, c'est pourquoi le passage et l'infection de la BHE seront plus détaillés dans la section suivante.

3.3.1.3 Infections virales et passage de la BHE

Plusieurs mécanismes sont mis en cause lors du passage de la BHE par les virus :

- Il peut s'agir d'une transcytose au travers des cellules, sans dommage (via le transport des exosomes par exemple) (Figure 20 (1))[381,382]
- L'infection des cellules endothéliales de la BHE peut mener à la perte d'intégrité de la barrière dû à la mort cellulaire, la diminution d'expression des jonctions serrés ou encore la libération de médiateurs inflammatoires. Cette altération de la perméabilité va éventuellement laisser passer les virus (Figure 20 (2)).

- L'infection entraine aussi la libération du virus du côté du SNC après réplication parfois sans dommage direct sur l'intégrité de la barrière (Figure 20 (2)).
- Enfin des cellules circulantes du sang (cellules immunitaires par exemple) peuvent avoir été infectées en périphérie, traverser la BHE et libérer le virus dans le SNC, il s'agit du mécanisme de cheval de Troie (Figure 20 (3))[382].

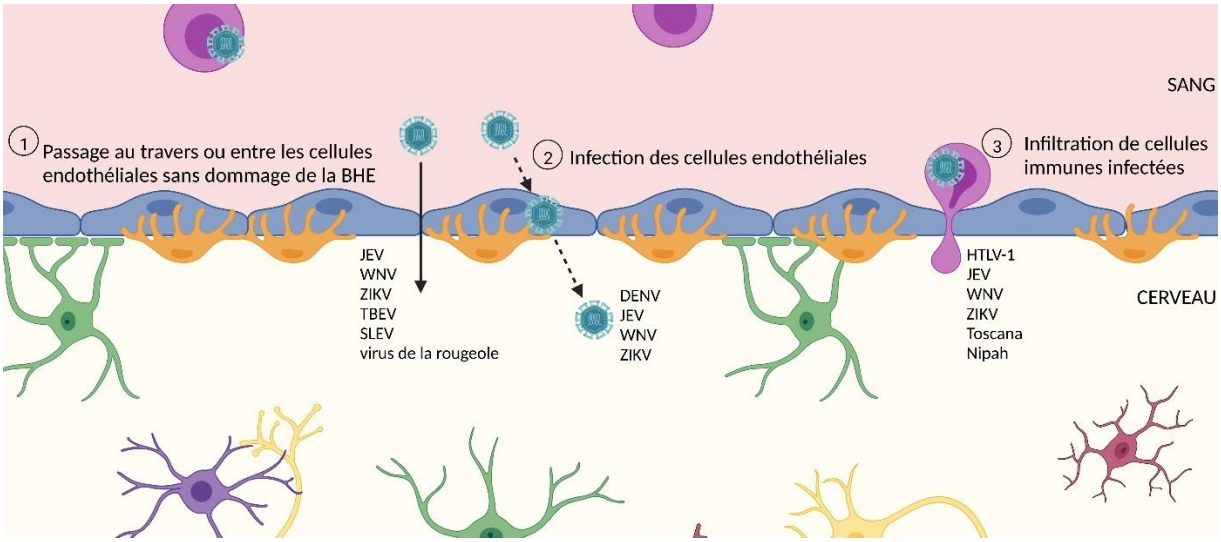


Figure 20 Illustrations de mécanismes viraux de passage de la BHE
Au travers de la BHE, les virus peuvent traverser la barrière entre les cellules endothéliales ou au travers de celles-ci (1), ils peuvent aussi infecter et se répliquer dans les cellules endothéliales qui libéreront en partie les nouvelles particules virales dans le SNC (2), ou ils peuvent ruser par un mécanisme de cheval de Troie en infectant des cellules immunes qui traversent la BHE (3) ; adapté de Y. Mustafa, *et al.*, 2019, réalisation BioRender.

Quelques exemples illustrent la diversité des mécanismes existants lors de l'infection du SNC via la BHE, par exemple, des lymphocytes T infectés par le virus HTLV-1 peuvent traverser la BHE, favoriser l'infection du SNC et entrainer des atteintes neurologiques graves[383,384]. Le VIH peut aussi traverser la BHE via le transport dans des cellules immunes infectées[385,386]. Le virus SLEV est un *Flavivirus* capable d'interagir avec la BHE[376] tout comme le virus de la rougeole[387,388]. Un autre *Flavivirus*, ZIKV a montré un mécanisme de passage possible via le recrutement de cellules immunes infectées par la BHE[389,390]. De la même manière les virus Toscana et Nipah semblent utiliser le mécanisme de cheval de Troie pour traverser la BHE et infecter le SNC[391,392].

3.4 Réponse antivirale dans le système nerveux central

Lors de la modulation de l'homéostasie de la BHE (suite à des infections virales par exemples), des altérations de la perméabilité peuvent entrainer une dégradation de la matrice extracellulaire pouvant libérer des protéines qui seront alors considérées comme des signaux d'alerte (DAMP) et activeront les cellules microgliales[393]. Une fois les virus dans le SNC, une réponse antivirale peut se mettre en place. Le système immunitaire naturel du SNC est composé de la microglie et des

macrophages périvasculaires. Au niveau de la BHE, les cellules exposées à l'infection vont pouvoir mettre en place une réponse antivirale innée favorisant l'élimination du virus mais pouvant causer certains dommages[394]. Les atteintes neuronales peuvent enclencher la génération d'inflammasomes (évoqués en section 2.1.1). En effet, les cellules gliales et neuronales expriment des récepteurs PRR comme les TLR permettant la reconnaissance de PAMP et de DAMP comme les virus. Ce processus conduit à l'activation de l'inflammasome, ce qui peut entraîner une infiltration leucocytaire[227,395]. *In fine*, l'activation des PRR cause l'expression d'IFN de type I et d'ISG, amorçant l'activité antivirale, le recrutement de cellules immunes et la neuroinflammation[352].

De manière générale, l'infection du SNC va entrainer une réponse antivirale directe (section 3.4.1), un recrutement de cellules immunes (section 3.4.2 et 3.4.3) et finalement la neuroinflammation pouvant être indispensables à la clairance du virus mais aussi délétères pour les fonctions cérébrales.

3.4.1 Réponse antivirale des cellules de l'unité neuro-vasculaire

Astrocytes et Microglie

Une fois le SNC lésé, la microglie et les astrocytes seront activés via la sécrétion de médiateurs inflammatoires et conduiront secondairement au recrutement de cellules immunitaires périphériques[396,397]. Certains facteurs sécrétés par les cellules endothéliales suite à leur propre activation (dans le cas d'une inflammation systémique par exemple) vont pouvoir directement activer la microglie, c'est le cas avec les molécules CXCL5, métalloprotéase de matrice (MMP)-3 ou VEGF[398]. D'autres études ont montré le même type de relation entre les péricytes cérébraux et les cellules microgliales soulignant les importantes communications étroites au sein de l'unité neuro-vasculaire et qui permettent la surveillance fine du SNC[399,400]. Les cellules microgliales ont d'autres mécanismes d'activation, dont l'IFN-γ, libérée par les cellules infectées, qui peut aussi les activer avec une augmentation préférentielle des fonctions phagocytaires et destructrices[401]. L'activation microgliale est visible morphologiquement, on peut constater une augmentation d'expression intracellulaire de Iba-1 accompagnée d'une augmentation d'expression de médiateurs inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF-α, ou autres chimiokines)[398] mais aussi de MMP et de radicaux libres, elles prennent alors un phénotype de macrophage de type M1 (phénotype pro-inflammatoire)[354,398]. A la suite de la phase aiguë d'atteinte cérébrale, les cellules microgliales peuvent rester activées en prenant cette fois un phénotype de type M2 (anti-inflammatoire) arborant alors des fonctions dans l'angiogénèse ou la neurogénèse[402]. Le passage d'un phénotype à l'autre est encore en phase d'étude afin de mieux appréhender cette plasticité phénotypique, des travaux sur les interactions de la microglie avec la BHE sont notamment nécessaires pour cette compréhension[403].

Les astrocytes eux ont un rôle important et parfois ambigu. En effet leur infection directe peut entrainer la sécrétion de facteurs antiviraux mais aussi pro-inflammatoires favorisant la perméabilité de la BHE. Ils expriment des molécules comme les filaments intermédiaires de vimentine ou la GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) qui ont un rôle dans l'astrogliose, c'est-à-dire l'activation des astrocytes suite à une atteinte du SNC[331,336]. Lors d'infections virales, les astrocytes possèdent des PRR leur permettant de répondre par la sécrétion de protéines du complément, d'IFN, d'interleukines ou de chimiokines[404]. Elles peuvent produire des MMP capables de détruire les jonctions serrées. Les mécanismes inflammatoires ainsi mis en jeu peuvent aussi avoir des effets délétères sur le SNC par altération de l'homéostasie ou du fonctionnement neuronale[405–407]. De plus, les liens étroits entre ces cellules, les neurones et les autres cellules gliales vont complexifier la réponse à l'infection[407]. Par exemple, les astrocytes infectés peuvent activer la microglie par la production de protéines du complément C3, et vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1β ou TNF-α. Cette sécrétion réduira le stockage du glycogène et le transport du lactate par les astrocytes, entraînant une diminution de l'énergie nécessaire à la myélinisation des axones et donc une altération de l'homéostasie du SNC[407]. Aussi, plus généralement, l'infection des cellules du SNC comme les astrocytes ou la microglie provoque la sécrétion de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-1β qui jouent un rôle dans le recrutement des cellules immunitaires et la perturbation de l'intégrité de la BHE[396].

Exemples

Dans le cerveau de patients infectés par le VIH, on observe une augmentation de l'expression du TNF-α et de l'IL-6 qui sont notamment produits par les astrocytes et les cellules immunitaires infiltrées et qui contribuent à l'établissement d'un environnement neurotoxique associé à des dysfonctionnements du SNC et à la démence[408]. D'autre part, les astrocytes infectées par WNV et les infections du SNC par JEV ou par VIH ont montré une sécrétion accrue de MMP dont MMP-9 participant à la dérégulation de la BHE[407]. La présence à de fortes concentrations de molécules pro-inflammatoires contribue à l'aggravation de la neuroinflammation. Sur des modèles de BHE, l'un avec une culture monocouche de cellules endothéliales de rat et l'autre avec des cellules endothéliales de cerveau humain, l'ajout d'IL-6 et de TNF-α induit une perturbation de l'intégrité de la BHE[308,409]. Dans ce contexte les récepteurs TAM (Tyro3, Axl ou Mertk) ont un rôle important dans la réponse à l'infection par des virus neurotropes et le maintien de l'intégrité de la BHE puisqu'ils peuvent réguler négativement l'expression d'interleukines et ainsi prévenir la dérégulation de la barrière et l'entrée de virus et de médiateurs inflammatoires dans le SNC[410].

Péricytes et cellules endothéliales

Les péricytes ont plusieurs rôles importants dans la réponse immunitaire, ils peuvent potentiellement avoir une activité de type macrophage, durant le développement de la vascularisation cérébral, ils pourraient dériver de macrophages, et ils collaborent étroitement avec la microglie, par exemple lors d'AVC[411–413]. Ils possèdent des PRR contre les DAMP et PAMP pouvant engendrer une réponse inflammatoire avec sécrétion de molécules pro- ou anti-inflammatoires. Ils participent au recrutement leucocytaire via l'expression de CAM et la sécrétion de chimiokines. Suite à leur activation, ils sont capables de sécréter des MMP, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou VEGF qui vont moduler la perméabilité de la BHE[414]. Ils peuvent aussi avoir un rôle de CPA via l'expression d'un CMH de type II[415]. Les péricytes sont donc des acteurs majeurs dans le contrôle de la neuroinflammation[415].

Exemples

Les patients infectés par le VIH présentent une régulation négative du CD13, un marqueur des péricytes. En effet, tout au long de l'infection par le VIH, on observe une augmentation de l'expression de l'IL-1β et du TNF-α participant à la diminution d'expression de l'α1-intégrine, qui joue un rôle dans l'adhésion à la membrane basale, de l'α-SMA, et conduisant à une perte de la fonctionnalité des péricytes avec une diminution de sécrétion de facteurs de soutient des cellules endothéliales (comme Ang-1 et TGF-β1). Ces cytokines pro-inflammatoires conduisent aussi à une diminution des expressions de PDGFRβ et de CX43, impliqués dans l'intégrité de la BHE[416]. D'autre part, le TNF-α et l'IL-6 semblent agir en combinaison avec l'IL-17a en tant que cytokines pro-inflammatoires provoquant la diminution de l'expression de ZO-1 par les cellules endothéliales et provoquant finalement une augmentation de la perméabilité de la BHE[308,417]. Par exemple, l'infection par JEV entraîne une atteinte de l'intégrité de la BHE par la dissociation des cellules endothéliales et le dysfonctionnement des jonctions serrées en raison d'une modification générale de la distribution de l'occludine[418], mais aussi par l'infection des péricytes qui entraine une production accrue d'IL-6 suivie d'une diminution d'expression de ZO-1[419].

Finalement, la réponse antivirale cellulaire et la perturbation de l'intégrité de la BHE peuvent favoriser le recrutement des cellules immunes dont nous discuterons dans la section suivante.

3.4.2 Infiltration des cellules immunes

L'infection virale du SNC peut donner lieu à un recrutement et une augmentation du nombre de cellules immunes et de composants du système immunitaire directement dans le SNC afin de contrer son infection mais aussi au détriment de son homéostasie. Durant ce processus, la BHE est un

élément central, l'infection directe de l'unité neuro-vasculaire peut entrainer la libération de médiateurs inflammatoires comme les MMP qui participent à la dérégulation des jonctions serrées et des CAM. Ce dérèglement facilite le passage de cellules immunes du sang vers le SNC.

La transmigration des leucocytes vers le SNC se fait grâce à une série d'évènements d'interactions avec les cellules endothéliales : (i) les cellules immunes vont s'attacher via des jonctions aux cellules endothéliales pendant la phase dite de glissement ou d'attachement (par exemple l'interaction de sélectines avec leur ligand), (ii) puis elles vont être activées via la stimulation des molécules d'adhésion par les chimiokines, (iii) une étape d'arrêt de la circulation avec adhésion ferme aura lieu par interaction des intégrines leucocytaires avec les CAM endothéliales, (iv) les leucocytes commencent alors leur diapédèse dans une étape de *crawling*, (v) enfin la migration vers le parenchyme cérébral sera effectuée sous l'action de plusieurs interactions : les chimiokines avec leur récepteur, les sélectines avec leur ligand, et les intégrines avec les CAM (Figure 21)[420].

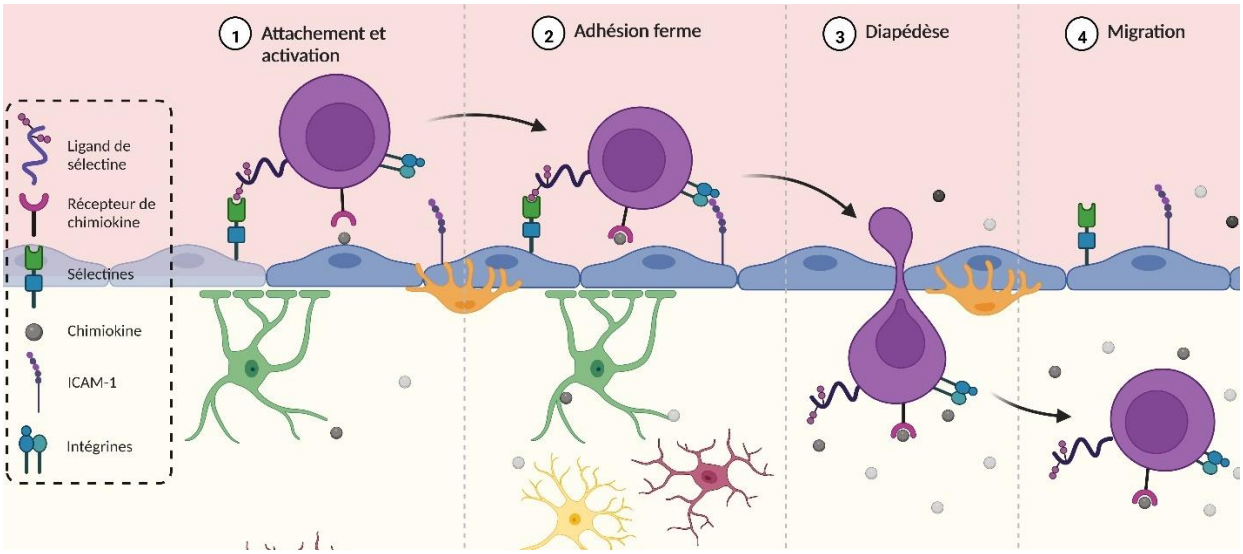


Figure 21 Recrutement et transmigration de cellules immunes
Au travers de la BHE les cellules immunes peuvent être recrutées par les cellules endothéliales puis migrer vers le SNC suite à plusieurs étapes : la liaison de sélectines et de chimiokines à leurs récepteurs permet l'attachement et l'activation des cellules immunes (1) ; puis l'adhésion ferme est assurée par les interactions des sélectines et des CAM avec leurs récepteurs respectifs (2); ensuite il y a passage de la cellule immune au travers de la BHE : c'est la diapédèse (3); puis il y a migration de la cellule immune dans le SNC (4). Lors de ces deux dernières étapes, les péricytes et astrocytes assurent aussi un rôle par la sécrétion et l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésions ; réalisation BioRender.

Exemples

L'infection des péricytes par JEV entraîne également la sécrétion de CCL5 et de PGE2, tandis que les cellules endothéliales vont exprimer ICAM-1 ou CXCL1, tous participant à la neuroinflammation globale par le recrutement de cellules immunitaires[421]. Les astrocytes jouent aussi un rôle critique car après une infection virale, ils vont produire des chimiokines comme CXCL10 ou CCL5 favorables au recrutement de leucocytes[404]. Dans un modèle d'infection par JEV, la sécrétion de CXCL10 par les astrocytes est clairement induite par la production d'IFN-γ et entraine la chimio-attraction des

leucocytes dans le SNC. Dans cette étude, le rôle de CXCL10 comme facteur de sévérité de la maladie est mentionné[422]. Dans un autre exemple, lors d'une infection cérébrale par le virus de la rage (RABV), CXCL10 est d'abord sécrété par les neurones puis par la microglie et les astrocytes. Dans ce modèle, la chimiokine est impliquée dans le recrutement des lymphocytes T $CD4^+$ et dans leur différenciation en cellules Th1 ou Th17[423]. En interagissant avec les astrocytes, les péricytes contribuent à la migration leucocytaire en plus des effets des cytokines inflammatoires qui facilitent cette migration dans le SNC[424]. Ils peuvent aussi eux-mêmes exprimer des CAM comme ICAM-1 ou VCAM-1 qui agissent dans le processus de transmigration des leucocytes[425].

Finalement, la neuroinflammation est la réaction inflammatoire se déroulant dans le cerveau, suite à l'infection du SNC, ou à une inflammation en périphérie, et mettant en jeu l'activation de cellules gliales, la réponse antivirale des cellules de l'unité neuro-vasculaire, la sécrétion de médiateurs inflammatoires et l'infiltration de cellules immunes (Figure 22)[426].

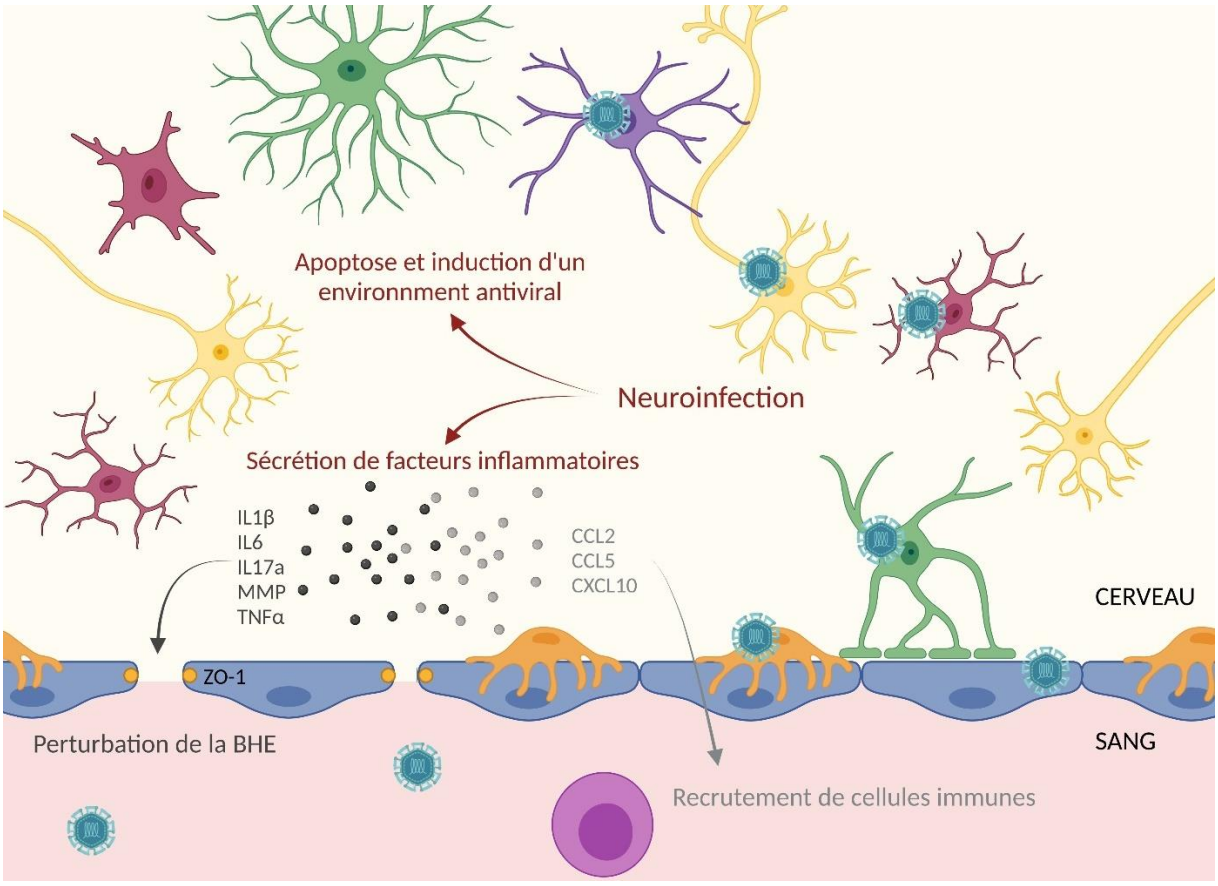


Figure 22 Neuroinflammation suite à l'infection virale du SNC
L'infection des cellules du SNC entraine une neuroinflammation à l'origine d'apoptose cellulaire, instaurant un environnement antiviral mais aussi à l'origine de la sécrétion de facteurs inflammatoires (cytokines et chimiokines par exemple). Cet environnement neuroinflammatoire peut induire des perturbations directes de l'intégrité de la BHE et un recrutement de cellules immunes ; adapté de la revue Constant O. *et al.* 2022, réalisation BioRender.

Les DC, cellules immunes pouvant être recrutées dans le SNC, ont un rôle particulier dans les infections virales, et font l'objet d'études dans ce travail de thèse, c'est pourquoi la section suivante apportera de plus amples informations à ce propos et a été adaptée de la revue **Role of Dendritic Cells in Viral Brain Infections** (Constant O. *et al.*, 2022)[427].

3.4.3 Les cellules dendritiques dans les infections cérébrales

3.4.3.1 Généralités sur le lien entre les cellules dendritiques et le SNC

Les DC sont une population de CPA professionnelles hautement spécialisées grâce à l'expression du CMH de type II et de molécules de co-stimulation qui conduisent à l'activation des lymphocytes T naïfs[428–431]. Elles ont la capacité de capturer des antigènes à la périphérie, comme par exemple dans le derme, pour migrer vers les ganglions lymphatiques proximaux où elles stimulent les lymphocytes T naïfs et engagent la réponse immunitaire adaptative. Elles expriment de nombreux PRR et TLR permettant une sécrétion importante d'IFN de type I et induisant des ISG utilisés pour contrer l'infection[229,432–434]. Cependant, leur capacité à capturer les pathogènes est principalement due à l'expression de lectines et de récepteurs de type lectines qui font partie des PRR, dont les CLR[435]. Bien que les CLR aient des fonctions antivirales établies, de nombreux virus sont capables de détourner ces récepteurs à leur avantage. Par exemple, DC-SIGN s'est avéré pouvoir lier la glycoprotéine gp120 du VIH-1 et favoriser une trans-infection efficace des lymphocytes T $CD4^+$. DC-SIGN est également utilisé pour l'infection des DC par de nombreux virus, comme le cytomégalovirus ou le virus Ebola mais aussi plusieurs *Flavivirus*, dont DENV et WNV[436]. Ainsi, certains sous-types de DC peuvent constituer le point d'accès des virus permettant leur transmission et leur propagation ultérieures dans l'organisme, y compris dans le SNC.

Naturellement présents dans certaines parties du SNC, les DC agissent comme des sentinelles dans des conditions normales mais aussi lors d'atteintes neurologiques[437]. En effet, il a été démontré qu'elles interagissent efficacement avec les barrières cérébrales afin d'accéder au SNC. Tout d'abord, les cytokines et les chimiokines, libérées lors d'une inflammation du SNC, comme le CCL2, peuvent attirer les DC circulantes au niveau des barrières cérébrales. Ensuite, le contact entre les CAM (P-, E-sélectines, VCAM-1, ICAM-2) exprimées par les cellules endothéliales et PSGL-1 et DC-SIGN sur les DC permet le roulement et l'adhésion sur la surface apicale de la BHE[438]. Ces étapes peuvent être suivies d'une transmigration, facilitée par l'interaction de DC-SIGN avec les CAM ou les protéines de jonctions serrées (Figure 23 A). Il est intéressant de noter que les DC peuvent également exprimer des protéines de jonctions serrées pour faciliter cette étape sans effet délétère sur l'intégrité de la BHE[439].

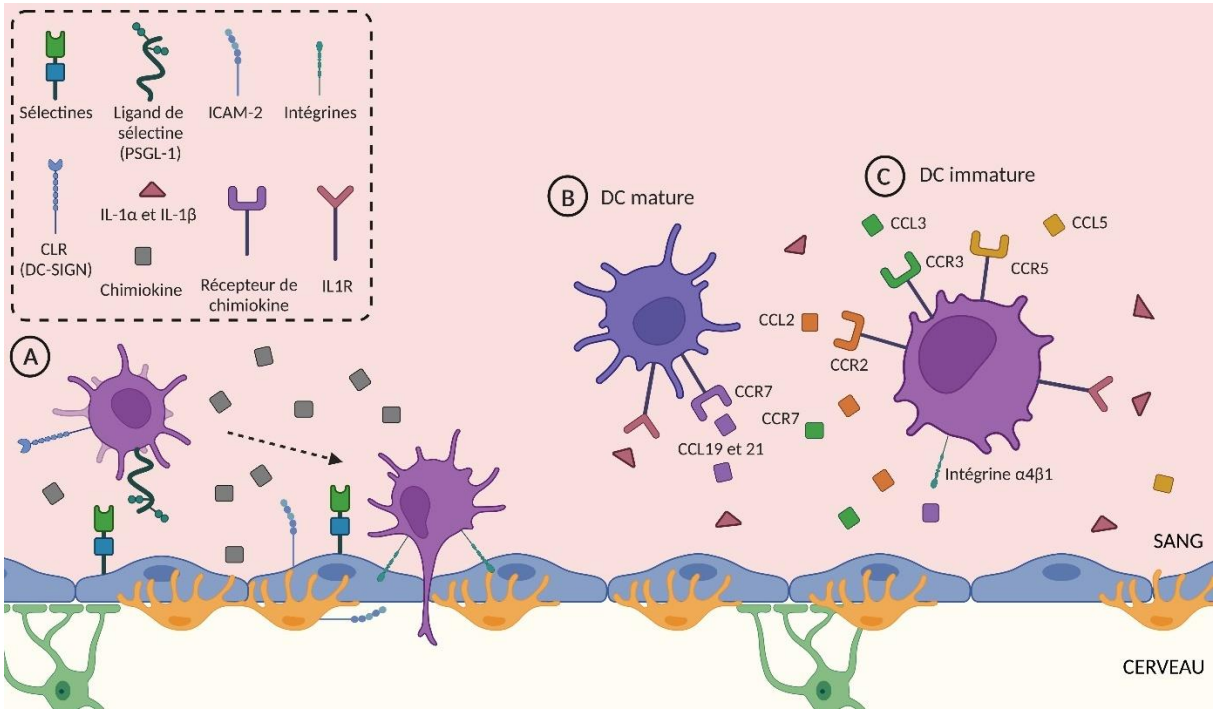


Figure 23 Interactions des cellules dendritiques avec la BHE
Sous l'effet de médiateurs inflammatoires (comme les chimiokines) libérés suite à la neuroinflammation par exemple, les DC peuvent interagir avec la BHE. (A) Un contact stable est établi par l'interaction de CAM facilitant l'adhésion. La diapédèse se fait à l'aide des interactions entre les CAM, les intégrines et les sélectines. (B) Les DC matures sont recrutées en partie grâce à l'expression de CCR7 et d'IL-1R augmentant l'attraction par les médiateurs sécrétés CCL19, CCL21, IL-1α et IL-1β. (C) Le recrutement des DC immatures est facilité par l'expression d'IL-1R, CCR2, CCR3 et CCR5 qui interagissent avec IL-1α, IL-1β, CCL2, CCL3 et CCL5. Adapté de la revue Constant O. *et al*. 2022, réalisation BioRender

En outre, l'infiltration neuronale peut dépendre de l'état des DC. En effet, pendant l'activation et l'arrêt, la migration des DC matures à travers la BHE peut être améliorée par l'interaction de CCR7 avec CCL19 et CCL21 (Figure 23 B), alors que les DC immatures peuvent être attirés par CCR2, CCR3 et CCR5, qui interagissent respectivement avec CCL2, CCL3 et CCL5[420,440] (Figure 23 C). Aussi, les DC immatures ont une meilleure capacité à traverser la BHE que les DC matures, en partie en raison de l'expression différentielle des signaux de trafics spécifiques à leur surface[441,442]. *In vitro*, il a été démontré que la transmigration des DC induites par GM-CSF à travers la BHE était augmentée en présence de CCL3. D'autre part, les DC devenant matures suite à une exposition au GM-CSF sécrètent des MMP permettant une transmigration facilitée à travers la BHE avec une redistribution des molécules de jonctions serrées[443].

3.4.3.2 Le rôle de cheval de Troie

Les DC et les cellules de Langerhans (un sous-type de DC) résidents des muqueuses et de la peau, qui constituent la première ligne de défense et une barrière immunitaire contre une multitude de pathogènes externes, sont aussi des acteurs clés de la propagation de l'infection vers les ganglions lymphatiques et d'autres sites distaux[229]. Ces cellules peuvent être des vecteurs viraux vers le SNC et

vont également amplifier localement la réponse inflammatoire qui, dans certaines conditions, peut aggraver l'issue de l'infection[444,445]. Cependant, les connaissances actuelles sur le rôle de ces cellules dans l'évasion, la transmission et la dissémination systémique du virus sont limitées.

En ce qui concerne les mécanismes de recrutement des DC pendant une infection virale, la libération de chimiokines ou de CAM initie le processus. Par exemple, il a été mis en évidence le rôle de VCAM-1 dans le recrutement des DC lors de l'infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire chez la souris[446]. De plus, une importante expression et production d'IL-1α et IL-1β ont été rapportées au cours de la neuroinflammation induite par une encéphalite virale[224,447], l'IL-1 participe à l'activation des lymphocytes et à l'infiltration leucocytaire en augmentant l'expression de CAM et l'induction d'autres cytokines et chimiokines. Elle peut aussi être libérée par la microglie et les cellules endothéliales cérébrales, ce qui conduit à l'augmentation des lésions de la BHE et au recrutement de leucocytes. Dans les cerveaux de souris infectées par le HSV-1 avec une délétion de CXCL10, il y a une diminution et même une absence de cellules NK, de cellules T $CD8^+$ et de DC, ce qui se traduit par des charges virales importantes avec des défauts conséquents du SNC[448]. L'implication de la perméabilité de la BHE pendant l'infection par JEV chez des souris déficientes en $CD11^{hi}$DC illustre également l'importance de ces cellules dans la régulation des infections cérébrales[449].

Les DC peuvent donc participer à la dissémination virale par le mécanisme de cheval de Troie[450]. Ce mécanisme a été rapporté dans le cas d'infection cérébrale par ZIKV[451]. Concernant l'infection cérébrale par le virus Nipah, des rapports établissent aussi que l'accès principal se fait par le transfert de DC infectés du sang vers le SNC[392]. TOSV a été trouvé dans des DC provenant de la circulation sanguine d'animaux et d'humains infectés. Or il a été montré que les DC infectées par TOSV produisent de l'IL-6 et du TNF-α, des cytokines pro-inflammatoires capables de déréguler la BHE. Ainsi, les DC infectées par TOSV peuvent constituer une voie d'accès au SNC[391]. Du côté de la barrière du plexus choroïde, il a été montré que les monocytes et les DC infectés par le VIH peuvent permettre l'invasion virale du cerveau après le passage du plexus choroïde. Ainsi, des études ont proposé que l'encéphalite à VIH soit principalement due à l'infection du SNC à travers les plexus choroïdes[452,453].

3.4.3.3 Le rôle dans la réponse antivirale cérébrale

De nombreuses études révèlent le rôle des DC dans la neuroinflammation au cours des infections virales du cerveau. Parmi ces différents rôles, ils participent à la régulation des réponses des lymphocytes T. Dans un modèle murin d'encéphalite virale, la déplétion des DC périphériques a conduit à une diminution de la présentation virale aux lymphocytes T $CD8^+$ et à un retard de la clairance virale du cerveau, illustré par un taux de mortalité croissant[438]. De même, dans le modèle de maladie démyélinisante induite par le virus de l'encéphalomyélite murine de Theiler, les lymphocytes T sont

activés contre l'épitope de myéline endogène en raison d'une présentation de l'antigène par les DC directement dans le SNC[454]. Le virus Epstein-Barr infecte préférentiellement les lymphocytes B et les immortalise, mais les DC jouent un rôle durant cette infection. En effet, ils peuvent initier une réponse immunitaire innée et adaptative notamment par la détection de l'antigène viral. Ensuite, les DC peuvent activer les cellules NK, $CD4^+$ ou $CD8^+$[455]. Cependant, une réponse dérégulée des lymphocytes T $CD8^+$ contre ce virus peut être à l'origine d'atteintes du SNC[370,456]. Selon ces derniers exemples, les DC sont clairement des activateurs de la réponse des lymphocytes T qui vont participer à la clairance virale mais par conséquent à la neuroinflammation. Concernant les populations de DC impliquées dans cette neuroinflammation, elles peuvent être de différentes natures. Plus généralement, chaque sous-type de DC peut être recruté pendant l'infection du SNC selon les médiateurs neuroinflammatoires[457].

Dans cette section nous avons donc abordé le rôle des DC pour contrôler la propagation du virus dans la circulation systémique, mais nous avons vu qu'elles sont aussi des transporteurs de virus vers le SNC ou des promoteurs de la neuroinflammation. En outre, plusieurs sous-populations de DC peuvent jouer un rôle au cours d'une même infection. D'où l'importance de leur étude pour renforcer la réponse antivirale et contrôler la propagation du virus et la neuroinflammation qui peuvent avoir des conséquences graves et à long terme.

3.4.4 Biomarqueurs de la neuroinflammation

Dans le sang, et parfois dans le LCR, il est possible d'identifier des molécules signatures d'une altération de l'organisme. Ces molécules appelées biomarqueurs peuvent permettre de poser un diagnostic, de suivre l'évolution d'une maladie ou de prévenir des complications[458]. Par exemple, dans le cas des infections par SARS-CoV-2 une étude montre que la présence de D-dimère dans le sang des patients serait corrélée à des atteintes vasculaires et serait signe de gravité[459]. D'autres travaux ont fait état d'une absence de corrélation entre la présence sérique de GFAP, neurofilament (NfL) ou de facteur-15 de croissance et différentiation (GDF-15) et la persistance de symptômes neuronaux chez des patients atteints de Covid-19[460]. Dans le cas d'infection par la DENV, les biomarqueurs sont utilisés pour le diagnostic et permettent de discriminer une infection aigue d'un rétablissement[461]. D'autres types de marqueurs peuvent aussi être bénéfiques à la prise en charge des maladies, comme les signatures transcriptomiques. De récents travaux ont montré qu'une signature de huit gènes pourrait permettre de prédire la progression d'une infection par DENV, vers une forme sévère ou non[462]. Des études ont déjà montré la présence de facteurs pro-inflammatoires dans le sang de patients atteints d'arboviroses. Par exemple, des patients asymptomatiques ou pré-symptomatiques à l'infection par DENV et WNV ont des taux importants d'IFN-γ, IL-1β de CXCL8 et de CXCL9 ; ceux exposés à DENV, WNV ou ZIKV partagent aussi des concentrations élevées d'IL-10, IL-5, IL-17, E-sélectine ou encore IL-2R. Au travers de ces exemples, l'article de R. Fares-Gusmao, *et al.* ne comparent pas les différents

types de patients en fonction de la symptomatologie et donc ne montre pas de marqueurs spécifiques, mais il suggère que même avant l'apparition de symptômes, des profils immunologiques différents peuvent être retrouvés selon le type d'infection[463].

Concernant les atteintes du SNC, la recherche de biomarqueurs permettrait de prédire la sévérité, signifier un certain type de maladies neuronales ou anticiper des effets au long terme. L'utilisation de biomarqueurs sanguins signant une atteinte de la BHE serait un outil non invasif qui contribuerait au diagnostic pour la prise en charge adaptée des patients selon leurs besoins[464]. Par exemple, dans le cas d'une infection bactérienne, la recherche de molécules dans le sang comme les neurofilaments, associée aux taux de molécules pro-inflammatoires, faciliterai la prise en charge de méningite à pneumocoques[465]. L'utilisation de biomarqueurs permettrait donc d'aider la prise en charge des maladies émergentes et préviendrait le développement d'autres maladies neuronales, par exemple, le tout pour répondre à des objectifs de santé publique.

3.5 Atteintes de l'unité neuro-vasculaire

L'unité neuro-vasculaire, et plus particulièrement la BHE, sont impliquées dans certaines pathologies du SNC. Par exemple, dans la SEP, on constate une association entre la présence de lésions cérébrales et celle de perturbation de la BHE[466,467]. L'imagerie médicale révèle aussi une concordance entre les troubles épileptiques et des zones de désorganisation de la BHE[468]. La BHE est aussi dérégulée dans d'autres pathologies neuronales comme les AVC, la maladie d'Alzheimer ou lors du développement de tumeurs cérébrales[469]. Les infections par des pathogènes comme *Streptoccoccus pneumoniae, N. meningitidis, Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Plasmodium falciparum,* ou *Trypanosoma brucei* induisent des méningites ou des encéphalites et sont aussi associées à des atteintes sévères de la BHE[373]. Dans cette partie nous tenterons de faire un état des lieux concernant les connaissances sur ces mécanismes vis-à-vis des virus émergents d'intérêt dans nos travaux.

3.5.1 Infection du SNC par WNV

Suite à l'inoculation du virus WNV, une première virémie va suivre l'infection au niveau des organes du système phagocytaire mononucléé, puis une seconde virémie apparaitra suite à l'infection de la rate et pourra permettre l'accès au SNC par le virus[470]. En plus de sa présence dans le sang, WNV semblent pouvoir infecter les neurones sensorielles et olfactifs lui permettant un accès par transport axonal au SNC[471]. Dans le SNC, WNV peut infecter les neurones et les astrocytes[90,472,473]. Ceci entraine l'apparition des symptômes de type encéphalite, méningite, méningo-encéphalite, syndrome parkinsonien, paralysie aigue flasque ou troubles mentaux[474]. Ces infections ont aussi montré une persistance associée à des séquelles neurologiques et des troubles de la fonction rénale[93].

Plusieurs travaux antérieurs ont révélé des mécanismes d'interactions de WNV avec la BHE. Des modèles *in vitro* de cellules endothéliales (de cordon ombilical et de micro-vaisseaux cérébraux) ont montré une permissivité et la réplication du virus, puis le passage de WNV au travers des structures formées par ces endothéliums[472,475]. D'autres ont montré que le virus pouvait traverser la BHE sans entrainer de perturbations de son fonctionnement et de sa structure mise à part une expression plus importante de certaines CAM et la modulation d'expression des jonctions serrées[476].

L'infection de modèles murins par WNV montre une infiltration microgliale avec activation des monocytes en périphérie qui peuvent être précurseurs de microglie et peuvent être recrutés au niveau du SNC via le CCL2 sécrété notamment par les neurones infectés[477]. Des études ont démontré que pendant l'infection par WNV, le récepteur de l'IL1 (IL1R1) participe à l'activation de deux types de populations de DC ayant des fonctions de CPA : les DC dérivées de la lymphe et les DC migratrices[478–480]. Et suite à une infection par WNV, des souris déficientes en IL-1R1 ont présenté une encéphalite fulminante[481] indiquant une possible corrélation entre le recrutement des DC et les symptômes neurologiques via la libération d'IL1. Une étude *in vivo* montre aussi la présence de virus dans des lymphocytes T du cerveau, il semblerait ainsi que le passage de la BHE par WNV entraine un recrutement accru de cellules immunes, elles-mêmes pouvant convoyer le virus dans le SNC[482,483]. Dans le plasma des patients infectés par WNV, on observe une augmentation de CXCL10. Cette chimiokine est aussi sécrétée lors de l'infection de modèles murins d'encéphalite WNV. CXCR3 est un récepteur de CXCL10 et peut conduire au recrutement de cellules NK et de lymphocytes T dans le cerveau[484]. A propos du mécanisme de cheval de Troie, des rapports font état d'une invasion du SNC par WNV via l'infection de monocytes, de neutrophiles ou de macrophages[485–487]. D'ailleurs, des macrophages murins infectés par WNV montrent une augmentation des niveaux transcriptomiques et protéiques de MMP-9 suite à l'infection par WNV. Cette enzyme peut avoir des effets délétères sur la BHE et faciliter l'infection du SNC par WNV[488]. Dans le cas d'une infection *in vitro* par WNV, on observe une augmentation de l'expression de MMP-3 et MMP-9 par les astrocytes et une dégradation des protéines de jonctions serrées dans l'endothélium. Dans cet exemple, ils montrent que l'intégrité de la BHE n'est pas perturbée par les monocytes infectés mais que c'est l'infection de la BHE qui induit la perméabilité et accélère la transmigration des monocytes[486]. Des travaux montrent également que l'infection par WNV entraine une dérégulation de l'expression des protéines de jonctions, une perturbation de la BHE via l'action de cytokines comme l'IL-6 ou le TNF-α et un recrutement important de leucocytes[489–491]. A ce propos, *in vivo*, la délétion de TLR-3 sur un modèle murin semble réduire les effets de WNV sur la BHE, l'infection virale du SNC et le recrutement des cellules immunes[492]. De la même manière, des souris n'exprimant pas ICAM-1 sont plus résistantes aux formes neuroinvasives d'infection par WNV[493]. Il semble alors que les effets délétères de WNV sur le SNC soient imbriqués avec la neuroinflammation.

3.5.2 Infection du SNC par USUV

Comme WNV, USUV présente une phase sanguine après infection par une piqûre de moustique aboutissant à une virémie, probablement de courte durée. Des évidences d'atteintes neuronales ont pu être démontrées chez des patients infectés par ce virus. De plus, des analyses du LCR de certains de ces patients révèlent la présence du virus par RT-qPCR, le tout évoque donc l'infection directe du SNC par le *Flavivirus* USUV[106,132].

In vitro, des cellules vasculaires endothéliales ont montré une permissivité à l'infection par USUV[494]. Les travaux préliminaires de l'équipe ont pu mettre en évidence la permissivité et l'infection d'un certain nombre de types cellulaires neuronaux : les neurones, les astrocytes, les cellules microgliales ainsi que des cellules souches neuronales[495]. Des cellules neuronales dérivées de cellules souches pluripotentes ont aussi révélé une permissivité à l'infection par USUV suivie d'une expression de cytokines (IFN de type I, IL-1β et caspase-3) qui reste cependant plus faible que pour l'infection par WNV[496]. Lors de l'étude *in vivo* et *in vitro* de la neuroinfection par la lignée Africa 2 du virus USUV, lignée retrouvée chez un patient montpelliérain, il est montré une réplication efficiente du virus dans des modèles de BHE et d'épithélium pigmentaire rétinien sans dégradation de leur intégrité, et des effets néfastes importants au niveau du SNC accompagnés d'une inflammation très élevée[242]. Une autre étude comparant l'infection par différentes méthodes (intradermique, intra-nasale, sous-cutanée ou intra-péritonéale) de souris de 5 semaines, montrent que malgré leur survie, les souris développent des formes d'infection du SNC accompagnées de la production d'anticorps[141]. Sur des souris allaitantes, d'autres études ont révélés que l'infection par USUV entrainait une dégénérescence neuronale avec apoptose et démyélination[497].

3.5.3 Infection du SNC par SARS-CoV-2

Depuis le début de la pandémie, SARS-CoV-2 a révélé un grand nombre de cas de complications neurologiques, et la présence du virus ou de protéines virales a été montré dans le cerveau, les cellules endothéliales du bulbe olfactif et/ou le LCR de certains patients décédés[498–502]. Parmi les symptômes les plus courants, l'anosmie et l'agueusie suggèrent une infection direct des neurones et notamment du bulbe olfactif qui pourraient être une porte d'entrée du virus vers le SNC[377,503,504]. Egalement, l'imagerie de patients a révélé la présence de dégénérations neuronales importantes via la voie olfactive associée à une neuroinflammation et la perte de l'odorat[505]. De plus il a été démontré que le virus pouvait infecter différents types neuronaux *in vitro*[506–508]. Et la neuroinvasion par le SARS-CoV-2 pourrait être associé au cas de complications avec arrêts respiratoires ou cardiaques[509,510]. Par ailleurs, des cas d'hémorragies cérébrales, de thromboembolies veineuses ou de pathologies vasculaires cérébrales et de coagulopathies ont été rapportés suggérant des effets directes sur la BHE[511–515]. *In*

vitro et *in vivo*, sur différents types de modèles, des études montrent que la protéine de surface (S), ou la sous-unité S1, peut interagir avec la BHE, en la traversant et/ou en la déstabilisant. La présence, parfois à d'importante concentration, de la protéine S dans le sang des patients peut donc engendrer des troubles de l'endothélium cérébral pouvant potentiellement être à l'origine des symptômes neuro-vasculaires, et du passage de virus dans le SNC[516–518]. La protéase virale M^{pro} du SARS-CoV-2 semble aussi provoquer des effets sur la BHE en induisant l'apoptose des cellules endothéliales via l'inhibition de la voie NF-κB[519]. Dans une étude de cohorte de patients Covid-19 présentant des déficiences neurologiques, il apparaît que les DC présentes dans le LCR ont un profil différent de celui du sous-ensemble de DC normaux présentes dans ce LCR. Elles sont plus susceptibles d'interagir avec les lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$, et jouent un rôle critique dans l'émergence des symptômes neuronaux[520].

Chez des patients décédés des suites de l'infection, on retrouve une infiltration dans le parenchyme de protéines sériques et de cellules immunes ainsi qu'une activation des cellules endothéliales et une perturbation de la vascularisation cérébrale[521]. Au niveau du plexus choroïde, le virus semblent infecter les cellules épithéliales et entrainer une forte inflammation collaborant au choc cytokinique[522]. Si les mécanismes d'infection du SNC par le SARS-CoV-2 sont encore peu définis, les efforts de la communauté scientifique ont permis de répondre à certaines questions rapidement, et il semblerait que cette infection et les effets en découlant soient fortement liés à la neuroinflammation.

D'autres conséquences liées aux infections par le SARS-CoV-2 sont les effets au long terme, en effet 80% des patients gardent des séquelles dont les plus courantes sont : de la fatigue, des malaises, des maux de tête, des douleurs musculaires et/ou articulaires, de la dyspnée, et des pertes ou une défaillance de la mémoire[523,524]. Or ces symptômes sont souvent relatifs à une atteinte du SNC, ils peuvent perdurer jusqu'à 6 mois après l'infection aigue. Par exemple des études ont montré que les patients ont des risques supplémentaires de développer des troubles de l'anxiété, des troubles de l'humeur ou des troubles psychotiques[525,526]. Le syndrome de fatigue chronique (ou encéphalo-myélite myalgique) est aussi attribué à la neuroinflammation développée lors des infections par SARS-CoV-2. En effet la persistance d'un état inflammatoire dans l'encéphale, comme une activation prolongée de la microglie, peut être associé à ce syndrome de fatigue chronique[527]. L'activation et le recrutement au niveau cérébral ou du LCR des cellules immunes lors des infections par SARS-CoV-2 peut aussi expliquer le développement de séquelles neurologiques post-Covid[528]. Récemment, des travaux suggèrent que l'infection des cellules du SNC par le virus lorsqu'elle se fait est transitoire, mais que la neuroinflammation induite serait le facteur majeure du développement de ces séquelles neurologiques[529,530]. Cette part de la maladie aussi appelée neuro-Covid-19, questionne sur le devenir des patients et de leurs fonctions cognitives sur de plus longue durée.

Chapitre 2 : Objectifs & Hypothèses

Comme évoqué en introduction, le passage de la BHE par les virus pour accéder au SNC peut se faire de différentes manières et avoir différents types de conséquences, sur la barrière et sur le SNC. L'infection de la BHE ou du SNC ainsi que l'infection en périphérie, que ce soit au niveau de l'épiderme et du derme dans un premier temps pour les arbovirus, ou au niveau du tractus nasopharyngé ou des poumons pour les virus respiratoires, entrainent une forte réponse inflammatoire de l'hôte. Cette réaction peut alors donner lieu à l'activation de réponse immune telle que le recrutement de cellules immunes. Au niveau du SNC, ce recrutement, ainsi que l'inflammation provoquée localement, vont amplifier la neuroinflammation. Or celle-ci peut avoir des conséquences délétères notamment sur le long terme sur nos fonctions cérébrales.

Afin d'approfondir la caractérisation et la description scientifique de virus émergents neurotropes, cette thèse développe plusieurs aspects : (i) la caractérisation des interactions du virus SARS-CoV-2 avec des modèles de BHE, (ii) la description et la comparaison des interactions de différentes lignées de USUV et de WNV avec la BHE, (iii) l'étude de la neuroinflammation associée à l'infection par WNV chez l'humain, et (iv) l'étude du contexte de circulation de USUV et WNV dans la région de Montpellier par une approche dite « One Health ».

Pour répondre à ces objectifs plusieurs avant-propos sont nécessaires.

(i) Dans le contexte de l'émergence rapide du SARS-CoV-2, un effort international et sans précèdent de recherche scientifique a été mis en place afin de caractériser ce virus et de mieux appréhender la maladie qui découle de l'infection. L'infection par SARS-CoV-2 peut avoir des effets au niveau neurologique avec notamment une fatigue prolongée, des troubles cognitifs (troubles somatoformes par exemple), des syndromes de Guillain-Barré ou encore des troubles neuro-vasculaires (endothéliopathie)[531,532]. Quand de nombreux travaux ont montré un accès possible du virus au SNC par l'infection des nerfs du bulbe olfactif, nous nous sommes attachés à la description des interactions du virus avec les cellules de la BHE afin de savoir si ce virus pouvait infecter ces cellules, entrainer des troubles fonctionnels de la BHE expliquant les symptômes vasculaires, ou si l'inflammation due à l'infection en périphérie pouvait perturber cet endothélium.

(ii) Concernant les arbovirus USUV et WNV, leur potentiel neurotropique est connu, on sait par exemple que le virus WNV peut infecter le SNC par infection des nerfs en périphérie et transport axonal, des travaux ont également montré que des monocytes pouvaient jouer un rôle dans l'infection du SNC par WNV. USUV a été décrit comme étant capable d'infection de nombreux types cellulaires neuronaux mais l'investigation de l'accès au SNC est encore peu approfondie. Or, en Europe notamment, différentes lignées de ce virus circulent et sont associées à des manifestations cliniques

variables pouvant donner lieu à des cas plus graves notamment pour la lignée Europe 2. Nous avons donc voulu étudier les différences de neurotropisme entre les lignées USUV, qui pourrait expliquer les différences de symptomatologie. Puis nous nous sommes intéressés à l'infection de la BHE et aux rôles des cellules immunes dans l'accès des virus au SNC. Nous avons alors travaillé sur les différences de sensibilités de la BHE aux virus USUV lignée Europe 2 et WNV lignée 2, en intégrant une étude sur le recrutement des cellules immunes et leur interaction avec la BHE dans différents contextes d'infection.

(iii) Le virus WNV ayant montré un fort neurotropisme et étant une cause importante d'encéphalites, de méningites et de méningoencéphalites arbovirales (notamment la première cause aux Etats-Unis)[533], nous avons étudié la présence de biomarqueurs de ces atteintes. Ces molécules retrouvées dans le sérum ou le LCR peuvent être des outils de diagnostics, de prise en charge des patients et de leur suivi.

(iv) Enfin, pour contextualiser ce travail, des études sur la circulation et l'exposition de la faune régionale (région de Montpellier et Camargue) aux virus USUV et WNV ont été menées et s'inscrivent dans une démarche « One Health » pouvant fournir des données indispensables à la prévention des risques épidémiques que sont les arbovirus.

Afin d'évaluer les interactions des virus émergents étudiés, des méthodes *in vitro*, compléter par des données *in vivo* (sur modèles murins) ont été utilisées. L'évaluation de la permissivité des cellules à l'infection a été menée avec des méthodes de titrages et d'imagerie ; la caractérisation des effets de l'infection a été définie par des méthodes de transcriptomiques (RT-qPCR) et de protéomiques (ELISA) ; et les effets sur la structure de la BHE ainsi que sur le rôle des cellules immunes ont été investiguées à l'aide de mesure de perméabilité, d'imagerie, de transcriptomiques (RT-qPCR) et de protéomiques (FACS). Concernant l'étude de la neuroinflammation suite à l'infection par WNV, nous avons pu utiliser des tests ELISA en multiplex permettant la quantification de nombreuses molécules se rapportant à l'inflammation et l'atteinte neuronale. Pour l'approche « One Health », nous avons travaillé en étroite collaboration avec notamment le CIRAD et l'ANSES, et étudier la sérologie de nombreuses espèces grâce à des tests ELISA et des outils de séroneutralisation, nous avons aussi pu réaliser des études moléculaires grâce aux méthodes de RT-qPCR.

Les travaux présentés dans cette thèse tentent d'apporter des connaissances et des réponses concernant l'infection par des virus émergents neurotropes à plusieurs niveaux : la caractérisation de l'infection de la BHE, élément important dans l'accès au SNC ; le rôle des cellules immunes dans cette infection ; la recherche de marqueurs des atteintes neuronales et de la neuroinflammation ; et l'état des lieux de la diffusion de ces virus dans le sud de la France.

Chapitre 3 : Résultats

1 Infection de la barrière hémato-encéphalique

1.1 Interactions du virus SARS-CoV-2 avec la BHE

Rapidement après son émergence, les infections par SARS-CoV-2 ont été associées au développement de symptômes neurologiques comme des syndromes de Guillain-Barré ou des encéphalites hémorragiques nécrosantes aigues. Ce dernier symptôme est lié à l'affection des vaisseaux cérébraux dont la BHE. Travaillant sur l'infection de modèles de BHE par différents virus émergents, les arbovirus, le laboratoire a voulu mettre en place l'étude des effets et des interactions du SARS-CoV-2 avec cette structure qui peut aussi être une porte d'entrée pour le virus dans le SNC.

Nous avons donc travaillé sur l'infection par le virus de différentes cellules primaires de la BHE : des cellules endothéliales, des péricytes et des astrocytes ; mais aussi d'un modèle *in vitro* humain de BHE. Pour cette étude, nous avons réalisé l'analyse de la permissivité puis de la réplication virale, nous avons étudié les effets sur la réponse antivirale et l'intégrité de la BHE. En collaboration avec le centre hospitalo-universitaire (CHU) de Montpellier, nous avons aussi pu investiguer l'inflammation dans le sérum de patient et l'effet de ces sérums sur l'intégrité de la barrière.

Ce projet a permis de mettre en évidence une faible permissivité de nos modèles cellulaires de BHE pour SARS-CoV-2, ainsi qu'une faible et transitoire réplication du virus associée à une réponse antivirale très modéré. De plus le virus ne semble pas entrainer de modulation de l'intégrité dans ce modèle de BHE. Nous montrons notamment que les différents types cellulaires de l'étude ont une faible voire une absence d'expression du récepteur du virus ACE-2, ce qui conforte nos résultats malgré une expression des cofacteurs d'internalisation du virus. Enfin, nous avons pu montrer que les patients atteints de Covid-19 ont de fortes concentrations plasmatiques de molécules inflammatoires appuyant les données sur le choc cytokinique que développent certains patients. Cependant nos échantillons n'ont pas montré d'effets sur l'intégrité du modèle *in vitro* de BHE.

L'infection du SNC par ce virus émergent n'est pas encore entièrement décryptée, toutefois il semble que le virus n'interagit pas directement avec nos modèles de BHE.

frontiers in Immunology

ORIGINAL RESEARCH
published: 27 July 2021
doi: 10.3389/fimmu.2021.697329

SARS-CoV-2 Poorly Replicates in Cells of the Human Blood-Brain Barrier Without Associated Deleterious Effects

Orianne Constant[1], Jonathan Barthelemy[1], Karine Bolloré[1], Edouard Tuaillon[1], Fabien Gosselet[2], Christine Chable-Bessia[3], Peggy Merida[4], Delphine Muriaux[3,4], Philippe Van de Perre[1,5], Sara Salinas[1†] and Yannick Simonin[1*†]*

[1] Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, University of Montpellier, INSERM, EFS, Antilles University, Montpellier, France, [2] Univ. Artois, UR 2465, Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE), Lens, France, [3] Centre d'Etude des Maladies Infectieuses et de Pharmacologie Anti-Infectieuses, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France, [4] Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France, [5] Laboratory of Virology, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Pei-Hui Wang, Shandong University, China

Reviewed by:
Chen Xie, Sun Yat-Sen University, China
Nicholas Lennemann, University of Alabama at Birmingham, United States
Zhining Li, The Chinese University of Hong Kong, China

***Correspondence:**
Sara Salinas
sara.salinas@inserm.fr
Yannick Simonin
yannick.simonin@umontpellier.fr

†These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Viral Immunology, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: *20 April 2021*
Accepted: *05 July 2021*
Published: *27 July 2021*

Citation:
Constant O, Barthelemy J, Bolloré K, Tuaillon E, Gosselet F, Chable-Bessia C, Merida P, Muriaux D, Van de Perre P, Salinas S and Simonin Y (2021) SARS-CoV-2 Poorly Replicates in Cells of the Human Blood-Brain Barrier Without Associated Deleterious Effects. Front. Immunol. 12:697329. doi: 10.3389/fimmu.2021.697329

Various neurological symptoms have been associated to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection including headache, fever, anosmia, ageusia, but also, encephalitis, Guillain-Barre syndrome and ischemic stroke. Responsible for the current coronavirus disease (COVID-19) pandemic, SARS-CoV-2 may access and affect the central nervous system (CNS) by several pathways such as axonal retrograde transport or through interaction with the blood-brain barrier (BBB) or blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier. Here, we explored the molecular and cellular effects of direct SARS-CoV-2 infection of human BBB cells. We observed low replication of SARS-CoV-2 that was accompanied by very moderate inflammatory response. Using a human *in vitro* BBB model, we also described low replication levels without strong inflammatory response or modulation of endothelium integrity. Finally, using serum samples from COVID-19 patients, we highlighted strong concentrations of pro-inflammatory factors that did not perturb BBB integrity after short term exposure. Altogether, our results show that the main mechanism of brain access following SARS-CoV-2 infection does not seem to be directed by brain infection through endothelial cells.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, central nervous system, blood-brain barrier, inflammation

INTRODUCTION

On December 2019, 31th, the World Health Organization (WHO) was informed of an atypical case of pneumonia with unknown origin in Wuhan, Hubei region, China (1). This was the official beginning of the current pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by a novel human β-coronavirus and that led to more than 2 800 000 deaths worldwide to date (April 2021). The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is closely related to

SARS-CoV, responsible of the 2002-2003 epidemic, mainly in China (2). They are both single-stranded RNA viruses and share the same major human receptor, the angiotensin converting enzyme 2 (ACE-2) (2, 3). SARS-CoV-2 infection can be asymptomatic or cause mild to moderate disease such as fever and respiratory disorders, or serious acute respiratory distress syndrome (ARDS) that can be associated with death (4). COVID-19 symptomatology, in particular for severe cases, is mainly due to immune system dysregulation that lead to cytokine storm and strong deleterious effects on organs (5, 6).

Others common symptoms include fatigue, dry cough, diarrhea or conjunctivitis. Importantly, many patients developed also neurological impairments including nausea, vomiting, anosmia, ageusia, headache, dizziness, encephalitis, meningoencephalitis, Guillain-Barre syndrome, epileptic seizures, ischemic and hemorrhagic stroke. The mechanisms of neuroinfection and potential direct effects of SARS-CoV-2 in the central nervous system (CNS) are still poorly characterized (7–11). During the two last coronavirus epidemics, SARS-CoV in 2002-2003 and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in 2012, neurological manifestations were also reported (12). The presence of SARS-CoV was detected in the brain and cerebrospinal fluid (CSF) of deceased patient (13), whereas 4 patients infected by MERS-CoV developed Bickerstaff's encephalitis and Guillain-Barre syndrome, without any associated respiratory symptoms (14). Recent studies in COVID-19 patients have described the presence of viral RNA in brain tissues (15–17) and viral proteins in endothelial cells of the olfactory bulb (18) or in the CNS (17). Thus, suggestions of direct CNS infection by SARS-CoV-2 have been proposed especially since studies have shown susceptibility to infection of various models *in vivo* and *in vitro* (mouse models, organoids, induced pluripotent stem cell-derived neurons) (19–22). Furthermore, pathological effects on the blood brain barrier (BBB) of the viral protein spike were suggested, that could be consistent with a direct effect of the virus on the BBB homeostasis (23, 24). Notably, in SARS-CoV-2 infections, intracerebral hemorrhages have been reported (25, 26), indicating the negative impact of the virus at the cerebrovasculature (27). Recent evidence indicate a thromboembolic risk in COVID-19 patients (28–31) and the hypothesis of BBB involvement during SARS-CoV-2 infections is clearly emerging (31).

Viruses can reach the CNS by several mechanisms such as axonal transport, direct infection of brain microvascular endothelial cells, transcytosis or by the "Trojan horse" mechanism using infected immune cells from the systemic circulation that can naturally cross brain barriers (32–34). After viral infection, the systematic production of inflammatory cytokines can temporally cause BBB dysregulation, which, in some case, allows further viral entry and facilitates CNS invasion (35).

In this study, we aimed to monitor potential direct SARS-CoV-2 infection of BBB cells and the permissivity of a human *in vitro* model of BBB to infection and systemic inflammatory environment. We employed a cellular BBB model using human brain-like endothelial cells (hBLECs) differentiated from hematopoietic stem cells, presenting the main characteristics of the human BBB (36–39) and previously used to explore other virus infection and replication mechanisms (40–42). Finally, we investigated the role of the inflammatory environment in plasma of COVID-19 patients on the BBB integrity. Investigating the mechanisms used by SARS-CoV-2 to cause neurological impairments and highlighting the neuropathogenesis of this new human β-coronavirus will allow deeper knowledge on brain viral infection, better COVID-19 patient care and possibility to help in the global research effort.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Vero E6 cells (African green monkey kidney cells) were obtained from ECACC and maintained in complete Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Pan Biotech) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 25 mM HEPES buffer, 100 µg/mL streptomycin and 100 U penicillin. Huh7 (hepatocellular adenocarcinoma) were grown in the same complete DMEM without HEPES buffer. Human pericytes (human brain vascular pericytes, catalog #1200, ScienCell) and astrocytes (astrocytes, catalog #1830, ScienCell) were maintained on poly-L-lysine-coated plates whereas human cerebral endothelial cells (CECs (human brain microvascular endothelial cells), catalog #1000, ScienCell) were grown on fibronectin-coated plates and cultured according to the manufacturer's instructions.

Virus Strain and Cellular Infection

The strain BetaCoV/France/IDF0372/2020 was supplied by the National Reference Centre for Respiratory Viruses hosted by Institut Pasteur (Paris, France) and headed by Dr. Sylvie van der Werf. The human sample from which strain BetaCoV/France/IDF0372/2020 was isolated has been provided by Dr. X. Lescure and Pr. Y. Yazdanpanah from the Bichat Hospital. Moreover, the strain BetaCoV/France/IDF0372/2020 was supplied through the European Virus Archive goes Global (Evag) platform (European Union's Horizon 2020 research and innovation program grant agreement No 653316). The virus was amplified on 80% confluent Vero E6 cells at MOI 0.01; supernatant was collected 72 hours later; samples were collected after centrifugation at 250*g* to remove cellular debris and kept at -80°C. Viral titers were determined using the Spearman-Kärber method and expressed as 50% tissue culture infective dose per milliliter (TCID50/mL).

All infections were done on 80% confluent cell culture, at MOI 1 or 10, in reduced volume of medium during 2 hours at 37°C with permanent agitation before removing inoculum. For each experiments, triplicates were achieved. Supernatants of all experiments were collected at 2, 6 and 10 dpi. Viral replication in each cellular types was determined using the Spearman-Kärber method on previously collected supernatants and expressed as 50% tissue culture infective dose per milliliter (TCID50/mL) as previously published (43).

Human Blood-Brain Barrier Model and Permeability Tests

As previously published (40), the *in vitro* human BBB model (**Figure 1E**) is based on $CD34^+$ blood-derived endothelial cells cultured on Matrigel-coated Transwell filters (Costar, 0.4 µm).

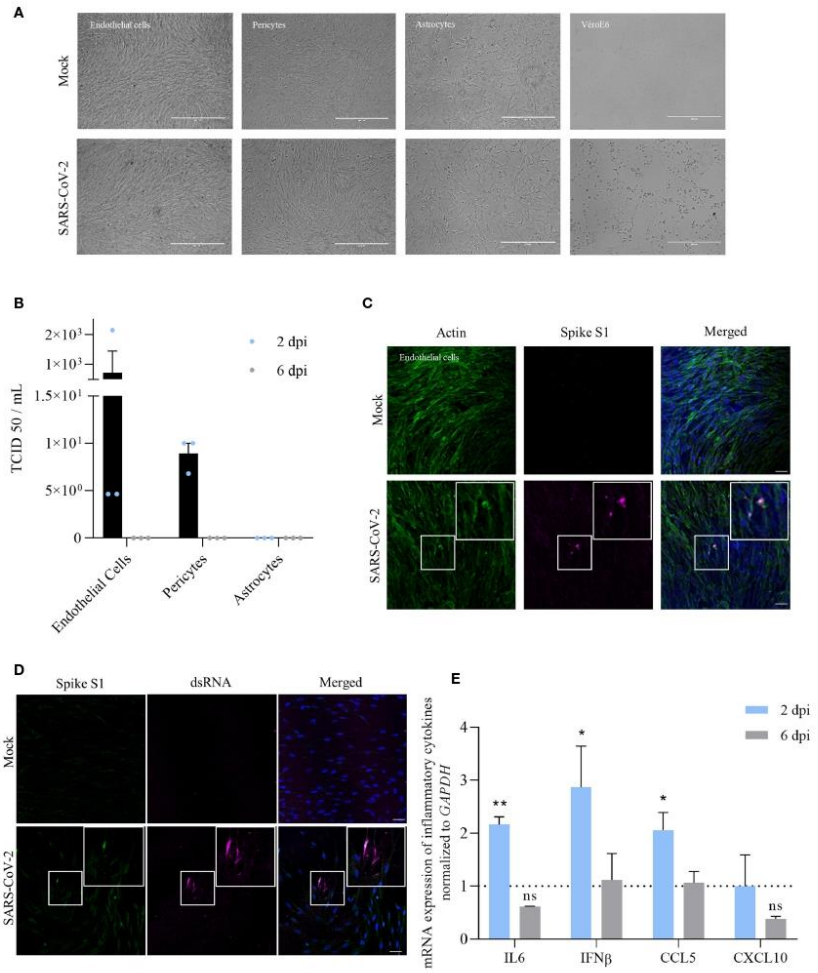


FIGURE 1 | Infection of the BBB cells by SARS-CoV-2 shows a limited replication and induction of cytokine response at MOI of 10. **(A)** Images of the different human BBB cells and Vero E6 infected by SARS-CoV-2 or mock-infected after 2 dpi at MOI 1. **(B)** TCID50 measurements on Vero E6 cells of supernatants of different BBB cells 2 and 6 dpi (MOI 1). Results are expressed as mean ± SEM. **(C)** Immunofluorescence staining of spike subunit S1 in CEC at MOI 10 shows strong staining is sparse cells and diffuse staining that could represent basal replication. Scale bar = 50 µm. **(D)** Immunofluorescence staining of dsRNA in CEC at MOI 10. Scale bar = 50 µm. **(E)** RT-qPCR analyses of *IL-6*, *IFN-β*, *CCL5* and *CXCL10* mRNA expression after 2 or 6 dpi from human brain endothelial cells infected by SARS-CoV-2 at MOI 10. Results are expressed as means ± SEM of fold change regulation compared to non-infected cells (n = 6, ns, non significant, $^{*}p < 0.05$ $^{**}p < 0.01$).

Collection of human umbilical cord blood was done after infants' parents signed consent form in compliance with French legislation. The cultivation protocol was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH Number DC2011-1321), and all experiments were carried out in accordance with the approved protocol.

Filters are placed on top of bovine brain pericytes in 12-well plates, which lead after differentiation to human brain-like endothelial cells (hBLECs) that reproduce the main characteristics of the human BBB in terms of tight-junctions and specific transporters expression (36, 44). Medium was changed every 2 days for 6 days and then endothelial permeability (Pe) was

measured with Lucifer Yellow (LY) (20µM; Life Technologies). In physiological conditions, LY is a small hydrophilic molecule presenting a low cerebral penetration. Briefly, Pe was calculated after 1 hour of LY paracellular passage by detection of fluorescence performed on a Tecan SPARK 10M machine with 432/538 nm of excitation/emission wavelength (nm) settings. Endothelium was considered as impermeable when Pe < 1 x 10^{-3} cm/min according to the protocol (37). Viral infection was performed 5 to 6 days after system establishment at MOI 1 and then supernatants were collected at 2, 6 and 10 dpi. As mentioned above, viral replication was determined using the Spearman-Kärber method. For the plasma study, 50 µL of pure plasma sample (7 plasmas from COVID-19 patients and 5 healthy control plasma; all selected randomly) were added directly on the BBB in 300 µL of media for 48 hours. In all the cases (after 6 or 10 days for viral infection; 2 or 24 hours after spike incubation; after 48 hours of plasma incubation), permeability was assessed as described here.

Permeability was also estimated by the measure of transendothelial electric resistance (TEER) using the Epithelial Volt/Ohm Meter EVOM2 (World Precision Instruments, Hertfordshire, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, electrodes were sterilized in 70% ethanol for 5 min, rinsed in MilliQ water and equilibrated in BBB media. Then, electrodes were placed in the compartmentalized chambers with the longer electrode vertically touching the bottom of the dish in the lower chamber and the shorter electrode in the upper chamber without touching the cell layer. Values of TEER was recorded once stabilized and to calculate the final TEER values (Ohms.cm^2), a background measurement of Matrigel (coated insert without cells) was subtracted from the reading and the value was multiplied by the growth surface area.

Virus Binding Assay

Endothelial cells were placed on fibronectin-coated 24-wells plates and incubated with goat anti-ACE-2 IgG [15µg/mL, described to block receptor-ligand interaction by Hoffman et al. (45)] during 1 hour at 37°C before infection at MOI 10 during 1h at 4°C. Inoculum was removed after infection and supernatants were collected 2 dpi for TCID50 assay.

Western Blot

Human pericytes, endothelial cells and Vero E6 cells were cultured for 48 h. Then, cells were washed twice in PBS, directly lysed with RIPA. Total protein concentration was calculated using a Bradford protein assay kit. 17µg of total cell lysates were diluted in Laemmli buffer and proteins were separated by SDS-PAGE on 8% (for human Ace2-protein) acrylamide gels. Gels were transferred to PVDF membrane using wet transfer with Tris-glycine-methanol buffer. Membranes were washed in TBS, blocked with 5% milk in TBS-Tween for 30min and incubated overnight at 4°C with primary antibody: anti-human ACE2 (Santa cruz, cat# sc73668), diluted at 1:500 in TBS-T with 5% milk. After washing with 5% milk in TBS-T, the membranes were incubated with Horse-Radish Peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse antibodies overnight at 4°C, and with HRP conjugated anti-mouse antibody for 2h at room temperature, washed again in TBS-T, incubated with ECL reagent (Amersham cat#RPN2236and RPN2235) and imaged using a Chemidoc Imager (Biorad). Membrane blotted with anti-hACE2 were incubated with anti-HRP-conjugated GAPDH (Sigma, cat# G9295).

Materials

Antibodies used are the follows: anti-SARS-CoV-2 spike glycoprotein (272504, Abcam), rabbit anti-ZO1 (617300; Invitrogen), mouse anti-dsRNA (J2; Scicons), goat anti-ACE-2 (AF933, R&D systems), ActinGreen (R37110, Thermo Fisher Scientific), Hoescht (purchased from Sigma).

Spike Protein S1 Subunit Test

The recombinant human coronavirus SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 (ab273068, Abcam) was incubated on hBLECs at 10 nM during 2 or 24 hours. Then supernatants and RNA were collected, permeability assay was achieved according to precedent detailed method and transwell inserts were also fixed in 4% PFA after one rinse in phosphate-buffered saline (PBS).

Immunofluorescence Assay

For specific immunofluorescence assays, endothelial cells were plated on fibronectin-coated coverslips and Huh7 directly on coverslips. After recovering supernatants, coverslips or transwell filters were rinsed with PBS. Cells were fixed in 4% PFA during 15 min at room temperature (RT) and permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 5 min at RT. Then, they were blocked for 30 min to 1 hour in 2% bovine serum albumin (BSA), follow by incubation in primary and secondary antibodies before incubation with Hoescht (Sigma) and assembling in fluorescent mounting medium (Prolongold, Thermo Fisher). Cells were imaged by confocal microscopy with the Zeiss SP85 confocal microscope, using 40x or 63x 1.4 NA Plan Apochromat oil-immersion objectives.

RT-qPCR

Mock- and SARS-CoV-2- infected cells were lysed in RLT buffer (Qiagen), then, RNA were extracted with RNeasy Mini-Kit (Qiagen). From these, cDNA were synthesized using reverse transcription (Omniscript reverse transcriptase, Qiagen) and analyzed on a LightCycler 480 real-time PCR apparatus (Roche). Viral RNA from mock- and SARS-CoV-2-infected supernatants were extracted using the Qiamp viral RNA Mini Kit (Qiagen). GAPDH or HPRT1 gene was used to normalize samples.

Sequences of human primers used for amplification are the followings: for ACE-2: 5'-GGACCCAGGAAATGTTCAGA (fwd) and 5'-GGCTGCAGAAAGTGACATGA (rev); for CCL5: 5'-ACT GCCCCGTGCCACATCAA (fwd) and 5'-CTGGGTTGGC ACACACTTGGC (rev); for Claudin-5: 5'-TTAACAGACGGA ATGAAGTT (fwd) and 5'-AAGCGAAA TCCTCAGTCT (rev); for CXCL10: 5'-TATTCCTGCAAGCCA ATTTTGTC (fwd) and 5'-TCTTGATCGCCTTCGATTCTG (rev); for GAPDH: 5'-CATT GACCTCAACTACATGC (fwd) and 5'-GCCATGCCAGTGAG CTTCC (rev); for HPRT1: 5'-AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC (fwd) and 5'-TTTATAGTCAAGGGCATATCC (rev); for IFN-β: 5'-GTC TCCTCCAAATTGCTCTC (fwd) and 5'-ACAGGAGC TTCT GACACTGA (rev); for IL-6: 5'-CCAGGAGCCC AGCTAT GAAC (fwd) and 5'-CCCAGGGAGAAGGCAACTG (rev); for Occludin: 5'-TTCTGGATCTCTATATGGTTCA (fwd)

and 5'-CCACAACACAGTAGTGATAC (rev); for Z0-1: 5'-CCTGA ACCAGTATCTGATAA (fwd) and 5'-AATCTTCTCACTC CTTCTG (rev); for TMPRSS2: 5'-GAGGTGAAAGCGGGTG TGAG (fwd) and 5'-ATAGCTGGTGGTGACCCTGA (rev); for CTSL: 5'-CTGGTGGTTGGCTACGGATT (fwd) and 5'-CTCC GGTCTTTGGCCATCTT (rev).

COVID-19 Patient Plasma

Plasmas were collected thanks to the virology unit of the Lapeyronie hospital in Montpellier. They were given by different units for the COVID-19 patient plasma (n = 10) (**Supplementary Table 1**) and by the occupational healthcare for the negative controls (n = 10). Until use, samples were stored at -80°C, then aliquots were done on ice and were directly used for cytokine measurement by multiplex ELISA or for the BBB permeability assay.

Multiplex Assay

A multiplex bead-based assay for the quantification of 20 human inflammatory cytokines (ProcartaPlex Human Inflammation Panel 20plex, Thermo Fisher Scientific) was performed according to the manufacturer procedures and recorded using a Luminex apparatus (MAGPIX; Thermo Fisher Scientific). Plasma samples were used to analyze a cytokine panel representing innate immune response against viral infection. In healthy controls ($n = 10$) and in COVID-19 samples ($n = 10$), the cytokine concentrations detected were reported in pg/mL.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Plasma of COVID-19 and healthy patients were used to perform an ELISA assay for human ICAM (R&D systems). Analyze was done on a spectrophotometer by measurement of absorbance at 450 nm (Thermo Fischer Scientific).

Statistical Analysis

For all statistical analysis, a minimum of three independent experiments were done and unpaired Mann-Whitney tests were performed using Prism software.

Ethics Statement

All adult subjects provided written informed consent, and a parent or guardian of any child participant provided informed consent on the child's behalf, in compliance with the French legislation. For human BBB model the protocol was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH Number DC2011-1321).

RESULTS

SARS-CoV-2 Shows Moderate Replication in the BBB Cells With Low Associated-Inflammatory Response

To better understand the ability of SARS-CoV-2 to infect cells of the BBB, we performed infection of primary human cerebral endothelial cells (CECs), pericytes and astrocytes at a multiplicity of infection (MOI) of 1. No cytopathogenic effect (CPE) was observed after infection in these cells contrary to Vero E6 infected cells (**Figure 1A**). At 2 days post-infection (dpi), we observed no replication (determined by TCID50/ml assay) in astrocytes and low replication in pericytes and CECs. Viral replication in human pericytes and CECs appeared to be transient, as we could not detect viral titer at 6 dpi (**Figure 1B**). In the same conditions, we found a greater replication in Huh7 cells, a permanent cell line established from human hepatoma tissue previously described to be permissive to SARS-CoV-2 infection (~ 10^5 TCID50/mL at 2 dpi, data not shown) (46).

At 2 dpi, infected-CECs were fixed and, using an immunofluorescence approach, stained with a specific antibody against SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit (**Figure 1C**) and an anti-dsRNA antibody (**Figure 1D**). Notably, we showed the presence of dsRNA in CECs, consistent with active replication of SARS-CoV-2 (**Figure 1D**). We then performed RT-qPCR studies of infected-CECs and pericytes at 2 and 6 dpi and assayed the expression of inflammatory molecules and did not detect significant modulation in the expression of *IL-6*, *IFN-β*, *CCL5*, or *CXCL10* mRNAs compared to mock-infected cells (**Supplementary Figure 1**). Of note, we did not observe significant higher replication rates at higher MOI (MOI of 10, ~ 1.10^3 TCID50/ml at 2 dpi) but we detected a significant increase of *IL-6*, *IFN-β* and *CCL5* mRNA expression at 2 dpi in CECs (**Figure 1E**).

SARS-CoV-2 Poorly Replicates in a Human *In Vitro* BBB Model Without Permeability Alteration or Strong Associated-Inflammatory Response

As mentioned above, the BBB is a very important structure to control pathogen CNS access. To investigate whether SARS-CoV-2 is able to directly infect or cross the BBB, we used a human BBB model that recapitulates the main characteristics of the barrier (36, 39). This cellular model is composed of endothelial cells differentiated from $CD34^+$ cord blood-derived hematopoietic stem cells cultured on transwell filter inserts that further differentiate in brain-like endothelial cells (hBLECs) in the presence of brain pericytes (36) (**Figure 2A**). Similarly, that what happens *in vivo*, pericytes will induce and maintain BBB properties by secreting diffusible factors allowing the differentiation of the endothelial cells into BBB endothelial cells. To study viral replication and inflammatory pathways modulation, supernatants and mRNAs were collected at 2, 6 and 10 dpi from mock- or infected-hBLECs and pericytes (MOI 1). TCID50 measurements showed very low titers in hBLECs at 2 dpi (≥ $2{,}6.10^2$ TCID50/mL, corresponding to the production between 0 and 2 days) that decreased at 6 dpi (production between 2 and 6 days) and 10 dpi (production between 6 and 10 days) (**Figure 2B**). In the basolateral compartment, no significant replication was observed (**Figure 2B**). We also assessed whether pericytes from the BBB model were susceptible to the SARS-CoV-2 infection. Similarly to primary human pericyte culture, no CPE (**Supplementary Figure 2A**) and only weak and transient

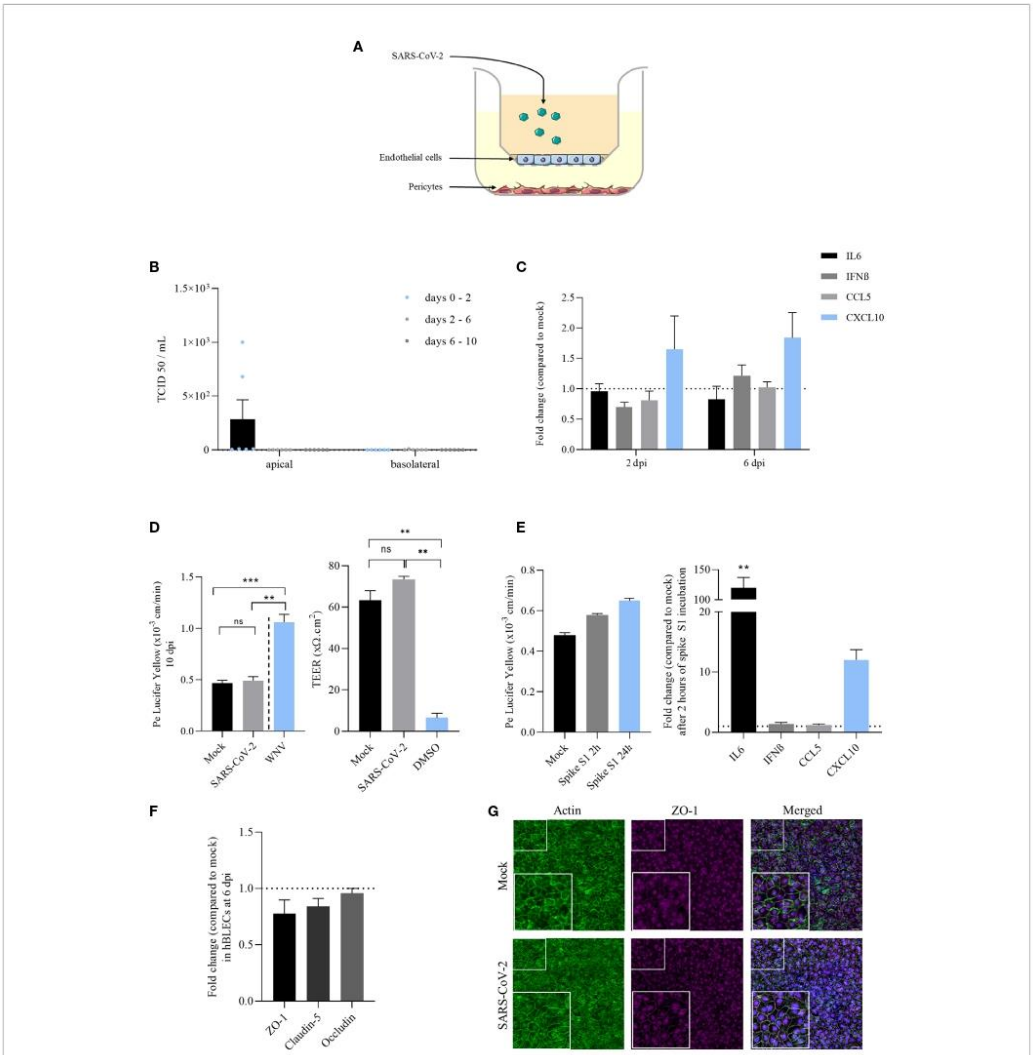


FIGURE 2 | Infection of a human *in vitro* BBB model by SARS-CoV-2 reveals weak replication, limited induction of inflammatory cytokines and did not perturb the specific brain endothelial structure. **(A)** The *in vitro* BBB model is composed of primary brain pericytes cultured at the bottom of plastic plates, allowing the differentiation of $CD34^+$ blood cord-derived endothelial cells into human brain-like endothelial cells (hBLECs) on transwell filters in the apical chamber. Virus is added in this compartment representing the blood side of the BBB. **(B)** Replication of SARS-CoV-2 in hBLECs in apical and basolateral compartments at 2, 6 and 10 dpi at MOI 1, titrated by TCID50 measurement on Vero cells. Results are expressed as mean ± SEM. **(C)** Inflammatory responses following SARS-CoV-2 infection of hBLECs at MOI 1 expressed in mRNA fold change compared to non-infected cells at 2 and 6 dpi. **(D)** Permeability coefficient of Lucifer Yellow 10 days after infection of hBLECs by SARS-CoV-2 or WNV at MOI 1. Bars show mean of 3 independent experiments ± SEM (n = 6; ns = non significant, $^{**}p < 0.01$ $^{***}p < 0.001$); Transendothelial electric resistance (TEER) measures done after 10 dpi on mock- and infected-hBLECs. Positive control of permeable BBB was used by adding 20% DMSO during one hour before measurement. Bars show mean of 3 independent experiments ± SEM (n = 6; $^{**}p < 0.01$). **(E)** Permeability coefficient of Lucifer Yellow following 2 or 24 hours after incubation of hBLECs with 10 nM of spike S1 subunit recombinant protein. Bars show mean of 3 independent experiments ± SEM; Inflammatory responses following spike S1 subunit recombinant protein incubation of hBLECs at 10 nM expressed in mRNA fold change compared to non-incubated cells 2 hours after (n = 6; $^{**}p < 0.01$). **(F)** Tight junction protein mRNA expression following SARS-CoV-2 infection of hBLECs at MOI 1 compared to mock at 6 dpi. **(G)** Immunofluorescence staining of ZO-1 and actin in hBLECs at 10 dpi. Scale bar = 50 µm.

replication were detected in infected cells (**Supplementary Figure 2B**). We next monitored inflammatory response factors in infected cells. At 2 and 6 dpi, mRNA expressions of *IL-6*, *IFN-β*, *CCL5* and *CXCL10* were measured and only *CXCL10* was slightly increased (but not significantly) in infected hBLECs (**Figure 2C**).

We then analyzed the effect of SARS-Cov-2 infection on BBB integrity using a fluorescent-based assay with Lucifer Yellow (LY) and by the measurement of the transendothelial electric resistance (TEER). We did not notice significant change of Pe (permeability coefficient, see *Material and Methods*) value at 10 dpi, as we detected a value of ~ $0.5x10^{-3}$ cm/min, for both mock and infected-BBB model, consistent with a "tight" BBB endothelium (36) (**Figure 2D**). In comparison, we performed an infection with West Nile virus (WNV, MOI 1) described for its ability to induce disruption of BBB integrity (47), where we obtained a Pe above $1x10^{-3}$ cm/min, thus reflecting a disturbed impaired endothelium (**Figure 2D**). Similarly, we did not measure significant change in TEER measures at 10 dpi for both mock- and infected-hBLECs, while the DMSO led to significant loss of TEER consistent with a strong disruption of the BBB endothelium (**Figure 2D**). Previous studies described the capacity of spike S1 subunit from SARS-CoV-2 envelope to cross the BBB and alter baseline permeability (23, 24). Therefore, we investigated the effect of this protein alone in our BBB model. After 2 and 24 hours of incubation with 10 nM of S1, Pe was slightly increased (from 0.48x10-3 cm/min in mock to 0.65x10-3 cm/min after 24 hours of spike incubation) possibly suggesting, in a non-infection context, an effect of high concentration of spike on the BBB integrity (**Figure 2E**). In addition, after 2 hours of incubation, *IL-6* and *CXCL10* mRNA expressions were strongly and significantly increased after spike S1 subunit treatment (**Figure 2E**).

To confirm the absence of effect of SARS-CoV-2 on BBB integrity using another approach, we performed an analysis of tight junction protein mRNA expression at 6 dpi in hBLECs. Normalized to *GAPDH* expression, *ZO-1*, *claudin-5* and *occludin* expressions in infected-cells were not significantly decreased in comparison to mock-infected hBLECs (**Figure 2F**). In parallel, cells were fixed and stained with specific antibodies against ZO-1 and labelled with an actin probe at 10 dpi to monitor endothelium integrity. We observed no difference in the tight junction organization and actin architecture of the endothelium between mock- and SARS-CoV-2- infected hBLECs (**Figure 2G**).

Finally, to better understand the low viral replication in BBB cells, we analyzed the expression of hACE-2, which SARS-CoV-2 uses as principal host cell receptor. Here, comparing to VeroE6 cells, we showed a very low expression of *ACE2* gene in CECs and hBLECs as previously described for other human endothelial cells (48) and no detection in primary human pericytes and astrocytes (**Figure 3A**). We also confirmed these observations by analyzing the protein expression level of hACE2 into CECs and pericytes. As showed in **Figure 3B**, while Vero E6 cells express ACE2, we were not able to detect efficiently this protein in CECs and pericytes by Western-Blot. Moreover, by pretreating CECs with a ACE2 blocking-antibody, we did not significantly reduce SARS-CoV-2 replication. Indeed, at to 2 dpi we monitored the replication of SARS-CoV-2 using a TCID50/mL assay, which did not show significant difference, suggesting that this receptor has no major role in BBB SARS-CoV-2 tropism (**Figure 3C**). Then we explored the expression of the co-receptors for SARS-CoV-2 TMPRSS2 (45, 49) and Cathepsin-L (CTSL) (50). We were able to detect expression of *TMPRSS2* (**Figure 3D**) and *CTSL* (**Figure 3E**) mRNA in our cell models that could participate in low viral entry.

Plasma of COVID-19 Patients Show Upregulated Pro-Inflammatory Cytokines Without Deleterious Effects on Human *In Vitro* BBB

Because SARS-CoV-2 infection did not have obvious effects on BBB homeostasis, we next assayed the effect of the inflammatory environment in COVID-19 patient plasma on brain endothelium using a cohort from the hospital university center of Montpellier. These plasma samples came from persons who developed severe COVID-19 pathology and who have been placed under oxygen therapy after their hospitalization following the occurrence of complications (see **Supplementary Table 1** and *Material and Methods*).

Inflammatory cytokines were analyzed in the serum by a multiplex assay for the simultaneous quantification of 20 human inflammatory cytokines (ProcartaPlex Human Inflammation Panel 20plex, Thermo Fisher Scientific). Among the 20 inflammatory cytokines measured in the plasma of patient suffering of COVID-19, 8 have shown increased concentration compared to healthy individuals (**Figure 4A**). The strongest upregulation was observed for CXCL10 with a mean of around 4 500 pg/mL in COVID-19 against around 5 pg/mL in healthy sample. We also observed the upregulation of IFN-γ, CCL2, IL-8, IL-12p70, IL-17a and TNF-α in COVID-19 patients compared to healthy controls (**Figure 4A**). Level of soluble ICAM-1, a cell adhesion molecule (CAMs) involved in leukocyte docking to the BBB, was also found statistically modulated in SARS-CoV-2 patients after a specific ELISA assay (**Figure 4A**).

The presence of high cytokine and chemokine concentrations could have a role in vascular endothelium leakage noticed in many case reports (33). We therefore investigated the effect of the inflammatory environment in these plasmas on the human BBB model by incubation of the COVID-19 patient or healthy control samples on hBLECs. The permeability was measured 48h post-incubation and no significant change in Pe was observed (with value ~ $0.5x10^{-3}$ cm/min, for all conditions tested) (**Figure 4B**). Together, these data indicate a strong inflammatory environment in the blood of SARS-CoV-2 infected patients without direct impairment of the BBB *in vitro* for 48 hours.

DISCUSSION

The molecular and cellular mechanisms of viral access and neuropathogenesis are of crucial interests to understand physiopathological effects of brain infections. Axonal transport in peripheral and central neurons has been suggested for SARS-CoV-2 (51) similarly than for other neurotropic viruses such as

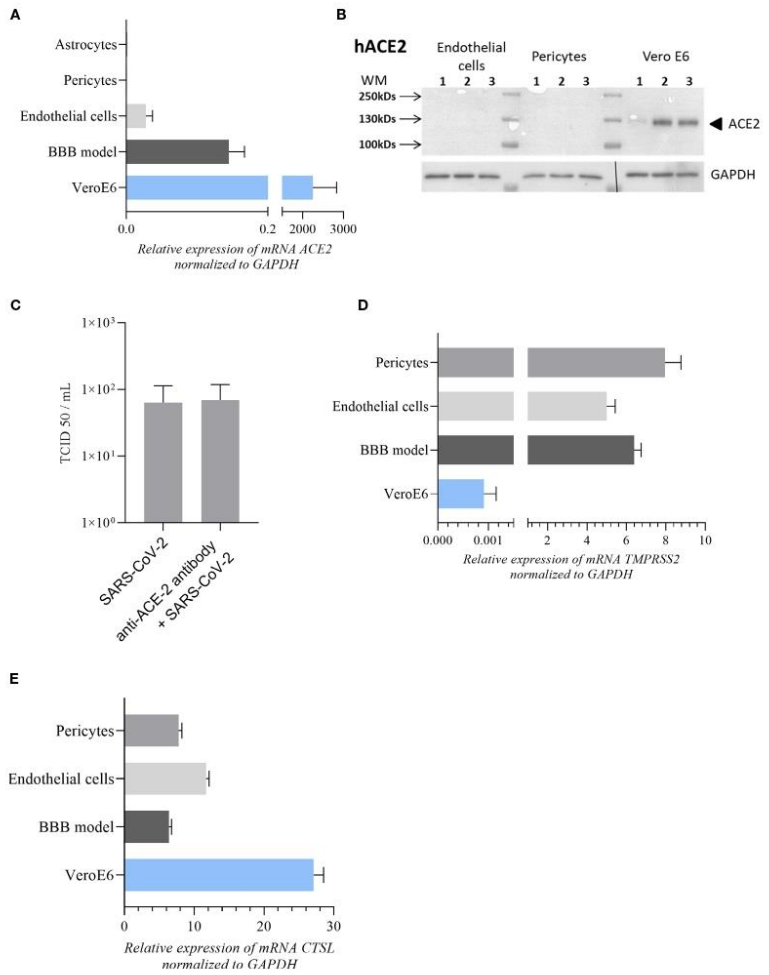


FIGURE 3 | Expression of main SARS-CoV-2 cell receptors in our cell models **(A)** *ACE-2* mRNA expression in astrocytes, pericytes, BBB model and endothelial cells in comparison to Vero E6 cells (highly permissive to SARS-CoV-2 infection). **(B)** No detectable expression of ACE-2 protein by western blot in endothelial and pericytes cells contrary to Vero E6 cells. **(C)** TCID50 measurements of SARS-CoV-2 in CECs at 2 dpi after treatment with anti-ACE-2 antibody. TCID50 measure results are expressed as mean ± SEM. **(D, E)** Respectively *TMPRSS2* and *CTSL* mRNA expression in BBB model, pericytes and endothelial cells in comparison to Vero E6 cells.

herpes simplex virus (HSV) and WNV (52, 53). Indeed, it has been shown that coronaviruses can infect peripheral neurons from the olfactory bulb that can be gateway for the CNS (54–57). Viruses can also use hematogenous routes for CNS access. Free or cell-associated viral particles in the blood stream can traffic across the BBB and the blood-CSF barrier to gain access to the CNS (32, 58). Direct endothelial cell infection can lead to parenchyma viral release and potential infection of other neuro-vascular cells such as pericytes or astrocytes. Cellular infection can in turn lead to the production of inflammatory mediators that can also modulate endothelium integrity allowing further viral entry. On the other hand, infected-immune cells from the blood can interact with and pass across the BBB to liberate viruses in the CNS, in a mechanism called "Trojan horse" (59).

SARS-CoV-2 infections induce various neurological symptoms and there is now clear evidence that neurological symptoms of

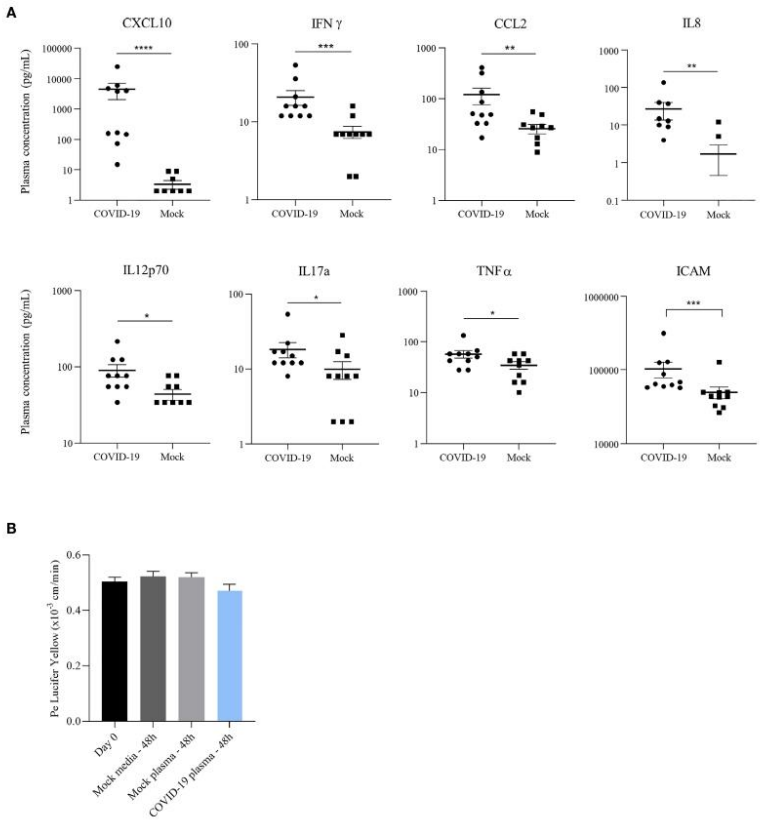


FIGURE 4 | COVID-19 patient plasma do not induce endothelium impairment or inflammatory response in a bi-cultured BBB model despite a pro-inflammatory environment. **(A)** Concentration (pg/mL) of different pro-inflammatory cytokines in plasma of COVID-19 patients hospitalized in Montpellier, France, and non-infected individuals quantified by a multiplex bead-based ELISA: in order, CXCL10, IFN-γ, CCL2, IL-8, IL-12p70, IL-17a and TNF-α; Analyses of soluble ICAM-1 concentration (pg/mL) in plasma from healthy and COVID-19 patients by ELISA assay. Bars show means ± SEM (n = 10; $^{*}p < 0.05$ $^{**}p < 0.01$ $^{***}p < 0.001$ $^{****}p < 0.0001$). **(B)** Permeability coefficient of Lucifer Yellow at day of infection (day 0) and following 48 hours after incubation of hBLECs with different COVID-19 plasmas, healthy control plasma or media. Bars show mean of 3 independent experiments ± SEM.

COVID-19 are common and in some cases severe (26). Moreover it was recently described that the virus can directly infect neurons and can be found in the brain or in the CSF of COVID-19 patients (15–18). In addition, numerous pathologies affecting neurovasculature have been reported in patients, such as thromboembolism or ischemic stroke, highlighting a potential role of the BBB in the neurological COVID-19 diseases (60, 61). Despite these observations, the mechanisms of SARS-CoV-2 access to the brain are poorly described. One potential SARS-CoV-2 CNS entry mechanism could be by direct endothelial cell infection and viral ability to replicate and to disturb BBB integrity. Viral protein spike was shown to induce perturbation of BBB integrity *in vitro* and to cross the BBB through transcytosis *in vivo* (23, 24). These studies using recombinant S1 protein could recapitulate the effect of viral shed or secreted spike during local replication or in the circulation, albeit very little information exist whether free spike exists in patients. However, the ability of free viral particles of SARS-CoV-2 to cross, disturb or infect the BBB still remains unclear and could differ depending on the system (murine *vs* human for instance). In this study, we showed that SARS-CoV-2 can poorly and transiently infect human brain endothelial cells and pericytes. This is in agreement with others studies that have also shown a very poor infection of endothelial cells notably in human pulmonary (HPAEC) and cardiac (HCAEC) endothelial cells (22, 48). This low infection level could be related to the very low expression of ACE-2, the main SARS-CoV-2 receptor, in endothelial cells. It is

difficult to conclude however whether the low replication levels of SARS-CoV-2 is due to low ACE-2 expression level on CECs and pericytes or the presence of alternate, less efficient, receptors or to a post-entry step that would restrict the viral cycle. Our ACE-2 blocking antibody assay did not reduce the low replication, which would favor the hypothesis that albeit very low ACE2 expression levels exists on BBB cells, SARS-CoV-2 may take advantage of other receptors or co-factors, even though only ACE-2 has been identified so far as a cellular receptor (62). Both TRMPSS2 and CTLS proteases are efficiently expressed in BBB cells, and could partially participate in viral entry, as described in several studies (45, 50, 62) but whether they can be involved independently of ACE-2 is not currently known.

However, despite the weak replication level at high MOI, we were able to detect some cytokine response following infection as observed by the expression of IL-6, IFN-β and CCL5 in brain endothelial cells. Our experiments using a human *in vitro* BBB model showed only a very limited replication of SARS-CoV-2 at 2 dpi only. Furthermore, viral replication did not affect the integrity of the endothelium. Similarly to studies where after intranasal infection of mouse models the virus was found in the brain but not in vascular endothelium (22), we demonstrated here that the direct BBB *in vitro* infection does not impact endothelial integrity or the expression of some tight junction proteins (mainly ZO-1). However, SARS-CoV-2 may alter other BBB aspects, for instance the activity of transporters such as efflux pumps that could impair CNS homeostasis. Another way that the virus could affect BBB homeostasis would be from systemic inflammation in response to viral infection that could favor SARS-CoV-2 entry into the CNS, leading to neuroinflammation (63). Indeed host innate responses leading to pro-inflammatory cytokine and chemokine production are thought to modulate BBB integrity and enable viruses to access the brain (64). We, as previous studies, have identified a high amount of inflammatory cytokines in the blood of patients suffering from COVID-19 (5, 65). Here, we did not observe an effect of patient plasma on BBB integrity after 48 hours of exposure. Nonetheless, the increased concentration of these cytokines could have effect on BBB during extended contact (66), especially knowing that this systemic inflammatory state can persist in patients. Inflammation can modulate at long term the BBB integrity and participate in immune cells recruitment which can initiate or amplify neuroinflammation (5, 67). Pro-inflammatory cytokine IL-6 exhibited an increased concentration in blood in COVID-19 patients and could participate in general inflammatory state observed in the disease (5). Of note, IL-6 is also known to modulate BBB integrity by interaction with endothelium structure. Indeed, high concentration of IL-6 in the plasma was correlated with higher BBB permeability and a decrease in tight junction expression mediated by protein kinase C pathway (68–70). Moreover, CCL5 and CXCL10 are chemokines frequently released upon viral infection. CXCL10 also leads to the decrease of tight junction protein expression (71) and can promotes BBB damage by inducing TNFα production (71). Interestingly, increased concentrations of the cell adhesion molecule ICAM-1 in the blood of SARS-CoV-2 infected patients could participate in leukocyte recruitment and exacerbate brain inflammation (72). Strictly, activated leukocytes express integrins, such as MAC-1 or lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) for instance, on endothelial cells, major receptors of which are CAMs as ICAM-1 (73). In this way, ICAM-1 can also have a role for "Trojan horse" invasion by facilitating the infiltration of SARS-CoV-2 infected immune cells (74).

As suggested by other studies, SARS-CoV-2 particles can enter the brain and directly induce neurological disorders (21, 67). However, among the proposed CNS mode of access, direct cerebral endothelial cell infection is unlikely to be the major mechanism responsible for SARS-CoV-2 brain infection. It clearly highlights complex mechanisms that could lead to SARS-CoV-2 neurological disease, with implication of several factors such as nerve infection, neurovasculature damages and inflammation. Indeed, the cytokine storm and systemic inflammation associated to COVID-19 remains a key mechanism in the apprehension of all pathologies related to SARS-CoV-2 infection and described during the pandemic.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

All adult subjects provided written informed consent, and a parent or guardian of any child participant provided informed consent on the child's behalf, in compliance with the French legislation. For human BBB model, the protocol was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH Number DC2011-1321). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

OC, SS, and YS contributed to conception and design of the study. OC, KB, CC-B, and PM performed the experiments. OC performed the statistical analysis. CC-B produced and titer SARS-CoV-2 stock on Vero E6 cells. DM edited part of the manuscript and raised fundings for SARS-CoV-2 research at Cemipai (CNRS Montpellier). OC wrote the first draft of the manuscript. OC, DM, FG, SS, and YS wrote sections of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was funded by Montpellier University of Excellence (MUSE) for Cemipai and UMR1058.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean-Marie Péloponèse and Sébastien Nisole from IRIM in Montpellier, virology department of CHU Lapeyronie and the Région Occitanie.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.697329/full#supplementary-material

REFERENCES

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A New Coronavirus Associated With Human Respiratory Disease in China. *Nature* (2020) 579 (7798):265–9. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3
2. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding. *Lancet* (2020) 395(10224):565–74. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
3. Li W, Moore MJ, Vasllieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Is a Functional Receptor for the SARS Coronavirus. *Nature* (2003) 426(6965):450–4. doi: 10.1038/nature02145
4. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical Features of Patients Infected With 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* (2020) 395(10223):497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
5. Kempuraj D, Selvakumar GP, Ahmed ME, Raikwar SP, Thangavel R, Khan A, et al. COVID-19, Mast Cells, Cytokine Storm, Psychological Stress, and Neuroinflammation. *Neuroscientist* (2020) 26(5–6):402–14. doi: 10.1177/1073858420941476
6. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and Immunological Features of Severe and Moderate Coronavirus Disease 2019. *J Clin Invest* (2020) 130(5):2620–9. doi: 10.1172/JCI137244
7. Natoli S, Oliveira V, Calabresi P, Maia LF, Pisani A. Does SARS-Cov-2 Invade the Brain? Translational Lessons From Animal Models. *Eur J Neurol* (2020) 27:1–10. doi: 10.1111/ene.14277
8. Zhao H, Shen D, Zhou H, Liu J, Chen S. Guillain-Barré Syndrome Associated With SARS-CoV-2 Infection: Causality or Coincidence? *Lancet Neurol* (2020) 19(5):383–4. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30109-5
9. Moriguchi T, Harii N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J, et al. A First Case of Meningitis/Encephalitis Associated With SARS-Coronavirus-2. *Int J Infect Dis* (2020) 94:55–8. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.062
10. Poyiadji N, Shahin G, Noujaim D, Stone M, Patel S, Griffith B. COVID-19-Associated Acute Hemorrhagic Necrotizing Encephalopathy: CT and MRI Features. *Radiology* (2020) 296:E119–20. doi: 10.1148/radiol.2020201187
11. Li H, Xue Q, Xu X. Involvement of the Nervous System in SARS-CoV-2 Infection. *Neurotox Res* (2020) 38:1–7. doi: 10.1007/s12640-020-00219-8
12. Almqvist J, Granberg T, Tzortzakakis A, Klironomos S, Kollia E, Öhberg C, et al. Neurological Manifestations of Coronavirus Infections – A Systematic Review. *Ann Clin Trans Neurol* (2020) 7:2057–71. doi: 10.1101/2020.08.26.20182196
13. Xu J, Zhong S, Liu J, Li L, Li Y, Wu X, et al. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in the Brain: Potential Role of the Chemokine Mig in Pathogenesis. *Clin Infect Dis* (2005) 41(8):1089–96. doi: 10.1086/444461
14. Kim JE, Heo JH, Kim HO, Song SH, Park SS, Park TH, et al. Neurological Complications During Treatment of Middle East Respiratory Syndrome. *J Clin Neurol* (2017) 13(3):227–33. doi: 10.3988/jcn.2017.13.3.227
15. Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, Sperhake JP, Wong MN, Allweiss L, et al. Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* (2020) 383(6):590–2. doi: 10.1056/NEJMc2011400
16. Solomon IH, Normandin E, Bhattacharyya S, Mukerji SS, Keller K, Ali AS, et al. Neuropathological Features of Covid-19. *N Engl J Med* (2020) 383 (10):989–92. doi: 10.1056/NEJMc2019373
17. Matschke J, Lütgehetmann M, Hagel C, Sperhake JP, Schröder AS, Edler C, et al. Neuropathology of Patients With COVID-19 in Germany: A Post-Mortem Case Series. *Lancet Neurol* (2020) 19(11):919–29. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30308-2
18. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro L, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, et al. Neuropilin-1 Facilitates SARS-CoV-2 Cell Entry and Provides a Possible Pathway Into the Central Nervous System. *Science* (2020) 370:856–60. doi: 10.1101/2020.06.07.137802
19. Ramani A, Müller L, Ostermann PN, Gabriel E, Abida-Islam P, Müller-Schiffmann A, et al. SARS-CoV-2 Targets Neurons of 3D Human Brain Organoids. *EMBO J* (2020) 39(20):1–14. doi: 10.15252/embj.2020106230
20. Jacob F, Pather SR, Huang WK, Zhang F, Wong SZH, Zhou H, et al. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells and Brain Organoids Reveal SARS-CoV-2 Neurotropism Predominates in Choroid Plexus Epithelium. *Cell Stem Cell* (2020) 27(6):937–50.e9. doi: 10.1016/j.stem.2020.09.016
21. Bullen CK, Hogberg HT, Bahadirli-Talbott A, Bishai WR, Hartung T, Keuthan C, et al. Infectability of Human BrainSphere Neurons Suggests Neurotropism of SARS-CoV-2. *ALTEX* (2020) 37(4):665–71. doi: 10.14573/altex.2006111
22. Song E, Zhang C, Israelow B, Lu-Culligan A, Prado AV, Skriabine S, et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in Human and Mouse Brain. *J Exp Med* (2021) 218(3):1–18. doi: 10.1084/jem.20202135
23. Rhea EM, Logsdon AF, Hansen KM, Williams LM, Reed MJ, Baumann KK, et al. The S1 Protein of SARS-CoV-2 Crosses the Blood–Brain Barrier in Mice. *Nat Neurosci* (2020) 24:368–78. doi: 10.1038/s41593-020-00771-8
24. Buzhdygan TP, DeOre BJ, Baldwin-Leclair A, Bullock TA, McGary HM, Khan JA, et al. The SARS-CoV-2 Spike Protein Alters Barrier Function in 2D Static and 3D Microfluidic In-Vitro Models of the Human Blood–Brain Barrier. *Neurobiol Dis* (2020) 146:105131. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105131
25. Sharifi-Razavi A, Karimi N, Rouhani N. COVID 19 and Intra Cerebral Hemorrhage: Causative or Coincidental. *New Microbes New Infect* (2020) 35:100669. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100669
26. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol* (2020) 77(6):683–90. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1127
27. Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, Chuich T, Dreyfus I, Driggin E, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* (2020) 75:2950–73. doi: 10.1016/j.jacc.2020.04.031
28. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D, Kant KM, et al. Confirmation of the High Cumulative Incidence of Thrombotic Complications in Critically Ill ICU Patients With COVID-19: An Updated Analysis. *Thromb Res* (2020) 191:148–50. doi: 10.1016/j.thromres.2020.04.041
29. Labò N, Ohnuki H, Tosato G. Vasculopathy and Coagulopathy Associated With SARS-CoV-2 Infection. *Cells* (2020) 9(7):1–30. doi: 10.3390/cells9071583
30. Goshua G, Pine AB, Meizlish ML, Chang CH, Zhang H, Bahel P, et al. Endotheliopathy in COVID-19-Associated Coagulopathy: Evidence From a Single-Centre, Cross-Sectional Study. *Lancet Haematol* (2020) 7(8):e575–82. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30216-7
31. Alquisiras-Burgos I, Peralta-Arrieta I, Alonso-Palomares LA, Zacapala-Gómez AE, Salmerón-Bárcenas EG, Aguilera P. Neurological Complications Associated With the Blood-Brain Barrier Damage Induced by the Inflammatory Response During SARS-CoV-2 Infection. *Mol Neurobiol* (2021) 58(2):520–35. doi: 10.1007/s12035-020-02134-7
32. Mustafá YM, Meuren LM, Coelho SVA, De Arruda LB. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. *Front Microbiol* (2019) 10:525. doi: 10.3389/fmicb.2019.00525
33. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: The Vasculature Unleashed. *Nat Rev Immunol* (2020) 20(7):389–91. doi: 10.1038/s41577-020-0343-0
34. Salinas S, Schiavo G, Kremer EJ. A Hitchhiker's Guide to the Nervous System: The Complex Journey of Viruses and Toxins. *Nat Rev Microbiol* (2010) 8 (9):645–55. doi: 10.1038/nrmicro2395
35. Miner JJ, Diamond MS. Mechanisms of Restriction of Viral Neuroinvasion at the Blood-Brain Barrier. *Curr Opin Immunol* (2016) 38:18–23. doi: 10.1016/j.coi.2015.10.008

36. Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, et al. A Stable and Reproducible Human Blood-Brain Barrier Model Derived From Hematopoietic Stem Cells. *PloS One* (2014) 9(6):e99733. doi: 10.1371/journal.pone.0099733
37. Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, et al. *In Vitro* Discrimination of the Role of LRP1 at the BBB Cellular Level: Focus on Brain Capillary Endothelial Cells and Brain Pericytes. *Brain Res* (2015) 1594:15–26. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.047
38. Lyck R, Lécuyer MA, Abadier M, Wyss CB, Matti C, Rosito M, et al. ALCAM (CD166) Is Involved in Extravasation of Monocytes Rather Than T Cells Across the Blood–Brain Barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* (2017) 37(8):2894–909. doi: 10.1177/0271678X16678639
39. Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, et al. PECAM-1 Stabilizes Blood-Brain Barrier Integrity and Favors Paracellular T-Cell Diapedesis Across the Blood-Brain Barrier During Neuroinflammation. *Front Immunol* (2019) 10:711. doi: 10.3389/fimmu.2019.00711
40. Clé M, Constant O, Barthelemy J, Desmetz C, Martin MF, Lapeyre L, et al. Differential Neurovirulence of Usutu Virus Lineages in Mice and Neuronal Cells. *J Neuroinflamm* (2021) 18(1):1–22. doi: 10.1186/s12974-020-02060-4
41. Clé M, Desmetz C, Barthelemy J, Martin MF, Constant O, Maarifi G, et al. Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier. *MBio* (2020) 11(4):1–25. doi: 10.1128/mBio.01183-20
42. Clé M, Barthelemy J, Desmetz C, Foulongne V, Lapeyre L, Bolloré K, et al. Study of Usutu Virus Neuropathogenicity in Mice and Human Cellular Models. *PloS Negl Trop Dis* (2020) 14(4):e0008223. Mossel E, editor. doi: 10.1371/journal.pntd.0008223
43. Kärber G. Beitrag Zur Kollektiven Behandlung Pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol* (1931) 162(4):480–3. doi: 10.1007/BF01863914
44. Heymans M, Figueiredo R, Dehouck L, Francisco D, Sano Y, Shimizu F, et al. Contribution of Brain Pericytes in Blood-Brain Barrier Formation and Maintenance: A Transcriptomic Study of Cocultured Human Endothelial Cells Derived From Hematopoietic Stem Cells. *Fluids Barriers CNS* (2020) 17(1):1–28. doi: 10.1186/s12987-020-00208-1
45. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* (2020) 181(2):271–80.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052
46. Sanclemente-Alaman I, Moreno-Jiménez L, Benito-Martín MS, Canales-Aguirre A, Matías-Guiu JA, Matías-Guiu J, et al. Experimental Models for the Study of Central Nervous System Infection by SARS-CoV-2. *Front Immunol* (2020) 11:2163. doi: 10.3389/fimmu.2020.02163
47. Roe K, Kumar M, Lum S, Orillo B, Nerurkar VR, Verma S. West Nile Virus-Induced Disruption of the Blood-Brain Barrier in Mice Is Characterized by the Degradation of the Junctional Complex Proteins and Increase in Multiple Matrix Metalloproteinases. *J Gen Virol* (2012) 93(6):1193–203. doi: 10.1099/vir.0.040899-0
48. McCracken IR, Saginc G, He L, Huseynov A, Daniels A, Fletcher S, et al. Lack of Evidence of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Expression and Replicative Infection by SARS-CoV-2 in Human Endothelial Cells. *Circulation* (2021) 143(8):865–8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052824
49. Bilinska K, Jakubowska P VON, Bartheld CS, Butowt R. Expression of the SARS-CoV-2 Entry Proteins, ACE2 and TMPRSS2, in Cells of the Olfactory Epithelium: Identification of Cell Types and Trends With Age. *ACS Chem Neurosci* (2020) 11:1555–62. doi: 10.1021/acschemneuro.0c00210
50. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 Entry Factors Are Highly Expressed in Nasal Epithelial Cells Together With Innate Immune Genes. *Nat Med* (2020) 26(5):681–7. doi: 10.1038/s41591-020-0868-6
51. Reza-Zaldivar EE, Hernández-Sapiéns MA, Minjarez B, Gómez-Pinedo U, Márquez-Aguirre AL, Mateos-Díaz JC, et al. Infection Mechanism of SARS-COV-2 and Its Implication on the Nervous System. *Front Immunol* (2021) 11:1–7. doi: 10.3389/fimmu.2020.621735
52. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus Infection: A Balance Between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion. *J Virol* (2006) 80(19):9349–60. doi: 10.1128/JVI.01122-06
53. Esiri MM. Herpes Simplex Encephalitis. An Immunohistological Study of the Distribution of Viral Antigen Within the Brain. *J Neurol Sci* (1982) 54(2):209–26. doi: 10.1016/0022-510X(82)90183-6
54. Desforges M, Le Coupanec A, Stodola JK, Meessen-Pinard M, Talbot PJ. Human Coronaviruses: Viral and Cellular Factors Involved in Neuroinvasiveness and Neuropathogenesis. *Virus Res Elsevier* (2014) 12(14):145–58. doi: 10.1016/j.virusres.2014.09.011
55. Dubé M, Le Coupanec A, Wong AHM, Rini JM, Desforges M, Talbot PJ. Axonal Transport Enables Neuron-To-Neuron Propagation of Human Coronavirus Oc43. *J Virol* (2018) 92(17):1–21. doi: 10.1128/JVI.00404-18
56. Baig AM, Khaleeq A, Ali U, Syeda H. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS Chem Neurosci* (2020) 11:995–8. doi: 10.1021/acschemneuro.0c00122
57. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, Franz J, Thomas C, Mothes R, et al. Olfactory Transmucosal SARS-CoV-2 Invasion as a Port of Central Nervous System Entry in Individuals With COVID-19. *Nat Neurosci* (2020) 24:168–75. doi: 10.1101/2020.06.04.135012
58. Al-Obaidi MMJ, Bahadoran A, Wang SM, Manikam R, Raju CS, Sekaran SD. Disruption of the Blood Brain Barrier Is Vital Property of Neurotropic Viral Infection of the Central Nervous System. *Acta Virol* (2018) 62(1):16–27. doi: 10.4149/av_2018_102
59. Yewdell JW, Brooke CB. Monocytes, Viruses and Metaphors: Hanging the Trojan Horse. *Cell Cycle* (2012) 11(9):1748–9. doi: 10.4161/cc.20311
60. MacLean MA, Kamintsky L, Leck ED, Friedman A. The Potential Role of Microvascular Pathology in the Neurological Manifestations of Coronavirus Infection. *Fluids Barriers CNS* (2020) 17(1):55. doi: 10.1186/s12987-020-00216-1
61. Erickson MA, Rhea EM, Knopp RC, Banks WA. Interactions of SARS-CoV-2 With the Blood–Brain Barrier. *Int J Mol Sci* (2021) 22(5):2681. doi: 10.3390/ijms22052681
62. Evans JP, Liu S-L. Role of Host Factors in SARS-CoV-2 Entry. *J Biol Chem* (2021) 297:100847. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100847
63. Murta V, Villarreal A, Ramos AJ. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Impact on the Central Nervous System: Are Astrocytes and Microglia Main Players or Merely Bystanders? *ASN Neuro* (2020) 12(1121):175909142095496. doi: 10.1177/1759091420954960
64. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-Like Receptor 3 Mediates West Nile Virus Entry Into the Brain Causing Lethal Encephalitis. *Nat Med* (2004) 10(12):1366–73. doi: 10.1038/nm1140
65. Libby P, Lüscher T. COVID-19 Is, in the End, an Endothelial Disease. *Eur Heart J* (2020) 41(32):3038–44. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa623
66. Varatharaj A, Galea I. The Blood-Brain Barrier in Systemic Inflammation. *Brain Behav Immun* (2017) 60:1–12. doi: 10.1016/j.bbi.2016.03.010
67. Iadecola C, Anrather J, Kamel H. Effects of COVID-19 on the Nervous System. *Cell* (2020) 183(1):16–27.e1. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.028
68. De Vries HE, Blom-Roosemalen MCM, Van Oosten M, De Boer AG, Van Berkel TJC, Breimer DD, et al. The Influence of Cytokines on the Integrity of the Blood-Brain Barrier *In Vitro*. *J Neuroimmunol* (1996) 64(1):37–43. doi: 10.1016/0165-5728(95)00148-4
69. Desai TR, Leeper NJ, Hynes KL, Gewertz BL. Interleukin-6 Causes Endothelial Barrier Dysfunction via the Protein Kinase C Pathway. *J Surg Res* (2002) 104(2):118–23. doi: 10.1006/jsre.2002.6415
70. Cohen SS, Min M, Cummings EE, Chen X, Sadowska GB, Sharma S, et al. Effects of Interleukin-6 on the Expression of Tight Junction Proteins in Isolated Cerebral Microvessels From Yearling and Adult Sheep. *Neuroimmunomodulation* (2013) 20(5):264–73. doi: 10.1159/000350470
71. Wang K, Wang H, Lou W, Ma L, Li Y, Zhang N, et al. IP-10 Promotes Blood-Brain Barrier Damage by Inducing Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Japanese Encephalitis. *Front Immunol* (2018) 9:1148. doi: 10.3389/fimmu.2018.01148
72. Frommhold D, Kamphues A, Hepper I, Pruenster M, Lukić IK, Socher I, et al. RAGE and ICAM-1 Cooperate in Mediating Leukocyte Recruitment During Acute Inflammation In Vivo. *Blood* (2010) 116(5):841–9. doi: 10.1182/blood-2009-09-244293
73. Ransohoff RM, Takeshita Y. Inflammatory Cell Trafficking Across the Blood–Brain Barrier: Chemokine Regulation and *In Vitro* Models. *Immunol Rev* (2012) 248:228–39. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01127.x

74. Dai J, Wang P, Bai F, Town T, Fikrig E. ICAM-1 Participates in the Entry of West Nile Virus Into the Central Nervous System. *J Virol* (2008) 82(8):4164–8. doi: 10.1128/JVI.02621-07

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Constant, Barthelemy, Bolloré, Tuaillon, Gosselet, Chable-Bessia, Merida, Muriaux, Van de Perre, Salinas and Simonin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1.2 Neurotropisme de différentes lignées USUV

Même si peu d'infections humaines par USUV ont été détectés en Europe, des cas sévères avec neuroinvasion ont néanmoins été identifiés. Ce *Flavivirus*, proche de WNV et JEV, semble donc avoir un tropisme neuronal important mais qui est encore peu caractérisé. De plus, lorsque l'on s'intéresse à la circulation de ce virus en Europe, on peut constater la co-circulation active de plusieurs de ces lignées mais toutes n'ont pas été rapportées comme étant associées au développement d'atteintes neuronales. Afin de pouvoir améliorer les connaissances sur le neurotropisme de ce virus, de pouvoir appréhender les différences en termes de sévérité et de prévenir les potentiels épidémies qui pourraient avoir des conséquences sur la santé publique, une étude de comparaison du neurotropisme de différentes lignées d'USUV a été initiée par notre équipe.

Ainsi, nous avons travaillé sur l'identification des effets de différentes lignées circulantes en Europe sur un modèle murin susceptible à l'infection. Puis nous avons étudié les conséquences de l'infection sur divers modèles *in vitro* neuronaux (astrocytes, péricytes et cellules endothéliales humains ; microglie et neurones murins ; modèle de BHE humain) en terme de permissivité des cellules, réplication du virus, réponse antivirale, et effets sur l'intégrité de la BHE.

Les résultats de cette étude montrent que malgré une différence de virulence, toutes les lignées testées sont neurotropes dans nos différents modèles. Elles sont capables d'induire des effets neuronaux délétères chez la souris et d'infecter les modèles cellulaires étudiés. De plus, il ressort de ces travaux que la lignée Europe 2 est la plus virulente, à la fois *in vivo* et *in vitro*, ce qui est cohérent avec le fait que la plupart des cas d'infections humains développant des symptômes neuronaux ont été associés à cette lignée. Enfin, nous avons pu mettre en évidence une mutation dans le domaine de la polymérase d'ARN dépendante de l'ARN au niveau de la protéine NS5 pour la lignée Europe 2, pouvant contribuer à sa capacité réplicative plus importante.

Ainsi, ces travaux apportent de nouvelles connaissances et données sur le neurotropisme du virus USUV et ont permis de révéler le plus fort caractère virulent de la lignée Europe 2.

Clé et al. Journal of Neuroinflammation (2021) 18:11
https://doi.org/10.1186/s12974-020-02060-4

Journal of Neuroinflammation

RESEARCH Open Access

Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells

Marion Clé[1†], Orianne Constant[1†], Jonathan Barthelemy[1], Caroline Desmetz[2], Marie France Martin[3], Lina Lapeyre[3], Daniel Cadar[4], Giovanni Savini[5], Liana Teodori[5], Federica Monaco[5], Jonas Schmidt-Chanasit[4,6], Juan-Carlos Saiz[7], Gaëlle Gonzales[8], Sylvie Lecollinet[8], Cécile Beck[8], Fabien Gosselet[9], Philippe Van de Perre[1,10], Vincent Foulongne[1,10], Sara Salinas[1] and Yannick Simonin[1*]

Abstract

Background: Usutu virus (USUV) is an emerging neurotropic arthropod-borne virus recently involved in massive die offs of wild birds predominantly reported in Europe. Although primarily asymptomatic or presenting mild clinical signs, humans infected by USUV can develop neuroinvasive pathologies (including encephalitis and meningoencephalitis). Similar to other flaviviruses, such as West Nile virus, USUV is capable of reaching the central nervous system. However, the neuropathogenesis of USUV is still poorly understood, and the virulence of the specific USUV lineages is currently unknown. One of the major complexities of the study of USUV pathogenesis is the presence of a great diversity of lineages circulating at the same time and in the same location.

Methods: The aim of this work was to determine the neurovirulence of isolates from the six main lineages circulating in Europe using mouse model and several neuronal cell lines (neurons, microglia, pericytes, brain endothelial cells, astrocytes, and in vitro Blood-Brain Barrier model).

Results: Our results indicate that all strains are neurotropic but have different virulence profiles. The Europe 2 strain, previously described as being involved in several clinical cases, induced the shortest survival time and highest mortality in vivo and appeared to be more virulent and persistent in microglial, astrocytes, and brain endothelial cells, while also inducing an atypical cytopathic effect. Moreover, an amino acid substitution (D3425E) was specifically identified in the RNA-dependent RNA polymerase domain of the NS5 protein of this lineage.

Conclusions: Altogether, these data show a broad neurotropism for USUV in the central nervous system with lineage-dependent virulence. Our results will help to better understand the biological and epidemiological diversity of USUV infection.

Keywords: Usutu virus, Arbovirus, Flavivirus, Neurotropism, Central nervous system

Background

Usutu virus (USUV) is an arbovirus of the genus *Flavivirus* from the *Flaviviridae* family. It belongs to the Japanese encephalitis virus (JEV) antigenic complex isolated for the first time in 1959 from *Culex neavei* (trapped in Swaziland) after intracerebral inoculation of newborn mice in Southern Africa [1–4]. Over recent years, this emerging virus has dispersed out of Africa mainly into Europe [5]. It was presumably carried by migratory birds and their associated mosquitoes, such as *Culex pipiens* [6–9]. Similar to other flaviviruses, USUV is an icosahedral-enveloped virus with a single-stranded positive sense RNA of 11 kb, with a 5′ cap structure and one

* Correspondence: yannick.simonin@umontpellier.fr
†Marion Clé and Orianne Constant contributed equally to this work.
[1]Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Université de Montpellier, INSERM, EFS, Montpellier, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2021, corrected publication 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

open reading frame (ORF) encoding a polyprotein of 3434 amino acids. The USUV polyprotein is post-translationally processed by cellular and viral proteases into three structural proteins: capsid (C), pre-membrane/membrane (prM/M), and envelope (E), and seven nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) [10]. Its natural life cycle mainly involves birds (like *Strigiformes* or *Passeriformes*) and mosquitoes (mainly *Culex*) [11].

USUV infection of birds is frequently characterized by encephalitis, myocardial degeneration, and necrosis of the brain, liver, and spleen [6, 12]. Humans and others mammals, such as horses, rodents, dogs, and wild boars, are considered accidental hosts [13–17]. The first two cases of USUV infection in humans were described in Africa, precisely in Central African Republic (1981) and Burkina Faso (2004), with mild symptoms such as fever and rash [18]. In Europe, USUV infection was reported for the first time in 2009 in two patients in Italy [19–21]. Since then, several studies have reported human infections in Italy associated with neurological damages [22–27]. In 2013 and 2018, six patients with neuroinvasive symptoms (meningitis and meningoencephalitis) were diagnosed in Croatia, and a patient with aseptic meningitis in Hungary [28–30]. In 2016, USUV infection was reported in France in a patient with idiopathic facial paralysis [31]. In addition, USUV was detected in asymptomatic human blood donors in Austria, Germany, and the Netherlands [32–36]. To date, 100 cases of acute human infection have been described, mainly in Europe including patients with neurological symptoms (Table 1). Major USUV epizootics affecting avifauna, associated with a large epidemic of West Nile virus (WNV), were demonstrated in Europe in 2016 and in 2018 [37].

Isolates of USUV are currently classified into eight different genetic lineages which are divided in two major African or European groups: Africa (AF) 1, 2, and 3 and Europe (EU) 1, 2, 3, 4, and 5 [38, 39]. Although the great USUV evolutionary diversity in Europe appears to have emerged in the last decade, phylogeny analyses suggest relatively long-term circulation of USUV in Europe. As shown in Table 1, human cases of USUV infection are

Table 1 Description of human cases of USUV infection worldwide

Country	Year	Number	Sample	Clinical signs	Studied population	Identified strains	Ref
CAR	1981	1	Blood	Eruptive fever	Clinical case	Africa 3	[18]
Burkina Faso	2004	1	Blood	Fever and jaundice	Clinical case	?	[18]
Italy	2009	1	CSF	Meningoencephalitis	Clinical case	Europe 1	[19]
	2009	1	Blood	Encephalitis	Clinical case	Europe 2	[20, 21]
	2008–2009	3/44	CSF	Meningoencephalitis	Meningoencephalitis patients	?	[22]
	2008–2011	8/306 + 2/609	CSF / Blood	Meningoencephalitis / Healthy	Meningoencephalitis patients (CSF). various healthy and sick subjects (serum)	?	[23]
	2018	1/44	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 1	[24]
	2016–2018	25/73964	Blood	Healthy	Blood donors	?	[25]
	2017–2018	9	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 2. Europe 3 and Europe 4	[26]
	2017–2018	8/1967	Blood / Urine	Neuroinvasive diseases / Fever / Arthralgia / Myalgia	Patients with suspected arboviral infection	Europe 2	[27]
Croatia	2013	3/95	Blood	Meningoencephalitis	Meningoencephalitis patients	?	[29]
	2018	3/178	Blood / Urine	Neuroinvasive diseases	Neuroinvasive cohort	Europe 2	[30]
Germany	2016	1	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 3	[34]
Netherlands	2018	7/12040	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 3	[36]
France	2016	1/166	CSF	Idiopathic facial paralysis	Patients with infection and/or neurological signs	Africa 2	[31]
Austria	2017	6/12047	Blood	Healthy	Blood donors	Europe 2	[32]
	2018	18/31598	Blood	Healthy / Rash	Blood donors	Europe 2 and Africa 3	[33]
Hungary	2018	1	Blood	Aseptic meningitis	Clinical case	Europe 2	[28]

This table summarizes acute human cases of USUV infection described in the literature and the viral strains involved
CAR Central African Republic

associated with different lineages. However, it is interesting to note that the majority of patients developing neurological symptoms are related to the EU2 strain, which is actively circulating in several European countries including Italy. It has been reported in the literature that among 24 patients presenting neurological symptoms, 13 cases were infected with EU2 [20, 27, 28, 30], one with AF2 [31], and one with EU1 [19], while for the other cases the strains involved were not characterized. USUV isolates have also been identified in asymptomatic infected patients or infected patients with mild clinical signs, such as AF3 [18, 33], EU1 [24], EU2 [26, 32, 33], EU3 [26, 34, 36], and EU4 [26]. Complete genome sequencing and phylogenetic analyses of African and European lineages have shown genetic diversity among all USUV strains analyzed [40]. The pathogenicity of USUV strains currently circulating in Europe still remains to be investigated in order to understand the epidemiology and evolution of USUV. It has been well described that the neuroinvasive potential of many flaviviruses is strain-dependent [41, 42]. This is the case for WNV which shares a lot of similarities with USUV [43]. However, little is known with respect to the neurovirulence of USUV lineages, and it could be hypothesized that the lineages currently circulating in Europe differ according to their virulence profiles.

The aim of this present study was to characterize the viral neurotropism and neuropathogenicity of six USUV strains (EU1, EU2, EU3, EU5, AF2, and AF3 lineages) currently circulating in Europe, using a suckling immunocompetent mouse model and both murine and human brain cells. Despite the fact that all USUV strains were neurotropic and lethal in vivo, we observed different rates of replication, cytokine induction, and mortality between the different lineages. The EU2 isolate was the most virulent, with 100% mortality in vivo and induction of symptoms comparable to epileptic seizures. These symptoms were not observed among the other strains. In vitro, we found that all isolates infected cerebral cells types, such as murine neurons and microglia, human pericytes, brain endothelial cells, and astrocytes. However, in vitro infection showed that USUV isolates gave rise to different growth dynamics. Interestingly, the EU2 lineage exhibited the highest cell infection level, with both higher and more persistent replication rates, while also inducing an atypical cytopathic effect (CPE) characterized by dark cell clusters that detached from the cell mat.

Materials and methods

USUV strains and cellular infection

Europe 1 strain (Vienna 2001-blackbird) was from INIA Madrid (Spain); Europe 2 (TE20421/Italy/2017 and TE18982/Italy/2017) was provided from Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Emilia Romagna (Italy); Europe 3 (USUV-HautRhin7315/France/2015), Africa 2 (Rhône 2705/France/2015), and Africa 3 (USUV-Haute-Vienne4997/France/2018) strains were from ANSES (National Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety, France); and the Europe 5 (BNI-507/2016/Germany) strain was coming from Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg (Germany) (Table 2). The virus lineages were amplified no more than four times on Vero cells (ATCC CCL-81). Viral stocks were prepared by infecting 80% confluent Vero cells, and cellular supernatants were collected 5 to 7 days after infection. Viral titers were determined by TCID50/ml, which were calculated using the Spearman-Kärber method [44]. For infections, cells at sub confluence were rinsed once with PBS, and USUV was added in a small volume of medium for 2 h at 37 °C with constant agitation prior to removing the inoculum.

Mouse experiments

Six-day-old neonatal Swiss mice (Janvier Laboratories, Saint-Berthevin Cedex, France) were inoculated intraperitoneally with 10^3 TCID50/mice of USUV (n = 10 to 12 mice per group). Cervical dislocation was used to euthanize mice at the end of the experiment or if mice presented general deterioration in their condition. Tissues were snap frozen in liquid nitrogen for the determination of the viral burden or fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and cut using a microtome (3-µm sections) at the RHEM facilities (Montpellier) for histological analysis.

Histology and immunostaining

Briefly, samples were collected and fixed for 24 h in neutral buffered formalin 10% and embedded in paraffin. Tissues were cut into 3-µm-thick sections, mounted on slides, then dried at 37 °C overnight, and stained as previously described [45]. The slides were incubated at 37 °C for 60 min with a rat anti-CD45 antibody (14-0451, Bioscience) or a rabbit anti-Cleaved caspase 3 antibody (9671, Cell signaling). For viral antigen immunostaining, the slides were incubated at 37 °C for 32 min with a mouse anti-flavivirus group antigen monoclonal antibody (Millipore, MAB10216). A scanner (Hamamatsu NanoZoomer 2.0-HT) was used to analyze the slides. Staining cells were quantified with the QuPath bioimage analysis software.

Viral quantification for in vivo experiments

Organs were crushed with zirconia beads (Fastprep apparatus, MP Biomedicals) in 500 µL PBS before RNA extraction (RNA RNeasy Mini-Kit, Qiagen). Urine and blood RNA were extracted with the EZ1 DSP virus kit (Qiagen), and viral RNA levels were quantified by a one-

Table 2 Country, year of isolation, host source, and passage history of the USUV strains used in the study

Lineage	Strains Name	Country of isolation	Year of islolation	Isolation source	Number of passages	Ref/accession number
Europe 1	Vienna-2001-blackbird	Austria	2001	Avian	4	AY453411.1
Europe 2	TE20421/Italy/2017	Italy	2017	Avian	3	TE20421
Europe 3	USUV-HautRhin7315	France	2015	Avian	4	KX601690
Europe 5	BNI507/2016/Germany	Germany	2016	Avian	3	KY113091
Africa 2	Rhône 2705	France	2015	Avian	3	KX601692
Africa 3	USUV-HauteVienne4977	France	2018	Avian	4	AF4997 (MT863562)

step quantitative reverse transcriptase PCR assay (RT-qPCR) (Light Cycler 480, Roche) as previously described [46]. Viral load was reported as TCID50 equivalents per gram using a standard curve produced using serial 10-fold dilutions of USUV with known viral titers.

Cells

Vero cells (ATCC CCL-81) and immortalized murine microglial cell line BV-2 (generated by Dr. Elisabetta Blasi [47]) were cultured in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). C6/36 cells (ATCC CRL-1660) were grown in RPMI medium with 10% of FBS. Human pericytes and astrocytes cells (catalog #1200 and #1830, ScienCell™) were cultured on poly-L-lysine–coated plates. Human endothelial cells were purchased from ScienCell™ and cultured on fibronectin-coated plates. Mouse hippocampal neurons (E18) were obtained and plated using standard procedures as previously described [44].

Immunofluorescence assays

Cells were fixed with 4% PFA and permeabilized for 5 min at room temperature with 0.1% Triton X-100. After a blocking step for 30 min to 1 h at RT with 2% bovine serum albumin (BSA), an incubation step with primary and secondary antibodies was performed. Cells were then fixed and incubated during 5 min with Hoechst (Sigma) and mounted with fluorescent mounting medium (Prolongold, Thermo Fisher). Samples were imaged by the Zeiss SP85 confocal microscope. Infected cells were quantified by counting 10 fields per conditions per experiments (≥ 1000 cells, $n = 3$).

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

At various days post-infection, ELISA assays for human CCL5, IL6, and CXCL10 were performed in mock- and USUV-infected supernatants from microglia cells and astrocytes cells (R&D systems). Data were analyzed on a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Absorbance was measured at 450 nm. Mean concentrations (pg/mL) of cytokines were all superior to the detection limits, defined as the mean background value plus two standard deviations (stddev).

RT-qPCR assays

USUV- or mock-infected cells (microglia and astrocytes) or mouse brain homogenates were harvested in RLT buffer (Qiagen), and RNA was extracted using RNeasy Mini-Kit (Qiagen). cDNA was synthesized (Omniscript reverse transcriptase, Life Technologies), and then analysis was done with a LC480 real-time PCR instrument (Roche). HPRT gene was used to normalize gene expression.

Brdu test

Cell proliferation was evaluated by enclosing 5000 cells in 96-well plates. Astrocytes cells were infected with six USUV lineages at a multiplicity of infection (MOI) 0.1. At 7 dpi, a bromodeoxyuridine ELISA test was performed (Calbiochem BrDU cell proliferation test) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured using a spectrophotometer at 450 nm (TECAN).

MTT test

Cellular apoptosis was evaluated by enclosing 5000 cells in 96-well plates. Astrocytes cells were infected with six USUV lineages at a MOI 0.1. At 4 dpi, the test was performed according to the manufacturer's instructions (Calbiochem, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide, Thiazole Blue, MTT - CAS 298-93-1). Absorbance at 570 nm was measured using a plate reader.

In vitro blood-brain barrier (BBB) model

Briefly, the in vitro human BBB models consist in $CD34^+$ blood cord-derived endothelial cells ($CD34^+$-EC) that have been differentiated and cultured in transwell filters (Costar) on top of bovine pericytes [48]. Medium was changed every 2 days. Lucifer Yellow (LY; 20 µM; Life Technologies) was used to test the endothelial permeability (Pe) by calculating the concentration-independent parameter, and the fluorescence was detected at 432/538 nm [48, 49]. If the barrier is impermeable (Pe ≤ to 1×10^{-3} cm/min), this model was infected with USUV at the MOI of 0.1. After 2 h, the inoculum was removed and 500 µL of fresh medium was added. The medium was also changed at 4, 7, or 10 dpi.

Transendothelial electrical resistance (TEER) measurements

According to the manufacturer's instructions, the TEER was evaluated with the Epithelial Volt/Ohm Meter EVOM2 (World Precision Instruments, Hertfordshire). Electrodes were equilibrated in media and placed in the upper and lower chambers. Background measurement of a Matrigel-coated insert (with no cells) was subtracted from the reading and the value was multiplied by the growth surface area, to determine the TEER values (Ohms*cm^2).

Determination of neuropathogenicity markers

Neurovirulence and neuroinvasiveness markers such as predicted N-linked glycosylation sites or the occurrence of certain amino acids described to be associated with increased virulence were determined as described previously [50]. Amino acid sequences of the polyprotein of each viral strain were aligned using MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation, EMBL-EBI). A percent identity matrix was generated aside with the alignment (Fig. 9a). Some N-linked glycosylation sites as well as specific mutations were highlighted (Fig. 9b).

Statistical analyses

A least three independent experiments with three replicates were done for each experiment. Student's t test and the Mann-Whitney ($^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$) were used to analyze unpaired data with GraphPad Prism software.

Results

USUV isolates are neurotropic but exhibit different virulence profiles in suckling immunocompetent mice

It remains to be described whether all USUV strains can enter the central nervous system (CNS) and cause similar damage to the brain parenchyma or whether lesions are strain-specific. To better characterize the neurovirulence of USUV isolates, we first evaluated the susceptibility of mice to six different USUV lineages (EU1, EU2, EU3, EU5, AF2, and AF3). These isolates were at low passage numbers in order to avoid accumulation of mutations owing to extensive passaging (Table 2, Fig. 1). There is a limited number of experimental models that enable the study of flavivirus virulence because wild-type adult mice are resistant to infection by many of these viruses, including Dengue virus (DENV), USUV, and Zika virus (ZIKV) [51, 52]. To overcome this problem, it is possible to use transgenic mouse models. Mice lacking the interferon type 1 receptor (*Ifnar1*$^{-/-}$) display enhanced susceptibility to infection by flaviviruses [53, 54], and immunocompetent suckling mice are susceptible to viral infection given they have not yet fully developed a functional interferon (IFN) response [51].

To compare and study strain virulence in vivo, neonatal immunocompetent Swiss mice were intraperitoneally (i.p.) infected with different USUV strains at 10^3 tissue culture infectious dose 50% (TCID50) per mouse. Symptoms and mortality were monitored for 20 days. The EU2 strain exhibited the most virulent phenotype as all mice infected by this strain died 10 days post-infection (dpi), whereas the mortality rates for mice infected by EU5, AF3, EU1, EU3, and AF2 strains were 85%, 80%, 56%, 54%, and 53%, respectively, at 20 dpi, the end of the experiment (Fig. 2a). The mean time-to-death was also different between the strains. EU2- and AF2-infected mice died more quickly (8–9 dpi) versus the EU3-, EU5-, and EU1-infected mice (10, 11, and 13 dpi, respectively), whereas AF3-infected mice had a delayed time-to-death with an average of 16 dpi (Fig. 2b). Among infected mice, lethargy and inactivity, limb weakness, and paralysis of the hind limbs appeared on average between 4 and 7 dpi for all strains, except for AF3 for which symptoms appeared later (Fig. 2b). The PBS-inoculated control groups exhibited no signs of disease throughout the experiment. It is interesting to note the induction of convulsive seizures in mice infected with the EU2 strain. These were observed at times of behavioral changes after induction of stress (such as cage changing) and were associated with the epileptiform activities of freezing, tremor, and tail erection. These convulsive seizures were not observed following infection by the other strains, even at later times.

We next investigated the viral burden in the blood and brain of infected mice. In the blood, the viral copy number was higher at 6 dpi in EU2- and EU5-infected mice ($p < 0.5$) (Fig. 2c). All strains tested were neuroinvasive given that we detected the virus in the brains of mice infected with all lineages. However, brain viral burden at 6 dpi was lower in EU1-, EU3-, EU5-, AF2-, and AF3-infected mice compared to EU2-infected mice ($p < 0.01$) (Fig. 2c). EU2-infected brains also showed the presence of more viral antigen by immunohistochemistry staining compared to the other strains, such as AF3- or EU5-infected mice, presenting less viral antigen (Fig. 2d).

Overall, our observations suggest that despite the fact that all strains appear neurotropic and induce neurological impairment in mice, they also have different virulence profiles, particularly the EU2 isolate which appears more pathogenic in this mouse model.

USUV strains differentially induce brain inflammation

As suggested by previous studies [15, 45, 55] and clinical signs observed in our infected mice in this study (such as epilepsy, hind-limb paralysis, limb weakness, and lethargy), USUV infects, replicates, and damages the brain, in turn causing functional abnormalities. To better describe the brain infection profile following infection by the different isolates, we performed

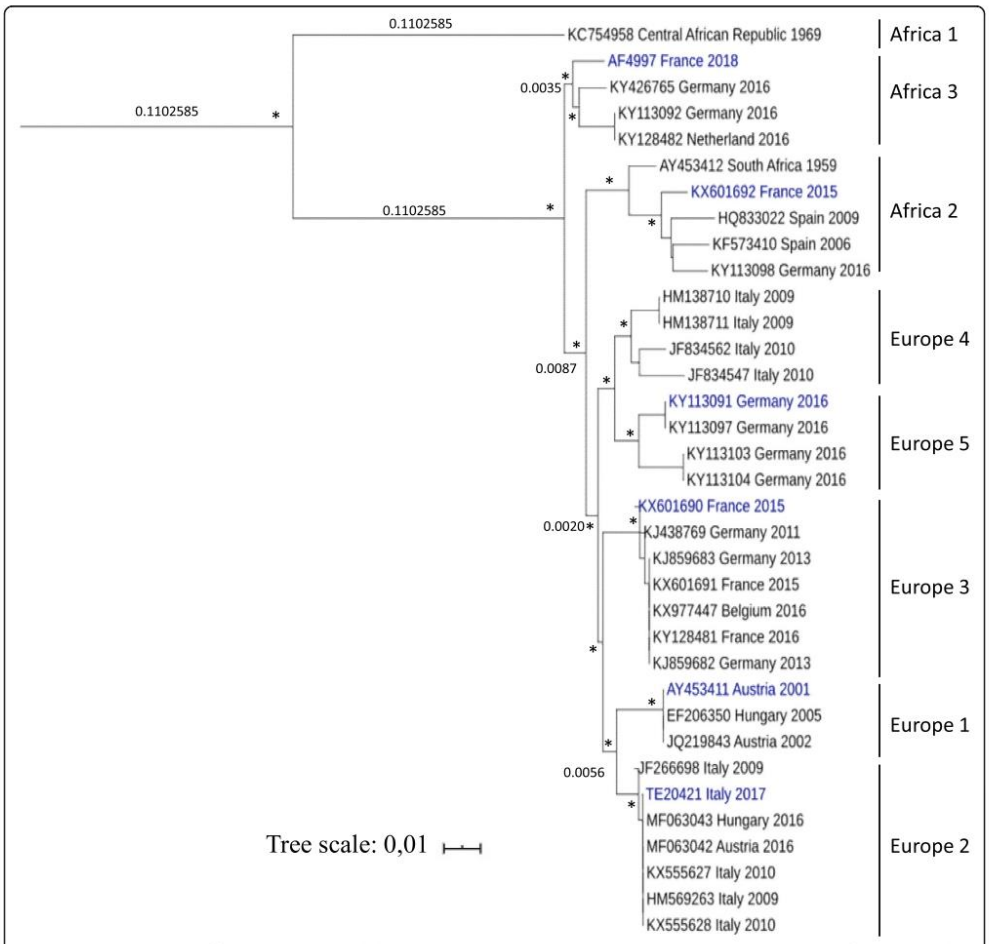


Fig. 1 Phylogenetic analysis of Usutu virus strains. Phylogenetic tree based on the partial NS5 gene and showing positioning of the USUV isolates used in this study (in blue). USUV sequences are labeled with their respective ID or GenBank accession number, preceded by country and year of isolation. Scale bar indicates mean number of nt substitutions per site. The analysis was processed through on line phylogeny analysis (http://www.phylogeny.fr; Réseau National des Génopoles), and tree was rooted with an USUV Africa 1 sequence as the outgroup virus (GenBank accession number KC754958). The asterisks (*) at major nodes indicate an SH-like support value > 70%

immunohistochemistry in infected brains at 6 dpi. Brain sections were stained with an anti-CD45 antibody, which labels all lymphoid cells. We observed USUV-induced recruitment of $CD45^+$ cells for all isolates (Fig. 3a). Cellular infiltration was higher in EU1-, EU2-, and EU5-infected mice compared to the other groups. Caspase-3 staining showed minimal apoptosis, but still more cell death was observed in EU1- and EU2-infected mice (Fig. 3a). To evaluate whether the recruitment of inflammatory cells was correlated with the overexpression of inflammatory cytokines, we analyzed the inflammatory profiles of infected brains at 6 dpi by RT-qPCR (Fig. 3b). We chose markers that have already been associated with viral encephalitis and neurodegenerative diseases, including tumor necrosis factor alpha (TNFα), interleukin 6 (IL6), and interleukin 1 β (IL1β). We detected a strong increase in expression of *Tnfα*, *Il6*, and *Il1β*, but also interferon beta (*Infβ*) in all mouse USUV-infected brains. Increases

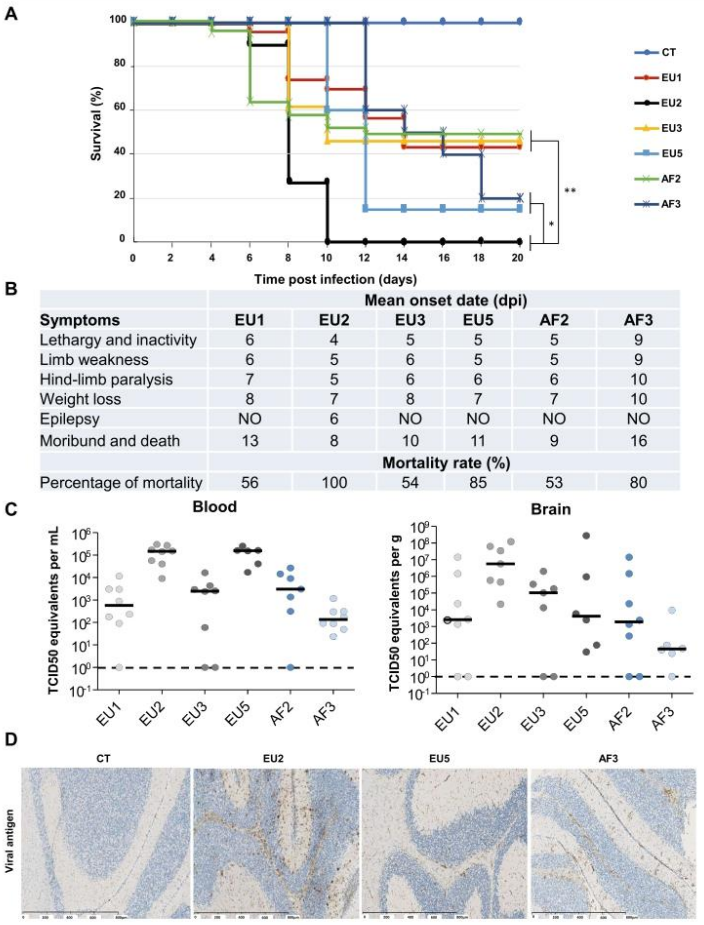


Fig. 2 Clinical signs of USUV infection in suckling immunocompetent mice according to strains. **a** Survival rates of neonatal Swiss mice (6 days old) intraperitoneally inoculated with 10^3 TCID50/mouse of six different USUV lineages. CT = control mice. **b** Onset date of symptoms in USUV-infected suckling mice. Mice were monitored daily until clinical signs of disease were displayed and then were euthanized. Symptoms appeared at around 5 dpi for all strains excepted for AF3 (9 dpi). Epilepsy is observed only in mice infected by EU2. $n = 6$ for each group. **c** Viral burden in blood and brain was measured by RT-qPCR assay at 6 dpi and indicated by TCID50 equivalent per mL or per gram. **d** Transverse sections of the brain (cerebellum) of USUV-infected mice at 6 dpi showing the presence of viral antigen after pan-*flavivirus* staining (associated with luxol blue). $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$

in expression were generally smaller for African isolates compared to European isolates, except for *Il1β* expression with varying expressions between strains.

USUV isolates differentially infect and replicate in primary human astrocytes and induce deleterious effects on cellular proliferation and apoptosis

To better understand the capacity of USUV to infect the brain, we compared USUV isolate virulence in various cell types of the CNS. Firstly, we infected primary human astrocytes with all isolates at a MOI of 0.1. Surprisingly, an atypical CPE was observed at 7 dpi following infection by the EU2 isolate (Fig. 4a). USUV-induced CPE are often characterized by cells rounding up during necrosis, apoptosis, or pyroptosis [56]. Here, CPE induced by EU2 was characterized by dark clusters of cells that detached from the cell mat whereas the other isolates demonstrated typical CPE. In order to determine

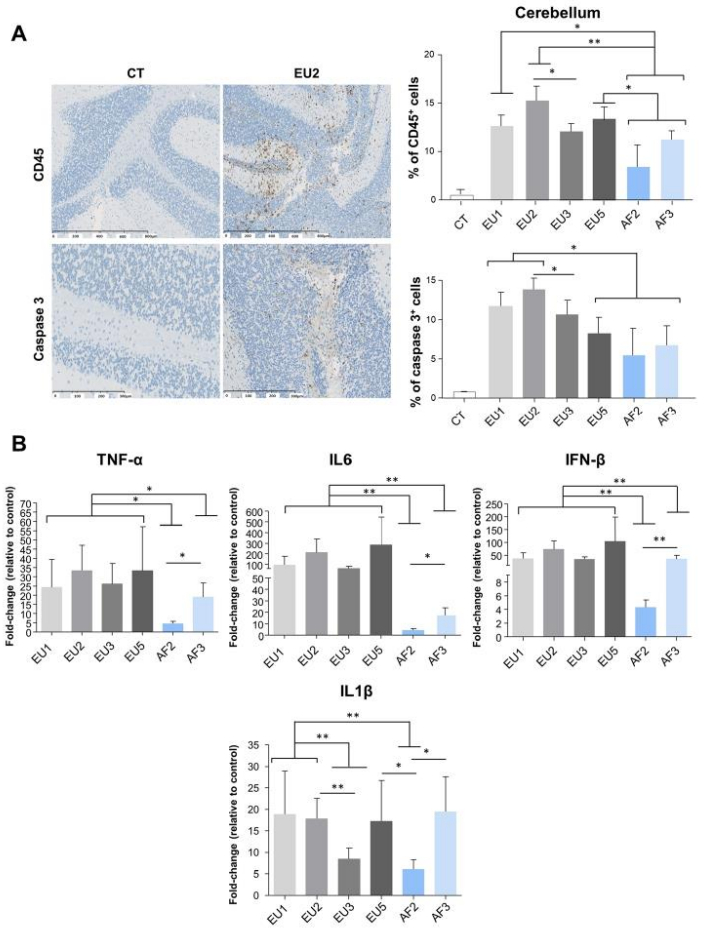


Fig. 3 USUV isolates differentially induce cellular infiltration, apoptosis, and inflammation in the mice brain. **a** Left panel: Immunohistochemical CD45 staining (associated with luxol blue) showing inflammatory infiltrates in the infected brain (brown staining) at 6 dpi. Some cells present caspase 3 staining after immunohistochemistry. Right panel: Quantification of CD45-positive cells and caspase 3 positive cells in USUV-infected brain compared to CT. **b** qRT-PCR analysis of TNFα, IL6, IFNβ, and IL1β mRNA from the brain collected at 6 dpi. Each histogram represents the mean ± SEM from 6 independent mice normalized to CT. *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$

whether this CPE was characteristic of the EU2 lineage, we analyzed another EU2 isolate (TE18982). We observed the same atypical CPE, suggesting that this observation could be lineage-dependent rather than strain-dependent (Supplemental Figure 1A).

Since the replicative capacity of a virus is considered to be a marker for virulence, we studied the replicative capacity of the different USUV strains in astrocytes. This approach is based on the fact that the most virulent viral strains produce more progeny, which can lead to higher viral densities and therefore greater levels of virulence. Astrocytes infected with the EU1 and EU2 strains released more infectious viral particles at 2 dpi than astrocytes infected with the other strains for which no significant amplification is observed (Fig. 4a). At later times of infection (until 7 dpi), EU2 produced higher titers than the other strains as the production of viral particles further increased while decreasing for all the other strains (Fig. 4a).

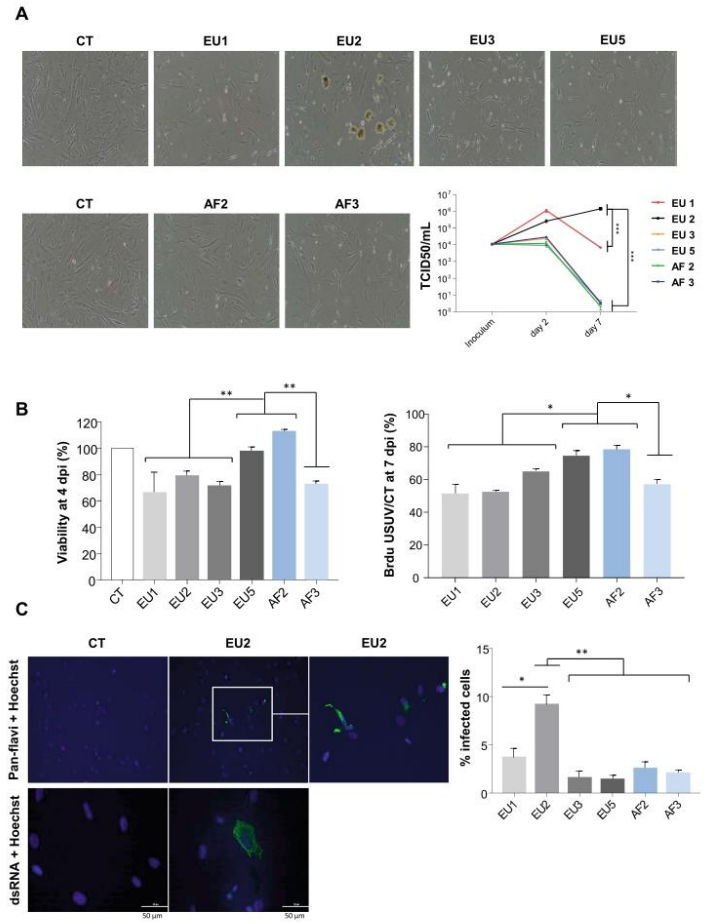


Fig. 4 Comparative virulence between USUV strains in primary human astrocytes. Primary human astrocytes were infected with the six lineages of USUV at a MOI of 0.1. **a** Left panel. Bright light images of CT- and USUV-infected astrocytes showing at 7 dpi an atypical CPE which appeared specifically with the EU2 strain. This CPE is characterized by dark clustered cells that detach from the cell mat. Right panel: Supernatants from infected cells were collected at 2 and 7 dpi and subjected to TCID50 measurement on Vero cells. EU2 strain replicates longer in astrocytes. Results are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. **b** Apoptosis (4 dpi) and cellular proliferation (7 dpi) measured by MTT and BrDU are affected by USUV infection. **c** Left panel. Mock and EU2 USUV-infected cells were fixed at 2 dpi and labeled with the pan-*flavivirus* antibody (in green) or double-stranded RNA antibody (in green) by indirect immunofluorescence. Nuclei are labeled with Hoechst (in blue) immunofluorescence (× 20 and × 40). The white square represents a zoom on infected cells. Scale bar = 50 μm. Right panel: Quantification of infected cells at 2 dpi (using pan-*flavivirus* antibody) showing more infected cells with the EU2 strain. For all experiments, $n = 3$ independent triplicates. *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$

A similar trend was observed for the other EU2 strain (Supplemental Figure 1B). This is a surprising result because even with CPE the production of viral particles continued to increase over time, suggesting that the virus is persistent and the remaining cells produce a significant amount of infectious viral particles.

To measure the viability of infected astrocytes we performed MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tests at 4 dpi. Results showed more cell death following infection by EU1, EU2, EU3, and AF3 strains compared to EU5 and AF2 strains (Fig. 4b). Given bright-field microscope images of USUV-infected

astrocytes seemed to indicate a defect in cellular proliferation, we next explored whether cell division was affected by USUV infection. Astrocytes infected or not by USUV strains were incubated in the presence of the nucleotide analog BrdU and then quantified at 7 dpi by ELISA (Fig. 4b). Compared to non-infected cells, all USUV-infected astrocytes showed a decrease in proliferation at 7 dpi which is however less important for EU5 and AF2 isolates. Pan-*flavivirus* immunofluorescence staining showed very few positive cells but we clearly observed more infected cells after EU2 infection (Fig. 4c). The pattern of antigen staining was characteristic of antigen distribution in the endoplasmic reticulum, a classical site for flavivirus replication (Fig. 4c). Double-stranded RNA staining also indicated an efficient EU2 replication in astrocytes (Fig. 4c). Altogether, these results suggest that the EU2 strain targets primary human astrocytes more efficiently than the other USUV lineages and replicates for longer time.

Variation of chemokine and cytokine secretion, and gene expression levels in primary human astrocytes between different USUV isolates

Astrocytes, along with microglia, are the predominant source of cytokines and chemokines of CNS resident cells, and thus may act as important processors of neuroinflammation and neurodegeneration [57]. Astrocytes are key players in the inflammatory response during neural infections caused by flavivirus [58, 59]. Consequently, we investigated the mechanisms of induction of the inflammatory signaling elicited by the different USUV isolates in these cells. We first analyzed the modulation of expression of several genes involved in pro-inflammatory cytokine release. We collected mRNAs from USUV- or control-infected human astrocytes at 2 dpi and we performed RT-qPCR to quantify gene transcript levels of selected cytokines (*TNFα*, *CXCL10*, *CCL5*, and *IL6*) (Fig. 5a). We are interested in these cytokines because innate immunity is generally required for clearance of viral infection, and when clearance is ineffective, excessive cytokine release can occur. This can be detrimental and associated with adverse effects, such as CNS disorders. Thus, the main risk during neuroinvasive viral infection is the dispersion of the virus in the CNS, causing induction of inflammatory responses and destruction of neuronal cells. At 2 dpi, we observed a strong upregulation of cytokine mRNA in infected human astrocytes, mainly for the EU1, EU2, and AF3 isolates (Fig. 5a). In parallel, we used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to investigate the secretion of CXCL10, CCL5, and IL6 chemokines/cytokines into the culture medium of USUV- and control-infected astrocytes (Fig. 5b). The amount of soluble CXCL10, CCL5, and IL6 was increased in the supernatant of infected astrocytes at 2 dpi, but it varies depending on the isolates used for infection similarly to the results obtained by RT-qPCR (Fig. 5b). Increased expression of CCL5 and CXCL10 could enhance recruitment and activation of immune cells and resident neuronal cells at the site of infection, thereby promoting the clearance of free virus as well as of infected cells in the CNS. Indeed, CCL5 has been reported to have both neuroprotective [60] and direct antiviral activities [61]. Moreover, during the inflammatory response, astrocytes may influence the balance between host protection and neurotoxicity. Considering this, we next investigated the antiviral response. We analyzed the effects of USUV strains on the mRNA level of *Ifnβ* and several cellular pattern recognition receptors (PRRs), as well as some effectors involved in their signaling pathway, including interferon regulatory factor 3 (*IRF3*) and myeloid differentiation primary response 88 (*MYD88*). We observed increased expressions of retinoic acid-inducible gene I (*RIG-I*), melanoma differentiation-associated antigen 5 (*MDA5*), and toll-like receptor 3 (*TLR3*), known to be activated by double-stranded viral RNA during viral replication and involved in IFNβ induction [62]. These genes all exhibited USUV strain-dependent expression levels. We did not observe a significant increase in toll-like receptor 7 (*TLR7*) expression (Fig. 5c). In the literature, PRR expression levels generally increase in concert with ascending responses to viral infection, and suchlike increases are considered to reflect pathway activation [62]. Accumulation of these RNA sensors was accompanied by upregulated mRNA expression levels of IFN signaling pathway components, such as *IFNβ* itself, but also *MYD88* and to a lower extent *IRF3* (Fig. 5c).

Altogether, the gene induction profiles were heterogeneous between the strains. These results suggest that USUV isolates differentially affect cytokine/chemokine production and antiviral responses in primary astrocytes.

USUV strains differentially infect and replicate in microglial cells

Microglia represents the resident immune cells of the CNS. During brain infection, they have a critical role in host defense against invading viruses. We previously described that USUV efficiently infects microglia ex vivo in organotypic murine brain slices [45] and the hippocampal area of USUV-infected mice [56]. To determine if USUV isolates can infect microglial cells in vitro, we infected the immortalized murine microglial cell line BV-2 at an MOI of 0.1 [63]. Comparable to our results obtained with astrocytes, we observed an atypical CPE at 5 dpi in microglia infected with the EU2 lineage (Fig. 6a) but not with the other lineages, even at later times (Supplemental Figure 2A). This suggested that this atypical CPE is not a specific feature of infected astrocytes. At 5

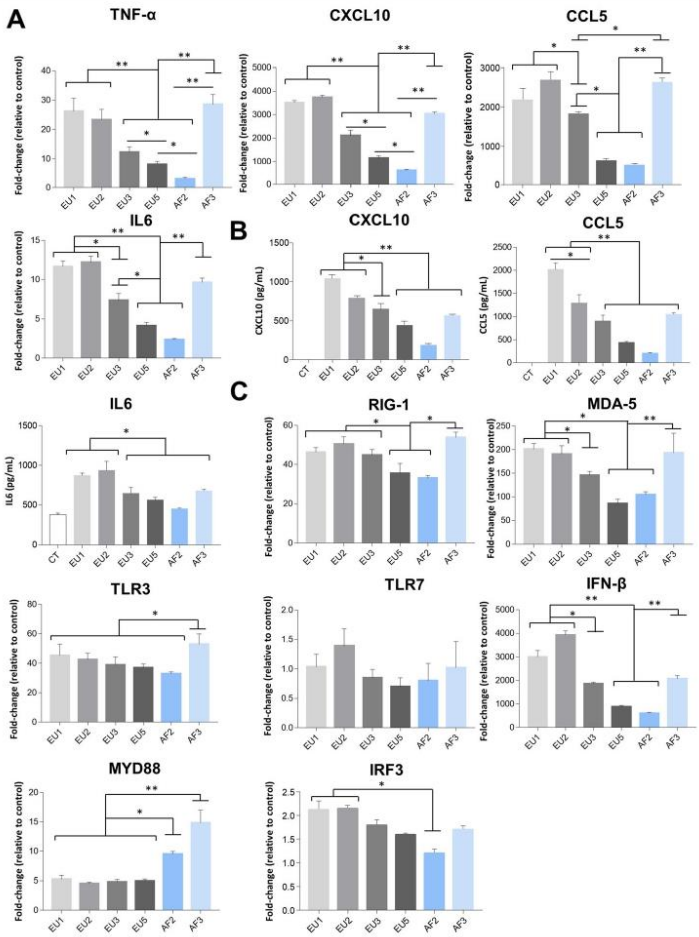


Fig. 5 Infection of astrocytes by USUV strains leads to different profiles in the secretion and expression of pro-inflammatory cytokines. **a** qRT-PCR analysis of TNFα, CXCL10, CCL5, and IL6 mRNA collected at 2 dpi from human astrocytes cells infected or not by USUV. Results are expressed as means of the fold regulation. **b** ELISA analyses of CXCL10, CCL5, and IL6 (pg/mL) at 2 dpi. Each histogram represents the mean ± SEM from 3 independent experiments. **c** qRT-PCR analysis of RIG-1, MDA-5, TLR3, TLR7, IFNβ, MYD88, and IRF3 mRNA collected at 2 dpi from human infected astrocytes. Results are expressed as means of the fold regulation normalized to CT (3 independent triplicates). *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$

dpi, viral titer increase for the EU2 lineage while it decreased for all other isolates (Fig. 6a). Moreover, we detected by pan-*flavivirus* immunofluorescence staining that approximately 50% of cells were EU2-infected, 23% were EU1-infected, and less than 10% were infected by the other strains at 2 dpi (Fig. 6b).

We then investigated the effect of USUV infection on the mRNA expression of key pro-inflammatory cytokines. To compare pro-inflammatory cytokine gene induction between the several isolates in microglia, we collected mRNAs at 2 dpi and performed RT-qPCR to quantify gene transcript levels of *Tnfa*, *Cxcl10*, *Ccl5*, *Il6*, and *Infβ*. We observed a strong upregulation of these cytokine mRNAs, with the exception of *Tnfa*, primarily in EU2- and AF3-infected microglia (Fig. 6c). These data highlight the induction of cytokine signaling by USUV in microglia, particularly by the EU2 and AF3 isolates. This was unexpected given that at 2 dpi the AF3 strain

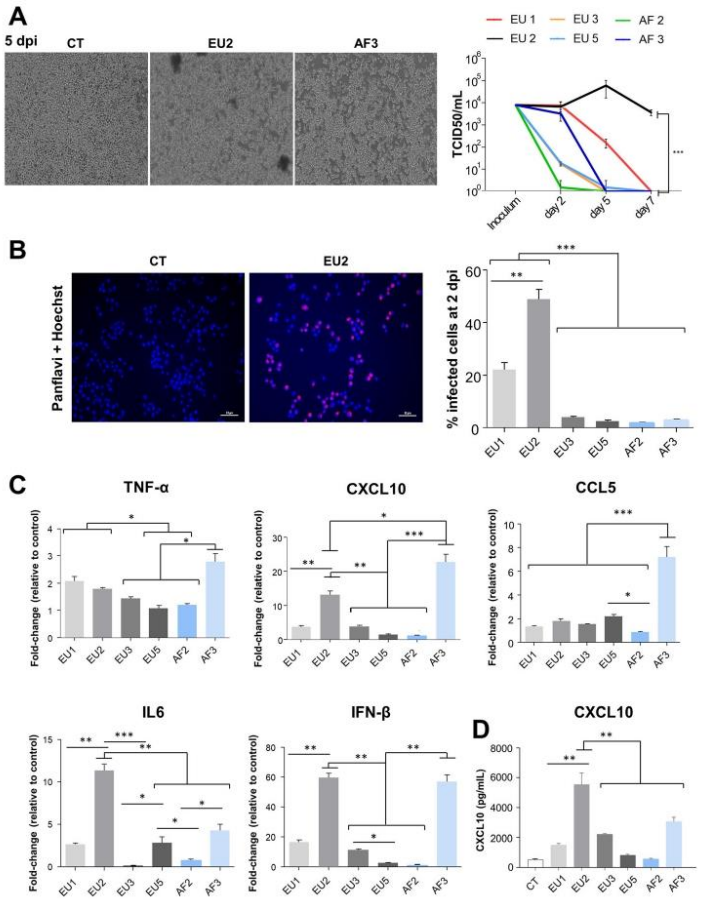


Fig. 6 USUV strains replicate differentially in murine microglia and EU2 strains persist longer. Murine microglia were infected with USUV strains at a MOI of 0.1. **a** Left panel: Bright light images of control and USUV-infected microglia at 5 dpi. We observe an atypical CPE- in EU2-infected cells. Right panel: Supernatants from infected cells (MOI 0.1) were collected at 2, 5, and 7 dpi, and subjected to TCID50 measurement. Viral production in USUV-infected microglia shows difference in terms of replication and persistence between strains, with greater virulence for EU2. **b** Left panel: USUV-infected cells were fixed at 2 dpi and labeled with the pan-*flavivirus* antibody (in red) as showed for EU2 strain. Scale bar = 50 µm. The corresponding quantification is indicated on the right panel (n = 3 independent experiments). **c** RT-qPCR analysis of TNFα, CXCL10, CCL5, IL6, and IFNβ of mRNA collected at 2 dpi from infected and non-infected (CT) microglial cells. **d** Analyses of CXCL10 by ELISA in the supernatants of CT- or USUV-infected microglia at 2 dpi. Results are expressed as mean ± SEM. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$

infected a very small percentage of cells (3%, Fig. 6b). On the other hand, the AF3 strain ultimately induced efficient replication and a strong inflammatory response, suggesting that the few infected cells present produced a substantial amount of infectious viral particles. CXCL10 protein secretion measured by ELISA was also significantly increased in microglia infected by both EU2 and AF3 to a lower extent in comparison to the control and other strains (Fig. 6d).

Our results provide evidence that USUV isolates differentially infect and replicate in murine microglial cells. Microglia appear to be more permissive to the EU2 isolate, which also persists longer in this cell type as we already observed in astrocytes.

All USUV lineages infect pericytes, neurons, and brain endothelial cells, but the EU2 isolate appears more virulent

Next, we compared the replication of the six circulating USUV strains in other CNS cell types: neurons, pericytes, and brain endothelial cells. Brain endothelial cells are highly specialized cells and form the BBB isolating the CNS parenchyma from the blood. The BBB regulates the flow of solutes, cells, and pathogens [64]. Infection and/or disruption of this barrier might be a key event preceding viral invasion. Pericytes are present on the abluminal surface of brain microvessels, and they have a regulatory effect on BBB formation and permeability [65]. Although USUV is currently described as a neurotropic virus and we previously reported that it can effectively replicate in murine neurons, the relative ability of USUV to replicate in cells of the BBB, such as pericytes and brain endothelial cells, is unknown [56]. Similar to our results obtained with astrocytes and microglia, the EU2 strain induced an atypical CPE both in neurons (4 dpi) and in brain endothelial cells (6 dpi) (Fig. 7a, c; Supplemental Figures 2B and 3B). Pericytes on the contrary did not demonstrate any CPE following infection by any of the strains (4 dpi) (Fig. 7b, Supplemental Figure 3A). Moreover, it is noteworthy that neuronal damage was observed at 4 dpi, showing principally neurite destruction in EU1, EU2, EU3, and AF3-infected neurons (Fig. 7a, Supplemental Figure 2B). Productive USUV replication in neurons and pericytes was observed for all strains (Fig. 7a, b). Viral production in murine neurons and in human pericytes at 4 dpi was higher for the European strains, especially the EU2 isolate (Fig. 7a, b). In human brain endothelial cells, we showed that the EU2 strain replicated strongly and was persistent over time (Fig. 7c). Indeed, the viral titer was very comparable between the different lineages at 2 dpi, but at 6 dpi the quantity of EU2 viral particles increased, while it decreased over time from 4 dpi for EU1 and from 2 dpi for the other isolates.

Altogether, our results show that neurons, pericytes, and brain endothelial cells are all permissive to infection by the different USUV strains, but only the EU2 isolate appears again be persistent in these cell types.

USUV EU2 and AF3 infect and replicate in human brain-like endothelial cells (hBLEC) without perturbation of endothelial integrity

The BBB is very effective in protecting the brain from viruses circulating in the blood. However, neuroinvasive viruses have developed a variety of mechanisms to pass through the BBB and reach the CNS. Several arboviruses, such as WNV and JEV, lead to endothelial integrity impairment and inflammatory molecule production that can disrupt BBB integrity and in turn allow access of the virus to the CNS [66–68]. In this study, we used a human in vitro BBB model which recapitulates the essential characteristics of the endothelial barrier. To acquire BBB characteristics, human $CD34^+$ cord blood-derived hematopoietic stem cells were cultivated on culture inserts, in co-culture with pericytes for 6–7 days (Fig. 8a). These hBLEC can form tight junctions and express specific transporters [48] which can allow the study of drug or cell passage through the BBB [69, 70]. We have previously shown that USUV AF2 can replicate in hBLEC and cross the BBB without barrier breakdown [45]. Since replication in brain endothelial cells is sufficient to allow viral transport through BBB, we investigated whether both EU2 (particularly virulent) and AF3 (less virulent) strains could infect and disrupt integrity of the BBB in vitro. Following, hBLEC were infected by USUV on the apical side at an MOI of 0.1. Supernatants were collected at 4, 7, and 10 dpi from the apical (equivalent to blood vessel lumens side) and basolateral (CNS parenchymal side) compartments, and cells were fixed to analyze localization of tight junction proteins, regulating BBB integrity. Thus, endothelial permeability coefficient (Pe) consisting to evaluate the clearance principle of Lucifer Yellow (LY) and transendothelial electrical resistance (TEER) were also measured. Figure 8b shows viral titers in apical and basolateral compartments at 4 dpi (corresponding to the production between 0 and 4 days), 7 dpi (production between 4 and 7 days), and 10 dpi (production between 7 and 10 days). For the EU2 strain, weak viral production was detected at 4 and 7 dpi in the basolateral compartment, but production then increased at 10 dpi. On the other hand, in the apical compartment, the viral production was high at 4 dpi and decreased at 7 dpi, and then increased again at 10 dpi (Fig. 8b). These results suggested an overall efficient production. The AF3 isolate presented a different profile, with no efficient production at 4, 7, or 10 dpi, in both the apical and basolateral compartments (Fig. 8b). Pe of LY appeared not significantly altered by either EU2 or AF3 strains at 10 dpi, both control and infected endothelia displayed permeability coefficients of ~ 0.8 × 10^{-3} cm/min, consistent with a "tight" BBB endothelium (inferior to 1.0) (Fig. 7c). We observed no significant variation in TEER values after infection (Fig. 8c) and the endothelium remained impermeable with no manifestation of architectural disturbance (Fig. 8d).

Our results suggest that despite USUV EU2 being the most virulent strain among the strains tested in this study, EU2 infects the BBB from the luminal side without deleterious effects on BBB integrity.

Genome analysis highlights mutation in NS5 EU2 strains potentially correlated with virulence

By comparing the differences at protein level, we found that among USUV strains, the amino acid average pairwise identity was between 98.57 and 99.77% (Fig. 9a). Mutations predicted to influence virulence,

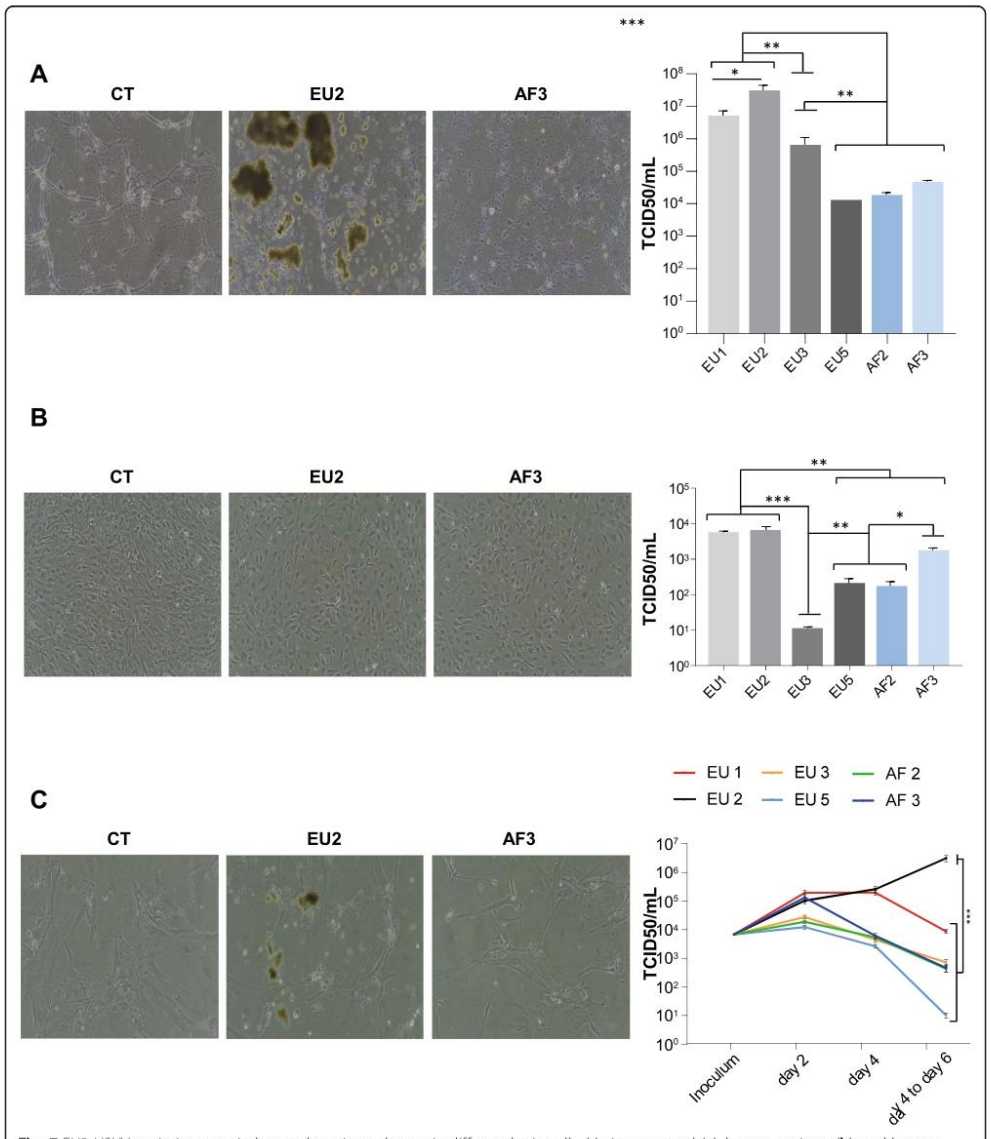


Fig. 7 EU2 USUV strain is more virulent and persistent longer in different brain cells. Murine neuronal (**a**), human pericyte (**b**), and human endothelial (**c**) cells cultures were infected with USUV at a MOI of 0.1. Bright light images of CT- and USUV-infected neuron at 4 dpi (**a**) and endothelial cells at 6 dpi (**c**) show atypical CPE in EU2 condition while infection induces no CPE in pericytes at 4 dpi (**b**). Viral quantification for each cell type is expressed in TCID50/mL. Results are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$

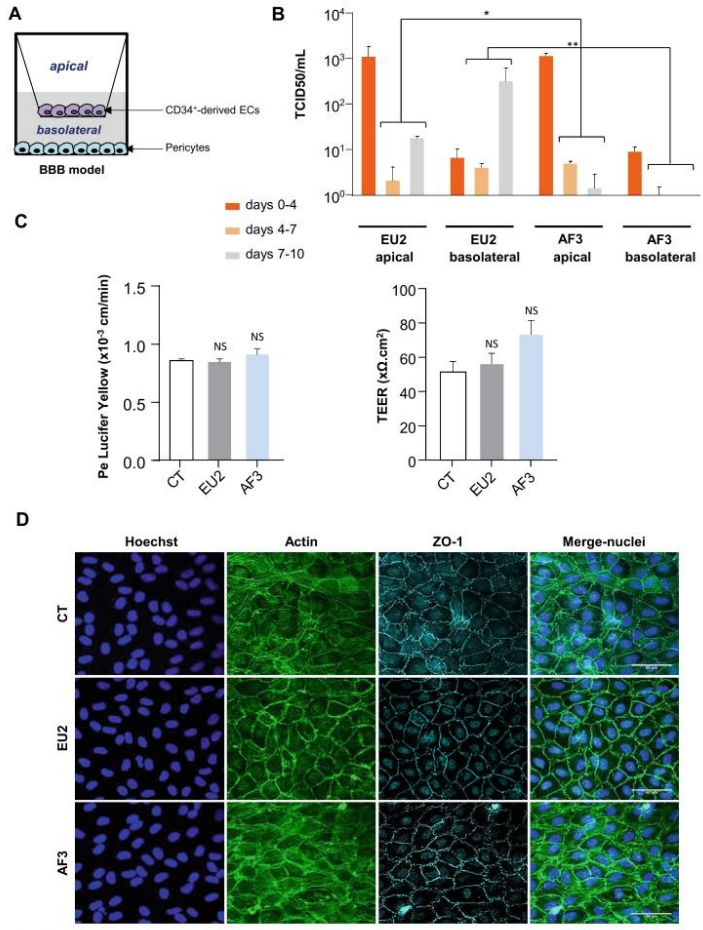


Fig. 8 USUV efficiently replicates in a human model of the blood-brain barrier without inducing alteration of endothelium integrity. **a** Human in vitro BBB model composed by CD34$^+$ blood cord-derived endothelial cells cultured on transwell filters and placed on top of pericytes. **b** hBLECs were infected with USUV EU2 and AF3 at MOI 0.1. Viral titers from both compartments are indicated at 4, 7, and 10 dpi (*$p < 0.05$, **$p <$ 0.01). **c** Permeability (Pe) of the Lucifer Yellow (LY) paracellular marker and transendothelial electrical resistance (TEER) was measured at 10 dpi. Each point represents the mean ± SEM of 3 independent experiments. NS = not significant. **d** Immunofluorescence of actin and Zonula occludens (Zo)-1 staining showing no perturbation of endothelium structure (10 dpi). Scale bar = 50 µm

pathogenicity, or neuroinvasiveness were then analyzed. USUV strains were compared to a WNV lineage 2 strain which circulated in Europe in 2018 (WNV L2): WNV-6125 France 2018 (P2018-3687). Flaviviruses are described to have N-linked glycosylation sites on their envelope proteins. Glycosylated E protein interacts with cell surface lectins, facilitating attachment and infectivity [50]. As expected, USUV strains have not N-linked glycosylation site at position N67 known to be unique to DENV whereas in all strains we observed glycosylation at N154 (motif NYS) that is highly conserved among flaviviruses. All strains exhibited also the potentially more virulent proline at position NS1-250 [71]. As shown in Fig. 9b, the three potential N-linked glycosylation sites at positions 130, 175, and 207 within the NS1 protein, all molecular determinants of neuroinvasiveness, could be identified in all strains as well. Concerning NS5, we observed, specifically in USUV EU2, an amino acid

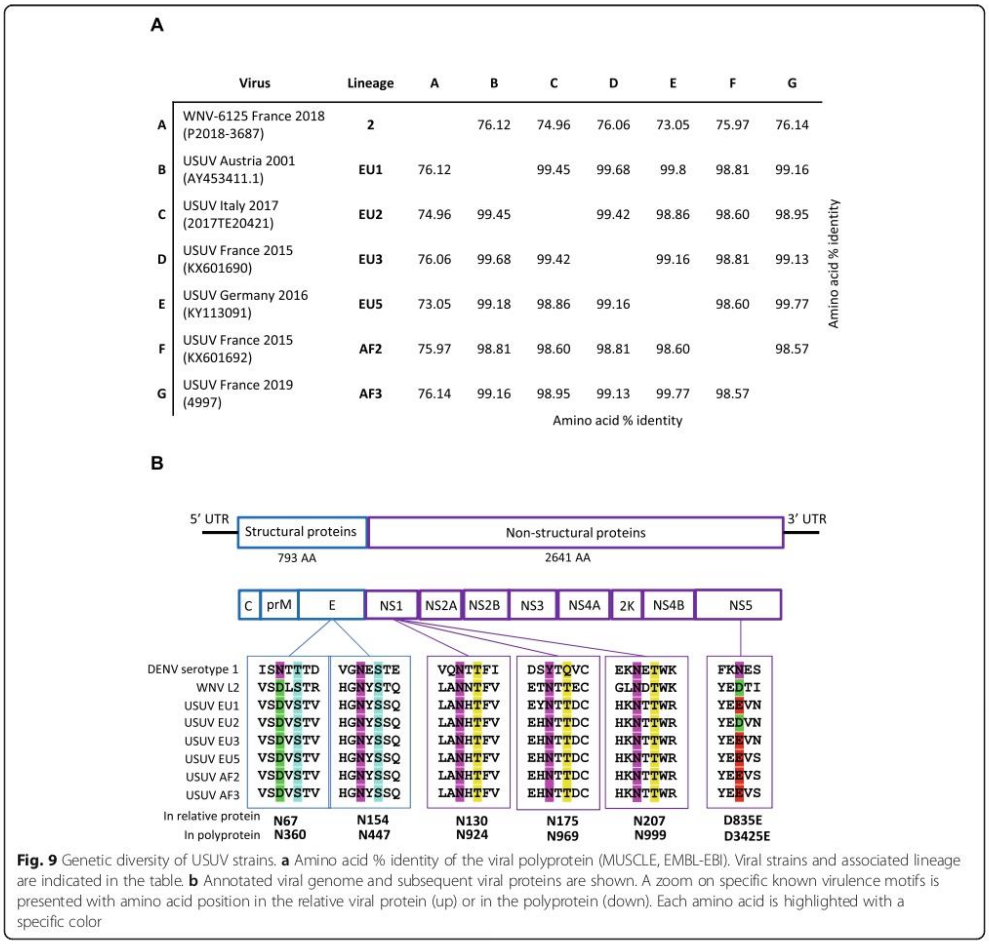


Fig. 9 Genetic diversity of USUV strains. **a** Amino acid % identity of the viral polyprotein (MUSCLE, EMBL-EBI). Viral strains and associated lineage are indicated in the table. **b** Annotated viral genome and subsequent viral proteins are shown. A zoom on specific known virulence motifs is presented with amino acid position in the relative viral protein (up) or in the polyprotein (down). Each amino acid is highlighted with a specific color

substitution at position 3425 of the polyprotein, which corresponds to the residue position 835 of the NS5 protein (E3425D/E835D-NS5) (Fig. 9b). We also found this mutation in the second EU2 strain that we used in our study (data not shown). In addition, by analyzing other EU2 sequences available online, we found this mutation in 14/15 isolates (except for JF 266698). This suggests that this substitution could be a characteristic mutation of EU2 lineage. Interestingly, this mutation was previously described for an EU2 strain isolated from a patient with neuroinvasive disease [21]. More precisely, this mutation is localized in the RNA-dependent RNA polymerase domain of the NS5 protein that codes for the viral RNA polymerase. We also identified other unique mutations for EU2 strain (NS1: E36G, R57X, L85, NS2A: 108 T, NS4B: 133S, K349R, T325X, NS5: 55I).

Discussion

USUV is classified into eight distinct lineages, which can circulate simultaneously in certain areas, especially in Europe. USUV has been repeatedly introduced into Europe from Africa over the last 50 years [72]. Our observations suggest that different isolates from the 6 main USUV lineages can efficiently infect suckling immunocompetent Swiss mice and they all have the ability to access and replicate in the brain parenchyma. However, we reported different virulence profiles between the strains. In particular, the EU2 isolate appeared more pathogenic,

whereas the AF3 strain had a significant delay in appearance of symptoms and mortality. One of our striking results is that the EU2 isolate, unlike the other isolates, induced symptoms similar of epileptic seizure including freezing, tremor, and tail erection. Seizures are commonly reported consequences of infection by several neurotropic viruses that can induce neuroinflammatory responses, leading to enhanced neuronal excitability and ultimately contributing to epileptogenesis. For example, another flavivirus ZIKV is known for its induction of epileptic seizures in neonatal infected mice [73]. Exacerbated inflammation could be a consequence as well as a cause of epilepsy, and several inflammatory mediators, such as IL1β, TNF, and IL6, have been detected in surgically resected brain tissue from epileptic patients [74]. The major role of brain inflammation in the development of seizures has also been demonstrated in several models of infectious diseases [75]. However, given the fairly similar inflammatory profiles between the different European isolates in infected mice, exacerbated inflammation does not seem to be the only cause of the convulsive seizures observed following EU2 strain infection.

Viral infections of the CNS are dependent upon viral replication characteristics as well as immune responses to the virus. Once in the brain, neurotropic arboviruses can infect a variety of cells and lead to general neuroinflammation and eventually BBB impairment if cells of the neurovascular unit (NVU) as pericytes, or endothelial cells are targeted, as already described for JEV [76, 77] or DENV [78]. The concept of the NVU was defined by Harder [79] as a structure formed by neurons, astrocytes, pericytes, microglia, oligodendrocytes, and endothelial cells. Interactions occur between neural, glial, and vascular components of the NVU in response to physiological stimuli or neuroimmune responses. Overall, these interactions maintain CNS homeostasis. NVU cells are direct or indirect targets of neurotropic flaviviruses. Infection of these cells can induce the release of soluble mediators that are involved in neuroinflammation and, in some cases, disruption of the blood-brain barrier (BBB). However, CNS resident cells have developed innate antiviral immune strategies to defend against neurotropic viruses. If neurons are a major target, other cell types such as astrocytes, microglia, pericytes, and endothelial cells can also become infected and participate to the resolution of infection by generating immune responses. Microglia and astrocytes are the main cells in the CNS responsible for initiating, regulating, and maintaining neuroimmune responses to viral infections. Activated glial cells are known to produce numerous mediators, including cytokines and chemokines, that orchestrate both the defense against and the pathogenicity of CNS viral infections [80]. Astrocytes can be infected by different flaviviruses, including ZIKV, WNV, JEV, or tick-borne encephalitis virus (TBEV) [59, 81, 82], as well as USUV [56]. Interestingly, as observed in suckling immunocompetent Swiss mice, the EU2 USUV isolate also resulted in higher viral infection/replication in a large panel of neuronal cells. In this regard, EU2 infection resulted in higher susceptibility and proportion of infected cells in astrocytes, where we observed increased virulence with two different strains, suggesting that the effect is potentially lineage-dependent rather than strain-dependent. The ability of the USUV strains to differentially replicate in NVU cells may favor the capacity of the virus to undergo a second round of infection into the CNS. Thus, NVU cells may play a central role not only in the initial dissemination of different USUV strains to the CNS, but also in secondary waves of spread, both likely to exacerbate USUV-mediated neuropathology.

CNS cells express a number of PRRs and are able to respond to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs; derived from pathogens) and to damage-associated molecular patterns (DAMPs; released upon CNS damage). USUV appears to induce a different cytokine response depending on the cell type and the strain. For example, the EU2 isolate replicated more efficiently and induced stronger cytokine responses in microglia, one of the main effector cells in neuroinflammation. The AF3 strain had a similar profile; nevertheless, it replicated for a shorter time in these cells. The fact that the EU2 strain replicates more and for a longer time compared to the other strains in several CNS cell types could explain the strong deleterious effect of the infection observed in vivo. The host innate antiviral response plays a central role in controlling viral replication. Following USUV infection, the inflammatory context is associated with an important antiviral response, as observed by up-regulation of IFNβ in the infected brain and in neuronal cells. In infected astrocytes, there was increased expression of genes involved in the antiviral response, such as IFNβ and IRF3, mainly for EU1 and EU2 strain infections. Nonetheless, replication was also highest for these two strains. These results suggest that the IRF3-dependent arm of the host antiviral response does not differentially restrict USUV strain replication within infected cells. Moreover, the host antiviral response appears to play a minimal role in the differential susceptibility of astrocytes to different USUV strains. The absence of an efficient protective effect of type 1 IFNs has been demonstrated for numerous other neurotropic flaviviruses, such as DENV and WNV [83]. Previous studies have shown the induction of antiviral responses despite USUV replication, suggesting that USUV does not harbor mechanisms that efficiently interfere with IFN induction [56]. The mechanisms used by USUV to interfere with this IFN response in order to

establish a productive infection are currently not known. RIG-I, TLR3, and MDA5 are well-conserved cytoplasmic PRRs that detect viral RNAs during infection and activate the type I IFN-mediated antiviral immune response. RNA levels of PRRs generally increase in concert with viral infection and are considered to reflect pathway activation. While RIG-I or TLR3 were overexpressed following USUV infection and this did not vary strongly between different strains, MDA5 overexpression was greater in isolates with strong IFNβ induction, including the EU1, EU2, and AF3 strains.

Host innate responses leading to pro-inflammatory cytokine and chemokine production are thought to modulate BBB integrity and enable viruses to access the brain [84]. The brain endothelium constitutes a primary barrier to virus neuroinvasion. Using an in vitro BBB model that exhibits the physiological characteristics of the brain endothelium [48], we demonstrated that the EU2 isolate, the most virulent strain we tested, can infect and replicate in hBLEC. Here, viral particles were released in the basolateral compartment (which would correspond to the parenchymal side) for a prolonged time (unlike the AF3 strain), potentially increasing the capacity of the EU2 strain to cross the BBB. However, this isolate did not disturb endothelial integrity. It is generally suggested that for viral invasion BBB disruption is a pivotal event. Yet, numerous studies show that neurotropic flaviviruses can reach the CNS by crossing the BBB without breaking the barrier, allowing free virus to spread in the CNS. Our findings are consistent with reports that the capacity of virus to cross the BBB to reach the CNS is not systematically the determining factor for neuropathogenicity. Increasing evidence suggests that viral entry into the CNS is often a multistep process that can occur through one of several routes. Some neurotropic viruses can directly infect the endothelial cells of the brain and release viral particles into the parenchyma. Viral neuroinvasion can thus occur via replication of the virus within NVU cells prior to the breakdown of the BBB. This mechanism is thought to be shared by neuroinvasive viruses, including the closely related flavivirus WNV, and enhances dissemination within the CNS [85]. Our results suggest that the differential invasion of the brain by the several different USUV strains does not seem to be linked to strain-dependent BBB disturbance, but rather to a different capacity to infect and replicate in the cells forming the BBB.

Another interesting observation is the presence of a specific and atypical CPE following EU2 lineage infection in all CNS components (with the exception of pericytes). The characteristics of CPE caused by flaviviruses vary according to the host cell and involved various factors, including viral receptors, host genetics, defective viral particles, and immune response [86]. CPE induced by USUV is usually characterized by a diffuse CPE corresponding to cell rounding, shrinkage, and lysis. The atypical CPE we observed with two different isolates of EU2 was characterized by the presence of dead cells floating in clusters and could potentially be correlated with the higher virulence of this lineage. We could expect a relation between viral infectivity and virulence, CPE thus being unique to specific USUV lineages. Cellular and/or viral factors involved in this specific CPE induced by EU2 strains remain to be determined.

Virulence is an adaptive process and the result of interactions between numerous factors, involving both viral and host cell factors. These could include for example tropism, induction of neuronal apoptosis, resistance to interferon, regulation of cytokines and chemokines, induction of matrix metalloproteinase, quasi-species generation, or upregulation of major histocompatibility complex class I expression. It is therefore clear that virulence is a multifactorial process and many aspects need to be studied in order to elucidate viral pathogenicity. For example, the neuroinvasive potential of WNV is strain-dependent, but mainly due to differential strain ability to reach the CNS [43]. In some cases, this difference could also be due to different replication capacities in BBB cells or directly in neurons, as already demonstrated for WNV [59] and Semliki Forest Virus [87]. It is documented that there is a close relationship between European USUV strains (nucleotide identity 99%) while there is a greater divergence between African USUV isolates (nucleotide identity 96%). Several structural and nonstructural genes (prM, E, NS1, NS3, and NS5) have exhibited greater nucleotide than amino acid divergence [72]. The virulence of flaviviruses has often been associated with E protein glycosylation [50] and glycosylation of the NS1 protein [88]. One possible viral factor of virulence is the presence of specific N-linked glycans on the E protein, correlating thus with the ability to invade the CNS [43, 50, 89]. All strains analyzed exhibited classical markers of neurovirulence previously described, which is consistent with the fact that all of our strains are able to invade the brain. Nevertheless, we identified specific mutations in EU2 strain (NS1: E36G, R57X, L85, NS2A: 108 T, NS4B: 133S, K349R, T325X, NS5: 55I, E835D). The discovery of amino acid substitution in the RdRp domain of the NS5 protein (E3425D/E835D-NS5) in both EU2 strains is particularly interesting, as this substitution is not seen in the other strains from other lineages. In addition, by analyzing other EU2 sequences available online, we found this mutation in 14/15 isolates (except for JF 266698). This suggests that this substitution could be a characteristic mutation of EU2 lineage. For instance, this aa change was also found in WNV and in other neurovirulent flaviviruses (JEV, Kunjin virus (KUNV), and Murray Valley encephalitis

virus (MVEV)) and have been suggested to be related with viral neuroinvasiveness [21]. Furthermore, substitutions in virtually equivalent positions were associated with variation in the capacity of WNV to invade the CNS [21] and an E to D substitution in the NS5 protein of TBEV affects the virulence in mice underlying the contribution of viral RdRp to flavivirus neurovirulence [90]. This mutation was previously described in an EU2 strain isolated from a patient with neuroinvasive disease and was suggested to impact the efficiency of viral replication and virulence which our results seem to corroborate. Indeed, NS5 protein may have an effect on the efficiency of viral replication as its codes for the RNA-dependent RNA polymerase involved in the replication complex [21]. Association of these several mutations with virulence remains to be elucidated. For this, reverse genetic systems will be helpful to allow the identification of the molecular and cellular mechanisms involved in USUV pathogenicity.

There is a strong probability that the strains used in this study were not derived due to extensive passaging (no more than 5 passages for all strains), so altogether our data indicate that there are intrinsic differences in the pathogenicity/virulence of USUV isolates in vivo and in vitro as previously described for other flaviviruses, such as ZIKV and WNV [41, 42]. Recent studies in rodents [91], immunocompetent mice [92], and chicken embryos [93] also demonstrate different results depending on the strain used. Is should be noted that no difference of mortality was reported in chicken embryos infected with several USUV strains [93]. This difference can be related to many factors (such as inoculation sites, number of viral passages, difference in models (birds versus mammals, embryos versus neonatal animals…). For this reason, it is important to investigate whether the differences in virulence observed in our models have clinical relevance. As reported in the literature, neurological complications are mainly described after infection with an EU2 strain, which is also a lineage frequently circulating in the south of Europe. It can consequently be hypothesized that the USUV EU2 lineage, characterized by a higher infection and viral production, longer persistence, and induction of an atypical CPE, could be more pathogenic for humans and/or birds and likely better adapted to the vector hosts.

Conclusion

In conclusion, our study on the pathogenic properties of USUV strains circulating in Europe contributes to a better understanding of USUV pathogenesis. To define the host and viral factors involved in pathogenesis, the naturally occurring diversity in virulence among viral strains provides a robust model system. Monitoring the global diversity and distribution of circulating USUV strains, as well as characterizing their neurotropism, will aid in the threat assessment and epidemiological modeling if future USUV outbreaks occur.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12974-020-02060-4.

Additional file 1: Supplemental Figure 1. Two USUV EU2 strains induce a specific CPE and persistent viral replication in astrocytes. **Supplemental Figure 2.** Differential CPE in USUV-infected murine microglia and neurons cells. **Supplemental Figure 3.** USUV isolates induces CPE in human endothelial cells with an atypical shape for EU2 while there is no CPE in pericytes.

Abbreviations

AF: Africa; BBB: Blood-brain barrier; BRDU: Bromodeoxyuridine; C: Capsid; CNS: Central nervous system; CPE: Cytopathic effect; DAMPs: Damage-associated molecular patterns; DENV: Dengue virus; Dpi: Days post-infection; E: Envelope; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; EU: Europe; hBLEC: Human Brain-like Endothelial Cells; IFN: Interferon; *Ifnar1*$^{-/-}$: Lacking the interferon type 1 receptor; IL1β: Interleukin 1 β; IL6: Interleukin 6; i.p.: Intraperitoneally; IRF3: Interferon regulatory factor 3; JEV: Japanese encephalitis virus; KUNV: Kunjin virus; LY: Lucifer Yellow; MDA5: Melanoma differentiation-associated antigen 5; MVEV: Murray Valley encephalitis virus; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MYD88: Myeloid differentiation primary response 88; NVU: Neurovascular unit; ORF: Open reading frame; PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns; PFA: Paraformaldehyde; prM/M: Pre-membrane/membrane; PRRs: Pattern recognition receptors; RHEM: Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier; RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I; RT-qPCR: Quantitative reverse transcriptase PCR assay; TBEV: Tick-borne encephalitis virus; TCID50: Tissue culture infectious dose 50%; TEER: Transendothelial electrical resistance; TLR: Toll-like receptor; TNFα: Tumor necrosis factor alpha; USUV: Usutu virus; WNV: West Nile virus; ZIKV: Zika virus

Acknowledgements

We thank the "Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier" (RHEM) histology facility for their histology techniques and expertise, and we thank Morgane Broyon and Aurélie Covinhes for their technical assistance. We thank also the Montpellier Rio Imaging facility for the microscope imaging as well as Elisabetta Blasi and Hélène Hirbec for providing the BV2 microglia cell line.

Authors' contributions

MC, OC, JB, CD, MFM, LM, VF, and FG performed the experiments. LT and FM isolated the Europe 2 viral strains. YS designed the work and drafted the manuscript with MC. SS, PVD, DC, JSC, GS, SL, and GG substantively revised the manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was funded by REACTing (reference: YY/FC/2018-032) and Montpellier University of Excellence (MUSE) through ANR (the French National Research Agency) with the reference ANR-16-IDEX-0006 and the Labex EpiGenMed "Investissements d'avenir", program "ANR-10-LABX-12-01."

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Ethics approval and consent to participate

Mice were bred and maintained according to the European institutional guidelines (appendix A STE n°123) and the French Ministry of Agriculture. Experiments were approved by the French ethics committee (approval N° 6773–201609161356607). The in vitro human BBB model requires the use of human cells obtained from donors. All parents signed an informed consent form, according to the French legislation (CODECOH Number DC2011-1321).

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Author details
[1]Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Université de Montpellier, INSERM, EFS, Montpellier, France. [2]BioCommunication en CardioMétabolique (BC2M), Montpellier University, Montpellier, France. [3]Université de Montpellier, CNRS, Viral Trafficking, Restriction and Innate Signaling, Montpellier, France. [4]Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Haemorrhagic Fever Reference and Research, 20359 Hamburg, Germany. [5]OIE Reference Centre for West Nile Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale", 46100 Teramo, Italy. [6]Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences, Universität Hamburg, 20148 Hamburg, Germany. [7]Department of Biotechnology, INIA, Madrid, Spain. [8]UPE, Anses Animal Health Laboratory, UMR1161 Virology, INRA, Anses, ENVA, Maisons-Alfort, France. [9]Blood-Brain Barrier Laboratory (BBB Lab), University of Artois, UR2465, F-62300 Lens, France. [10]Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France.

Received: 18 August 2020 Accepted: 11 December 2020
Published online: 06 January 2021

References

1. McIntosh BM. Usutu (SAAr 1776); nouvel arbovirus du groupe B. Int Cat Arboviruses. 1985;3:1059–60.
2. Woodall J. The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending December 1963. In: Proc E Afrc Acad; 1964. p. 141–6.
3. Calisher CH, Gould EA. Taxonomy of the virus family Flaviviridae. Adv Virus Res. 2003;59:1–19.
4. Poidinger M, Hall RA, Mackenzie JS. Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the Flavivirus genus. Virology. 1996; 218:417–21.
5. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. Emerg Infect Dis. 2002; 8(7):652–6.
6. Chvala S, Kolodziejek J, Nowotny N, Weissenböck H. Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. J Comp Pathol. 2004;131(2-3):176–85.
7. Becker N, Jöst H, Ziegler U, Eiden M, Höper D, Emmerich P, et al. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. PLoS One. 2012;7(2):e32604.
8. Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csörgo T, Lussy H, et al. Emergence of usutu virus in Hungary. J Clin Microbiol. 2007;45:3870–4.
9. Calzolari M, Gaibani P, Bellini R, Defilippo F, Pierro A, Albieri A, et al. Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. Coffey LL, editor. PLoS One. 2012;7: e38058 Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666446. Cited 2018 Nov 20.
10. Bakonyi T, Gould EA, Kolodziejek J, Weissenböck H, Nowotny N. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and other flaviviruses. Virology. 2004;328(2):301–10.
11. Pfeffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. Parasit Vectors. 2010;3(1):35 BioMed Central.
12. Decors A, Beck C, Lemberger K, Eraud C, Desvaux S, Chaigneau P, Baurier F, Blanchard Y, Lecollinet S. 2018, en France : record de circulation du virus Usutu. Faune Sauvage. 2019;324:9-14.
13. Lelli R, Savini G, Teodori L, Filipponi G, Di Gennaro A, Leone A, et al. Serological evidence of USUTU virus occurrence in north-eastern Italy. Zoonoses Public Health. 2008;55(7):361–7.
14. Cadar D, Becker N, de Mendonca Campos R, Börstler J, Jöst H, Schmidt-Chanasit J. Usutu virus in bats, Germany, 2013. Emerg Infect Dis. 2014;20(10): 1771–3.
15. Blázquez AB, Escribano-Romero E, Martín-Acebes MA, Petrovic T, Saiz JC. Limited susceptibility of mice to Usutu virus (USUV) infection and induction of flavivirus cross-protective immunity. Virology. 2015;482:67–71 Elsevier Inc.
16. Durand B, Haskouri H, Lowenski S, Vachiery N, Beck C, Lecollinet S. Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? Epidemiol Infect. 2016;144:1857–64 Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S095026881600011X. Cited 2018 Aug 18.
17. Bournez L, Umhang G, Faure E, Boucher J-M, Boué F, Jourdain E, et al. Exposure of wild ungulates to the Usutu and tick-borne encephalitis viruses in France in 2009-2014: evidence of undetected Flavivirus circulation a decade ago. Viruses. 2020;12:10 Available from: www.mdpi.com/journal/viruses. Cited 2020 May 20.
18. Nikolay B, Diallo M, Boye CSB, Sall AA. Usutu virus in Africa. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2011;11:1417–23 Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21767160. Cited 2018 Mar 8.
19. Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grottola A, Sabbatini AMT, Tagliazucchi S. Rapid communications first human case of Usutu virus neuro invasive infection, Italy, August - September 2009; 2009. p. 5–6.
20. Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P, et al. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotropic liver transplantation, Italy, August-September 2009. Euro Surveill. 2009:14 Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/20070935/?i=3&from=cavrini 2009 eurosurveillance. Cited 2018 Apr 2.
21. Gaibani P, Cavrini F, Gould EA, Rossini G, Pierro A, Landini MP, et al. Comparative genomic and phylogenetic analysis of the first Usutu virus isolate from a human patient presenting with neurological symptoms. PLoS One. 2013;8(5):e64761.
22. Cavrini F, Della Pepa ME, Gaibani P, Pierro AM, Rossini G, Landini MP, et al. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. J Clin Virol. 2011;50:221–3 Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653210004592. Cited 2018 Apr 2.
23. Grottola A, Marcacci M, Tagliazucchi S, Gennari W, Di Gennaro A, Orsini M, et al. Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. Clin Microbiol Infect. 2017;23:33–7.
24. Caracciolo I, Mora-Cardenas E, Aloise C, Carletti T, Segat L, Burali MS, et al. Comprehensive response to Usutu virus following first isolation in blood donors in the Friuli Venezia Giulia region of Italy: development of recombinant NS1-based serology and sensitivity to antiviral drugs. PLoS Negl Trop Dis. 2020; 14:e0008156 Public Library of Science. Bowen RA, editor. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0008156. Cited 2020 May 18.
25. Percivalle E, Cassaniti I, Sarasini A, Rovida F, Adzasehoun KMG, Colombini I, et al. West nile or usutu virus? A three-year follow-up of humoral and cellular response in a group of asymptomatic blood donors. Viruses. 2020; 12(2):157 MDPI AG.
26. Carletti F, Colavita F, Rovida F, Percivalle E, Baldanti F, Ricci I, et al. Expanding usutu virus circulation in italy: detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. Euro Surveill. 2019;24(3):1800649 European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).
27. Pacenti M, Sinigaglia A, Martello T, De Rui E, Franchin E, Pagni S, et al. Clinical and virological findings in patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018. Euro Surveill. 2019;24 Available from: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900180. Cited 2019 Nov 28.
28. Nagy A, Mezei E, Nagy O, Bakonyi T, Csonka N, Kaposi M, et al. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. Euro Surveill. 2019;24(28):1900038 European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC).
29. Santini M, Vilibic-Cavlek T, Barsic B, Barbic L, Savic V, Stevanovic V, et al. First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August, September 2013: clinical and laboratory features. J Neurovirol. 2014;21:92–7.
30. Vilibic-Cavlek T, Savic V, Sabadi D, Peric L, Barbic L, Klobucar A, et al. Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the 'One health' context, 2018. Transbound Emerg Dis. 2019;66:1946–57 Blackwell Publishing Ltd.
31. Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, Gutierrez S, Gil P, Constant O, et al. Human Usutu virus infection with atypical neurologic presentation, Montpellier, France, 2016. Emerg Infect Dis. 2018;24 Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/5/17-1122_article.htm. Cited 2018 Apr 5.
32. Bakonyi T, Jungbauer C, Aberle SW, Kolodziejek J, Dimmel K, Stiasny K, et al. Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – raising awareness for diagnostic challenges. Euro Surveill. 2017;22(41):17–00644.

33. Aberle SW, Kolodziejek J, Jungbauer C, Stiasny K, Aberle JH, Zoufaly A, et al. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. Euro Surveill. 2018;23:1800545 Available from: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545. Cited 2018 Nov 1.
34. Cadar D, Maier P, Müller S, Kress J, Chudy M, Bialonski A, et al. Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. Euro Surveill. 2017;22:30501 Available from: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22764. Cited 2018 Apr 2.
35. Domanović D, Gossner CM, Lieshout-Krikke R, Mayr W, Baroti-Toth K, Dobrota AM, et al. West nile and usutu virus infections and challenges to blood safety in the European Union. Emerg Infect Dis. 2019;25:1050–7 Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
36. Zaaijer HL, Slot E, Molier M, Reusken CBEM, Koppelman MHGM. Usutu virus infection in Dutch blood donors. Transfusion. 2019;59:2931–7 Blackwell Publishing Inc.
37. Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, et al. Usutu virus: a new threat? Epidemiol Infect. 2019;147:e232 Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31364580. Cited 2019 Aug 29.
38. Cadar D, Lühken R, van der Jeugd H, Garigliany M, Ziegler U, Keller M, et al. Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, Western Europe, 2016. Euro Surveill. 2017;22(4):30452.
39. Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, Barbic L, Tabain I, Stevanovic V, et al. Epidemiology of usutu virus: the european scenario. Pathogens. 2020:1–19 MDPI AG. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32858963/. Cited 2020 Nov 13.
40. Nikolay B, Dupressoir A, Firth C, Faye O, Boye CS, Diallo M, et al. Comparative full length genome sequence analysis of Usutu virus isolates from Africa. Virol J. 2013;10:1 Available from: Virology Journal.
41. Pérez-Ramírez E, Llorente F, Del Amo J, Fall G, Sall AA, Lubisi A, et al. Pathogenicity evaluation of twelve West Nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: discrimination between three pathogenicity categories. J Gen Virol. 2017;98:662–70 Microbiology Society.
42. Simonin Y, van Riel D, Van de Perre P, Rockx B, Salinas S. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0005821 Rico-Hesse R, editor. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28934211. Cited 2018 Feb 21.
43. Beasley DWC, Li L, Suderman MT, Barrett ADT. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. Virology. 2002;296:17–23 Academic Press. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682202913723. Cited 2016 Jul 8.
44. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol. 1931;162:480–3 Springer-Verlag.
45. Clé M, Barthelemy J, Desmetz C, Foulongne V, Lapeyre L, Bolloré K, et al. Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14:e0008223 Public Library of Science (PLoS).
46. Nikolay B, Weidmann M, Dupressoir A, Faye O, Boye CS, Diallo M, et al. Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. J Virol Methods. 2014;197:51–4 Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093413003868. Cited 2018 Apr 2.
47. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus. J Neuroimmunol. 1990;27:229–37 Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2110186/. Cited 2020 Jun 23.
48. Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, et al. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. PLoS One. 2014;9(6):e99733 Public Library of Science.
49. Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, et al. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. Brain Res. 2015;1594:15–26 Elsevier.
50. Carbaugh DL, Lazear HM. Flavivirus envelope protein glycosylation: impacts on viral infection and pathogenesis; 2020.
51. Morrison TE, Diamond MS. Animal models of Zika virus infection, pathogenesis, and immunity. J Virol. 2017;91 Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28148798. Cited 2019 Sep 13.
52. Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection. Viruses. 2012;4(1):62–82 Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
53. Samuel MA, Diamond MS. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. J Virol. 2005;79:13350–61.
54. Johnson AJ, Roehrig JT. New mouse model for dengue virus vaccine testing. J Virol. 1999;73:783 American Society for Microbiology (ASM).
55. Weissenböck H, Bakonyi T, Chvala S, Nowotny N. Experimental Usutu virus infection of suckling mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination. Acta Neuropathol. 2004;108:453–60.
56. Salinas S, Constant O, Desmetz C, Barthelemy J, Lemaitre J-M, Milhavet O, et al. Deleterious effect of Usutu virus on human neural cells. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11:e0005913 Beasley DWC, editor. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005913. Cited 2018 Feb 21.
57. Ramesh G, Maclean AG, Philipp MT. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. Mediators Inflamm. 2013;2013:20 Hindawi Publishing Corporation.
58. Bhowmick S, Duseja R, Das S, Appaiahgiri MB, Vrati S, Basu A. Induction of IP-10 (CXCL10) in astrocytes following Japanese encephalitis. Neurosci Lett. 2007;414:45–50.
59. Hussmann KL, Samuel MA, Kim KS, Diamond MS, Fredericksen BL. Differential replication of pathogenic and nonpathogenic strains of West Nile virus within astrocytes. J Virol. 2013;87:2814–22 American Society for Microbiology.
60. Bruno V, Copani A, Besong G, Scoto G, Nicoletti F. Neuroprotective activity of chemokines against N-methyl-D-aspartate or β-amyloid-induced toxicity in culture. Eur J Pharmacol. 2000;399:117–21 Elsevier.
61. Nakayama T, Shirane J, Hieshima K, Shibano M, Watanabe M, Jin Z, et al. Novel antiviral activity of chemokines. Virology. 2006;350:484–92 Academic Press.
62. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, et al. Cutting edge: influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. J Immunol. 2007;178:3368–72 The American Association of Immunologists.
63. Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. ALTEX. 2009;26(2):83–94.
64. Michiels C. Endothelial cell functions. J Cell Physiol. 2003;196:430–43 John Wiley & Sons, Ltd. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.10333. Cited 2020 May 26.
65. Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. J Neurosci Res. 1998;53:637–44 John Wiley & Sons, Ltd.
66. Wang K, Wang H, Lou W, Ma L, Li Y, Zhang N, et al. IP-10 promotes blood-brain barrier damage by inducing tumor necrosis factor alpha production in Japanese encephalitis. Front Immunol. 2018;9:1148.
67. Spindler KR, Hsu TH. Viral disruption of the blood-brain barrier. Trends Microbiol. 2012;20:282–90 Elsevier Ltd.
68. Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S, Nerurkar VR. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. Virology. 2010;397:130–8.
69. Wimmer I, Tietz S, Nishihara H, Deutsch U, Sallusto F, Gosselet F, et al. PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation. Front Immunol. 2019;10:711 Frontiers Media S.A.
70. Loureiro JA, Andrade S, Duarte A, Neves AR, Queiroz JF, Nunes C, et al. Resveratrol and grape extract-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of Alzheimer's disease. Molecules. 2017;22(2):277 MDPI AG.
71. Hall RA, Khromykh AA, Mackenzie JM, Scherret JH, Khromykh TI, Mackenzie JS. Loss of dimerisation of the nonstructural Protein NS1 of Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. Virology. 1999;75:66–75.
72. Engel D, Jöst H, Wink M, Börstler J, Bosch S, Garigliany MM, et al. Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. MBio. 2016;7:1–12.
73. De Oliveira Souza IN, Frost PS, França JV, Nascimento-Viana JB, Neris RLS, Freitas L, et al. Acute and chronic neurological consequences of early-life zika virus infection in mice. Sci Transl Med. 2018;10 American Association for the Advancement of Science. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29875203/. Cited 2020 Jun 23.

74. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. Nat Rev Neurol. 2011;7(1):31–40.
75. Kirkman NJ, Libbey JE, Wilcox KS, White HS, Fujinami RS. Innate but not adaptive immune responses contribute to behavioral seizures following viral infection. Epilepsia. 2010;51:454–64 Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19845729/. Cited 2020 Jul 1.
76. Chen C-J, Ou Y-C, Li J-R, Chang C-Y, Pan H-C, Lai C-Y, et al. Infection of pericytes in vitro by Japanese encephalitis virus disrupts the integrity of the endothelial barrier. J Virol. 2014;88:1150–61.
77. Chang CY, Li JR, Chen WY, Ou YC, Lai CY, Hu YH, et al. Disruption of in vitro endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-infected astrocytes. Glia. 2015;63:1915–32 John Wiley and Sons Inc.
78. Bhatt RS, Kothari ST, Gohil DJ, D'Souza M, Chowdhary AS. Novel evidence of microglial immune response in impairment of Dengue infection of CNS. Immunobiology. 2015;220:1170–6 Elsevier GmbH.
79. Harder DR, Zhang C, Gebremedhin D. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. News Physiol Sci. 2002;17:27–31.
80. Rock B, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, et al. Role of microglia in central nervous system infections. Clin Microbiol Rev. 2004;17:942–64.
81. Palus M, Bílý T, Elsterová J, Langhansová H, Salát J, Vancová M, et al. Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. J Gen Virol. 2014;95:2411–26 Microbiology Society.
82. Simonin Y, Loustalot F, Desmetz C, Foulongne V, Constant O, Fournier-Wirth C, et al. Zika virus strains potentially display different infectious profiles in human neural cells. EBioMedicine. 2016;12:161–9 Elsevier B.V.
83. Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. Vaccine. 2013;31(3):461–71.
84. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. Nat Med. 2004;10:1366–73.
85. Morrey JD, Olsen AL, Siddharthan V, Motter NE, Wang H, Taro BS, Chen D, Ruffner D, Hall JO. Increased blood-brain barrier permeability is not a primary determinant for lethality of West Nile virus infection in rodents. J. Gen. Virol. 2008;89:467–7. https://doi.org/10.1099/vir.0.83345-0.
86. Virology DB-IF, 2001 undefined. Flaviviruses. ci.nii.ac.jp. Available from: https://ci.nii.ac.jp/naid/10012861997/. Cited 2020 Jun 23.
87. Fazakerley J. Pathogenesis of Semliki Forest virus encephalitis. Artic J Neurovirol. 2003; Available from: https://www.researchgate.net/publication/10983327. Cited 2020 May 18.
88. Whiteman MC, Wicker JA, Kinney RM, Huang CYH, Solomon T, Barrett ADT. Multiple amino acid changes at the first glycosylation motif in NS1 protein of West Nile virus are necessary for complete attenuation for mouse neuroinvasiveness. Vaccine. 2011;29:9702–10 Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21945257/. Cited 2020 Jun 23.
89. Botha EM, Markotter W, Wolfaardt M, Paweska JT, Swanepoel R, Palacios G, et al. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. Emerg Infect Dis. 2008;14:222–30 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18258114/. Cited 2020 Jun 23.
90. Eyer L, Nougairede A, Uhlířova M, Driouich JS, Zouharova D, Valdes JJ, et al. An E460D substitution in the NS5 protein of tick-borne encephalitis virus confers resistance to the inhibitor galidesivir (BCX4430) and also attenuates the virus for mice. J Virol. 2019;93 American Society for Microbiology. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov//pmc/articles/PMC6675905/?report=abstract. Cited 2020 Nov 12.
91. Diagne M, Ndione M, Di Paola N, Fall G, Bedekelabou A, Sembène P, et al. Usutu virus isolated from rodents in Senegal. Viruses. 2019;11:181 Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30795524. Cited 2019 Feb 25.
92. Benzarti E, Sarlet M, Franssen M, Desmecht D, Schmidt-Chanasit J, Garigliany MM. New insights into the susceptibility of immunocompetent mice to Usutu virus. Viruses. 2020;12(2):189 MDPI AG.
93. Benzarti E, Rivas J, Sarlet M, Franssen M, Moula N, Savini G, et al. Usutu virus infection of embryonated chicken eggs and a chicken embryo-derived primary cell line. Viruses. 2020;12(5):531.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



1.3 Sensibilité de la BHE aux virus WNV et USUV

D'après nos précédents travaux, la lignée Europe 2 de USUV semble donc être la plus neuro-virulente. Et majoritairement, les infections par WNV les plus récentes en Europe ont été attribuées à la lignée 2. Celle-ci, tout comme USUV, a entrainé l'apparition de symptômes neuronaux sévères parfois associés à des décès. Nous avons donc voulu comparer ces 2 lignées virales, proches phylogénétiquement, afin d'approfondir la caractérisation des interactions de ces virus avec la BHE, et de révéler leurs possibles différences qui permettraient d'anticiper des prises en charge pouvant être différentes selon les patients.

Nous avons aussi souhaité étudier le rôle des cellules immunes dans l'infection du SNC par USUV et WNV. En effet, comme vu en introduction, ces deux virus sont capables d'interagir avec les cellules immunes en périphérie, et avec la BHE. Si quelques données sont disponibles pour WNV, aucunes n'ont montré une possible interaction entre USUV, la BHE et les cellules immunes, que ce soit dans un contexte de recrutement neuroinflammatoire ou dans un contexte d'accès par le mécanisme de cheval de Troie.

Afin de réaliser cette étude, nous avons donc comparé les caractéristiques de l'infection par USUV et WNV de notre modèle *in vitro* de BHE en analysant la permissivité du modèle, les effets sur l'intégrité de la barrière et la réponse immune. Celle-ci ayant montré de très fortes concentrations de facteurs inflammatoires, suite à l'infection, dans le compartiment correspondant au compartiment sanguin du modèle de BHE, nous avons donc investigué l'effet de cette inflammation sur les cellules immunes (lymphocytes T, monocytes et DC). Puis l'infection directe de ces cellules immunes, et les effets sur l'expression de facteurs permettant l'interaction avec la BHE ont aussi été traité.

Les deux virus ont montré un fort tropisme pour la BHE puisqu'ils peuvent infecter et se répliquer au sein du modèle. Ceci entraine une dérégulation beaucoup plus importante pour WNV rendant la BHE plus perméable. Dans les deux cas, la réponse immune est soutenue et entraine un recrutement de cellules immunes (de manière un peu plus importante pour WNV). Cependant USUV est capable d'infecter les DC, il entraine une augmentation d'expression de certains facteurs d'interaction cellulaire, et un recrutement important par la BHE, suggérant un mécanisme de cheval de Troie.

En outre, cette étude suggère un rôle DC, première ligne de défense lors de l'infection par un arbovirus, différents pour les deux *Flavivirus* USUV et WNV.

Differential effects of Usutu and West Nile viruses on neuroinflammation, immune cell recruitment and blood-brain barrier integrity

Orianne Constant[a], Ghizlane Maarifi[b], Jonathan Barthelemy[a], Marie-France Martin[b], Bachirou Tinto[a], Giovanni Savini[c], Philippe Van de Perre[a,d], Sébastien Nisole[b], Yannick Simonin[a*], and Sara Salinas[a*#]

[a]*Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, INSERM, University of Montpellier, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France.*

[b]*Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France.*

[c]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZS-Teramo), Teramo, Italy.*

[d]*Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, INSERM, University of Montpellier, Etablissement Français du Sang, CHU Montpellier, Montpellier, France.*

[*]Authors contributed equally

[#]Correspondence: sara.salinas@inserm.fr

Abstract

Neurotropic viruses have been selected throughout evolution for their ability to reach the brain and cause neuropathological disorders. Usutu (USUV) and West-Nile (WNV) viruses are two closely related *Flavivirus* belonging to Japanese encephalitis virus serogroup. Evidence of increased circulation of these two arbovirus now exist in Europe with neurological disorders reported in humans mainly for WNV, despite that the interaction and effects of viral infections on the neurovasculature are poorly described, notably for USUV. Using a human *in vitro* blood-brain barrier (BBB) and a mouse model, this study characterizes and compares the cerebral endothelial cell permissiveness, innate immunity and inflammatory responses and immune cell recruitment during central nervous system (CNS) infection by USUV and WNV. Both viruses are able to infect and cross the human BBB but with different consequences. We observed that WNV infect BBB cells resulting in significant endothelium dysregulation, potent neuroinflammation and immune cell recruitment, in agreement with previous studies. USUV, despite being able to infect BBB cells with higher replication rate than WNV, does not strongly affect endothelium integrity. Importantly, USUV also induces neuroinflammation, immune cell recruitment such lymphocytes T, monocytes and dendritic cells (DCs) and was able to infect dendritic cells (DCs) more efficiently compared to WNV with greater propensity for BBB recruitment. DCs may have differential roles for neuroinvasion of the two related viruses.

Keywords: Usutu virus, West-Nile virus, Blood-brain barrier, Innate immunity, Neuro-inflammation, Leukocytes, Immune cell recruitment

41 **Introduction**

42 Viral neuropathology is most of the time associated with viral access to the central
43 nervous system (CNS) via interaction with brain barriers such as the blood brain barrier (BBB)
44 and the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCSFB) [1,2]. Interactions with brain barriers are
45 crucial for viral access but also induced-pathology as in some cases barrier modulation and
46 dysfunction have deleterious effects on brain homeostasis [3][4]. The BBB is located between
47 neuronal capillaries and the CNS, and is composed of specialized endothelial cells that interact
48 tightly with each other through high expression of tight junction (TJ) proteins, but also of
49 pericytes, astrocytes, microglia and neurons, altogether called the neuro-vascular unit [5].
50 Numerous arboviruses (arthropod-borne viruses) can be associated with neuropathology in
51 humans, triggering severe and long term forms or in some case death [6]. Among them, some
52 members of the Flavivirus family lead to neurological disorders such as Japanese encephalitis
53 virus (JEV), Zika virus (ZIKV), in some cases dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV)
54 and Usutu virus (USUV) [7–10]. Studies on the interaction between human brain endothelial
55 cells and *Flaviviruses* have demonstrated CNS invasion by direct infection of these cells and
56 suggest that the BBB is a key gateway for arbovirus brain infections. For instance, JEV and
57 ZIKV are able to infect cerebral endothelial cells and cross the BBB [11,12].

58 The Trojan horse mechanism have been described for several pathogens, which can
59 productively infect cells of the immune system and relies on their innate properties to access
60 the CNS [13]. Indeed, immune cells play a central role in CNS surveillance and function. A
61 tight balance between responses to infections and the deleterious effects associated with
62 neuroinflammation highlight ambiguous roles of immune cells during virus nervous spread
63 [15]. During CNS inflammation, cytokines and chemokine will promote cellular neuroinvasion
64 through multiple mechanisms, including upregulation of cell adhesion molecules (CAMs) on
65 CNS barriers that will allow cell attachment and transmigration [16]. Hijacking of such

66 mechanisms has been found for various neurotropic pathogens including some arbovirus such
67 as WNV [2,17]. WNV and USUV are closely related and found associated with severe
68 neurological symptoms [10,18]. As many others arbovirus, WNV and USUV have emerged
69 from Africa and expanded to Europe where they become endemic. Indeed, they share a similar
70 enzootic cycle involving birds as reservoirs and mainly *Culex* mosquitoes as vectors [19]. The
71 risk of human epidemic is also increasing and lot of efforts are doing to investigate virus
72 distribution and molecular characteristics [22,23]. Neurological disorders associated to human
73 USUV and WNV infections are caused by efficient viral neurotropism. Indeed, human cases
74 of USUV and WNV infections have been associated to neuronal impairments such as
75 meningitis, encephalitis, meningoencephalitis, acute flaccid paralysis or Guillain-Barré
76 syndrome. It can be noted that these manifestations are most of the time associated to USUV
77 Europe 2 strain and WNV lineage 2 [18]. Notably, we have previously showed that the Europe
78 2 strain of USUV was the most neurovirulent *in vitro* and *in vivo* among 6 USUV lineages [24].

79 While both viruses have been found to infect brain cells including neurons and glia, the
80 mechanisms behind CNS entry have been mainly described for WNV. Indeed, WNV can infect
81 directly BBB endothelial cells or use infected-monocytes to reach the CNS [25–29]. Moreover,
82 the presence of WNV and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in the blood can
83 also lead to BBB dysregulation with a decrease of TJ protein expression and viral transcytosis
84 across the BBB [30]. However, little is known regarding how USUV access to the CNS.
85 Interestingly, studies suggests that monocytes and dendritic cells (DCs) are differentially
86 targeted by USUV and WNV during initial infection at the dermal site [31]. Whether this class
87 of cells or their infected status could play a different role in CNS invasion of both viruses
88 remained to be tested.

89 Here, we compared neuroinvasion and neuroinflammation capacities of these two
90 flaviviruses by analyzing USUV and WNV infection rates, inflammatory responses and the
91 role of monocytes and DCs in virus-BBB interaction.

92 **Materials and methods**

93 ***Cell culture and antibodies***

94 C6/36 cells (Aedes albopictus cells, ATCC CRL-1660) were maintained at 28°C in Roswell
95 Park Memorial Institute culture medium (RPMI, from Eurobio) supplemented with 10 or 2%
96 of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100µg/mL streptomycin and 100 U penicillin.
97 Vero cells (African green monkey kidney cells, ATCC, USA) were maintained at 37°C with
98 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, from PanBiotech) supplemented
99 with 10 or 2% of heat-inactivated FBS, 100µg/mL streptomycin and 100 U penicillin. Human
100 brain microvascular endothelial cells (CECs, catalog #1000, ScienCell) were maintained on
101 fibronectin-coated plates according to manufacturer's instructions and used between passage 2
102 and 4. T cells, monocytes and monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) were obtained from
103 FICOLL purified PBMC using standard protocols.
104 For this study, anti-E-selectin (BBA1, R&D systems); anti-ICAM-1 (BBA3, R&D systems);
105 anti-pan-flavivirus (clone 4G2, MAB10216; Millipore); anti-VCAM-1 (BBA5, R&D systems);
106 anti-ZO-1 (617300; Invitrogen); anti-β-catenin (clone E247, Abcam); HLA-DR-APC, CD80-
107 PE, CD83-FITC and DC-SIGN-PE (Miltenyi), Hoescht (from Sigma) and ActinGreen
108 (R37110, Thermo Fisher Scientific) were used.
109 ***Viral strains***
110 Usutu Europe 2 strain (TE20421/Italy/2017) was provided from Instituto Zooprofilattico
111 Sperimentale, Emilia Romagna (Italy) and West-Nile lineage 2 (WNV-3125/France/2018) was
112 provided by ANSES (National Agency for Food, Environment and Occupational Health
113 Safety, France). These strains were amplified in limit of four times on Vero cells by infecting
114 70% confluent cells and collecting supernatants between 5 and 7dpi. Viral titers were
115 determined using Spearman-Kärber method and were expressed as 50% tissue culture infective
116 dose per milliliter (TCID50/mL) [32]. Infections were done on cells at sub confluence by

adding viral or mock-infected inoculum in a small volume of medium during 2 hours (h) at 37°C under agitation before removing inoculum and adding fresh medium.

In vitro human-BBB model

Human umbilical cord bloods were collected after infant's parents signed consent form in compliance with French legislation. From these and following previously published protocol [12,33]. $CD34^+$ blood-derived endothelial cells were cultured on matrigel-coated transwell filters (Costar, 0.4 µm). These cells were placed on top of bovine brain pericytes during 5 to 7 days allowing differentiation to hBLECs that achieved human BBB characteristics as tight-junction proteins and transporters expression [34,35]. During this period, medium was changed every 2 days and before experiments the endothelial permeability coefficient (Pe) was measured using the Lucifer Yellow (LY) (Life Technologies, 20 µM). Before and after experiments on the human BBB model, Pe was measured after screening of paracellular passage of LY by fluorescence detection on Tecan SPARK 10M machine (432/538 nm of excitation/emission wavelength settings). Indeed, the small hydrophilic LY molecule shows a very limited cerebral penetration in physiological conditions. With $Pe < 1 \times 10^{-3}$ cm/min, the endothelium was considered impermeable when it was considered to be disturbed with $Pe > 1 \times 10^{-3}$ cm/min [36].

USUV or WNV infection of the model was done at MOI 0.1 or 1 for 2 h in limited volume of media low in sera, then viral or mock-infected inoculum were removed and replaced by fresh culture medium. Supernatants were collected at 4, 7 and 10 days post-infection (dpi); and endothelium permeability was measured at 10dpi. The Spearman-Kärber method was applied to determine viral replication in 4, 7 and 10dpi supernatants in TCID50/mL [32].

For biomolecular analysis, hBLEC's RNA were collected at 4 or 7dpi, whereas for immunofluorescence assays, hBLEC were fixed at 7 or 10dpi, and for inflammatory analysis,

100 µL of supernatants at 7dpi were heat-inactivated by incubation in water bath for 30 min at 58°C.

Human primary cells isolation and differentiation

Buffy coats from healthy donors were obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS, Montpellier, France). PBMCs were isolated by density centrifugation using Lymphoprep medium (STEMCELL Technologies). $CD4^+$ T lymphocytes were isolated using CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec) and maintained for 7 days with the cytokine IL-2. CD14+ monocytes were isolated from PBMCs using CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec) and used for experiments and/ or subsequently differentiated into monocyte-derived dendritic cells (MoDCs). MoDCs were generated by incubating purified monocytes in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 10% FBS, 1% P/S, 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes, 1% non-essential amino-acids, 1 mM sodium pyruvate and cytokines GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, 500 IU/ml) and IL-4 (500 IU/ml), both from Miltenyi Biotec (Cytobox Mo-DC). Immature MoDCs were harvested at day 6 and cell differentiation was estimated by measuring the expression of DC-SIGN, HLA-DR (class II) by flow cytometry.

Flow cytometry

All cells were fixed with 2% PFA for 30 min prior to surface staining with corresponding antibodies (ICAM, VCAM, E-selectin, HLA-DR-APC, CD80-PE, CD83-FITC and DC-SIGN-PE) for 1 h at 4°C diluted in a PBS/1% BSA/0.05% solution. For flow cytometry analysis, acquisitions were done on a Fortessa cytometer (B Becton Dickinson D), data were collected with FACSDiva software (Becton Dickinson) and were processed with FlowJo software (Treestar Inc.).

RT-qPCR analyzes

Cells were lysed using the RLT buffer (Qiagen), RNA were extracted with RNeasy mini-kit (Qiagen) and cDNA were synthesized by reverse transcription (Omniscript reverse transcriptase, Qiagen). Analyses were done on LightCycler 480 real-time PCR instrument (Roche) using GAPDH, HPRT1 or RPL13A to normalize (refer to Supplemental Table 1 for a complete list of primers used).

Immunofluorescence assays

Depending on the cell type, specific fibronectin-coated coverslips or matrigel-coated transwell filters were used. At determined dpi, cells were rinsed in PBS, fixed in 4% PFA and permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS during 5 min at room temperature. For 30 min to 1 hour, a blocking step was done with 2% bovine serum albumin at room temperature, then incubation of primary and secondary antibodies were performed in blocking solution. Cells were finally incubated with Hoechst (Sigma) and assembled in fluorescent mounting medium (Prolongold, Thermo Fisher), then imaged with Zeiss SP85 confocal microscope (40x or 63x 1.4 NA Plan Apochromat oil-immersion objectives).

Multiplex assays

A ProcartaPlex Mouse Cytokine and Chemokine Convenience Panel 1A 36-plex and a ProcartaPlex Human Inflammation Panel 20-plex (Thermo Fisher Scientific) were used according to manufacturer's procedure to quantify mouse and human inflammatory factors in mouse sera and human BBB supernatants. Records were done with Luminex apparatus (MAGPIX; Thermo Fisher Scientific) and analyzed on Prism software (Graphpad Prism 8).

Leukocyte binding assay

Immune cells were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) according to manufacturer's instructions (C34554, Invitrogen) then adding on hBLECs for 30 min. After binding, cells were rinsed in PBS, transwell filters fixed in 4% PFA and immunofluorescence

assays were performed. Then, the immune cell count of ten different observatory area, for each experiment, was determined.

Mouse experiments

Adult *Ifnar*$^{-/-}$ provided by Mireia Pelegrin from Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy (IRMB) were bred and maintained in biosafety level 3 (BSL-3) animal facility according to the French Ministry of Agriculture and European institutional guidelines (appendix A STE no. 123). 10^3 TCID50/ mice of USUV, WNV or equivalent amount of PBS were subdermally injected. When mice presented health deterioration or at defined days post infection, they were euthanized by cervical dislocation, sera were collected and frozen at -80°C, and organs (as brains) were collected, fixed in 4% PFA and cuted with a microtome (3µm sections) at RHEM facilities (Montpellier).

Statistical analysis

A minimum of three independent experiments were analyzed with *t* tests (Student *t* test or unpaired Mann-Whitney) on Prism software (Graphpad Prism 8).

203 **Results**

204 ***Differential sensitivity of the human BBB to USUV and WNV infection***

205 To determine/evaluate the susceptibility of the human BBB to USUV and WNV
206 infection, we took advantage of an *in vitro* BBB model used to study arbovirus-BBB interaction
207 [12]. For this purpose, human $CD34^+$ cord blood-derived hematopoietic stem cells were
208 differentiated into human brain-like endothelial cells (hBLECs) and seeded on culture inserts
209 with brain pericytes for 5 to 7 days to acquire BBB characteristics ([33,37], Figure 1a). To
210 monitor and compare USUV and WNV neuroinvasion and neurovirulence, we used the USUV
211 Europe 2 strain and the WNV lineage 2, as they are commonly reported with important
212 neurological effects in patients [38,39].

213 To evaluate viral replication, we infected hBLEC at multiplicity of infection (MOI) 0.1
214 and collect supernatants at 4, 7 and 10dpi. By using the TCID50/mL method, we observed a
215 higher replication/release of USUV in apical compartment (corresponding to the BBB blood
216 side), as compared with WNV at 4, 7 and 10dpi (Figure 1b). Similarly, USUV was found more
217 rapidly in the basal compartment (corresponding to the BBB CNS side) than WNV, which
218 showed important replication only at 10dpi (Figure 1b). To confirm these data, we used another
219 cell system consisting of primary human cerebral endothelial cells (CEC), which were infected
220 by either USUV or WNV at a MOI of 0.1. At 4dpi, USUV titer was $1x10^3$ TCID50/mL,
221 whereas we observed a titer of $1x10^2$ TCID50/mL for WNV, with a decrease in viral titers at
222 7dpi (Supp. Figure 1a), confirming the permissiveness of this cell type to both viruses.

223 Using multiple approaches, we then assayed the effects of USUV and WNV infections
224 on BBB integrity. We first performed similar experiments at MOI 0.1 and harvested mRNA at
225 7dpi to monitor changes in gene expression of key factors involved in cell-cell interaction
226 regulation (*i.e* TJ and adherens junction factors) and BBB homeostasis (*e.g.* efflux proteins).
227 We could show that the mRNA expression of tight junction proteins was affected by the two

228 viruses, with greater proportion in the case of WNV infection (Figure 1c). The mRNA of ZO-
229 1 and Occludin, two TJ proteins that are key elements of BBB integrity [40,41], were the most
230 affected both in USUV and WNV-infected hBLECs compared to mock-infected controls
231 (Figure 1c). Similarly, the mRNA of P-glycoprotein (an efflux transporter, key for BBB
232 function, P-gp) was found strongly reduced in infected-BBB compared to controls (Figure 1c).
233 Moreover, by imaging hBLEC at 10dpi using confocal microscopy, we were also able to show
234 β-catenin and actin disorganization following WNV infection whereas the BBB structure
235 remained similar to control with USUV infection (Figure 1d). To further determine whether
236 BBB integrity could be impacted by USUV and WNV infection, we evaluated Lucifer Yellow
237 (LY) transport across the BBB model, which can indicate changes in BBB permeability (Figure
238 1e). At 10dpi, the permeability coefficient (Pe) in mock-infected controls was around 0.5-0.6,
239 which corresponds to a "tight" BBB. Significant Pe increases were detected after USUV
240 infection at MOI 0.1 and 1 translating subtle modulation, but still consistent with an
241 impermeable barrier. Notably, higher Pe were observed in WNV-infected BBB at MOI 1
242 indicative of a permeable BBB (Figure 1e).

243 Altogether, these results suggest a differential BBB sensitivity to USUV and WNV
244 infections. USUV infection of hBLECs leads to important viral replication and moderate
245 perturbation of endothelium permeability, whereas WNV infection shows more important
246 perturbation despite a lower replication rate.

247 ***USUV and WNV trigger strong inflammatory responses in infected-human BBB***

248 USUV and WNV infections are generally associated with potent antiviral and
249 inflammatory responses [31]. To monitor the potential differences and/or similarity in BBB
250 infection, we analyzed mRNA and protein expression of key cytokines and chemokines in
251 infected hBBB (MOI 0.1) from hBLECs and supernatants. At 4dpi, we noticed an upregulation
252 of mRNA expression of several pro-inflammatory and anti-viral molecules (Figure 2a). Indeed,

hBBB-WNV infection induced a significant increased expression of interleukins (*IL1β, IL6* and *IL8*), interferon-β (*IFNβ*), *TNFα* and chemokines (*CCL2* and *CCL5*) (Figure 2a). The establishment of this inflammatory and anti-viral state in hBLECs persisted until 7dpi with significant up-regulation of *IL6*, *IFNα* and *β*, *CCL2* and *CCL5* (Figure 2b). Generally, USUV infection induced a similar, albeit less important, mRNA up-regulation than WNV (Figure 2a and b). Both viruses also induced inflammatory and anti-viral response as shown at 4dpi by the significant increased expression of *IL1β, IL6, IL8, IFNβ, CCL2* and *CCL5* in the other endothelial cell model (CEC) (Supp. Figure 1b).

We quantified secreted proteins in hBBB supernatants at 7dpi by a multiplexed approach. In the apical compartment, we measured significant elevated concentration of molecules related to anti-viral response and inflammatory state (Figure 2c and 2d). USUV and WNV infections lead to up-secretion of interleukins that can act on the BBB integrity as IL1α, IL6, TNFα; and up-secretion of chemotaxis factors as GM-CSF, CCL3, CCL4 and CXCL10. In the basolateral compartment, we could detect increased protein expression of IL1α, IL8, IL17a (Figure 2e), and CXCL10 or CCL4 (Figure 2f). However, we did observe some differences and in particular the fact that the response to WNV seems to be stronger overall. The increase of IL4, IL6 and IFNα was significantly more important for WNV, translating a better capacity to induce pro-inflammatory response. Similarly, CXCL10 was more upregulated following WNV infection. In contrast, USUV infection induced significant more important upregulation of CCL2 and IL1α.

Another aspect of the immune response to viral infections is the capacity of infected cells to recruit and interact with immune cells to clear viruses. We found upregulation of ICAM-1 (WNV›USUV) and E-selectin in the apical and basolateral compartments (Figure 2d and 2f). We also monitored CAM mRNA overexpression at 7dpi (Figure 2g, h, i). Notably,

277 USUV and WNV induces the significant upregulation of number of α-integrins (Figure 2g), β-
278 integrins (Figure 2h), and CAM (Figure 2i).

279 Altogether, these data showed an important activation of inflammatory responses by
280 both viruses in the hBBB, with the production of cytokines known to modulate BBB integrity,
281 as well as chemokines and CAMs notably involved in immune cell recruitment that are major
282 actors in neuroinflammation. However, we demonstrated some differences, as a higher
283 inflammation following WNV infection, more induction of CXCL10 and ICAM-1 by WNV,
284 in contrast to the more significant induction of CCL2 by USUV.

285 ***Comparison of systemic and brain inflammation following USUV and WNV infections in***
286 ***vivo***

287 Because we detected differential responses and effects of BBB infection by USUV and
288 WNV, we decided to monitor the systemic and CNS inflammation, as well as the potential
289 effects on key BBB proteins *in vivo*. As immunocompetent mice are poorly infected by USUV
290 and manifest low symptoms [42], mice lacking the interferon *α/β* receptor (*Ifnar*$^{-/-}$) were used
291 to investigate USUV and WNV infections. After appearance of symptoms, mice were
292 euthanized (3 to 4dpi), and infection rate was measured in spleen by RTqPCR (sup. Fig. 2a).
293 First, systemic inflammation following the infection by these viruses was evaluated with a
294 multiplexed ELISA method. We measured important and significant increased concentrations
295 of several inflammatory factors associated to anti-viral responses (Figure 3a). Among them,
296 we found increased concentration of IL1β, IL6, IL10, IL18 or type I and II IFNs (α and γ),
297 TNFα, chemokines such as CCL2 and CXCL10 and the chemoattractant GM-CSF (Figure 3a).
298 Generally, WNV infection led to greater inflammatory response than USUV.

299 Viral genomic RNA were found in the brain of USUV and WNV-infected mice by RT-
300 qPCR analysis (Supplemental. Figure 2a). We then measured in the brain the expression of
301 some key inflammatory factors and observed significant upregulation of *IL1β*, *IFNβ* and *CCL5*

after USUV infection, whereas *IL6*, *TNFα* and *CCL5* were significantly upregulated after WNV infection (Figure 3b). We also detected increased expression of *ICAM1* and *SELE-E* compared to mock-infected animals (Figure 3c). Finally, we monitored the expression of key BBB homeostasis factors and detected in WNV-infected mouse brains significant mRNA downregulation of *ZO-1* and *occludin*, whereas in USUV-infected animals this effect was not seen, suggesting that viral effect on BBB integrity could differ between the two viruses. (Figure 3d).

These *in vivo* results correlated with the previous *in vitro* data showing a more pronounced effect of WNV in systemic inflammation and the production of chemoattractants following both infections, which could potentially lead to immune cell recruitment and CNS infiltration.

The inflammatory environment of infected-BBB modulates phenotype of monocytes and DCs

Because we observed a strong inflammatory environment coupled to an increase of molecules modulating circulating immune cells recruitment to the BBB, we decided to analyze the potential effect on this environment on immune cells. We focused on monocytes (Mo) and monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) since they are primary viral targets and major actors of the anti-viral response. We incubated supernatants from the apical compartment (corresponding to the blood side) of USUV- and WNV-infected hBBB at 7dpi with monocytes and MoDCs. After 48h, we fixed and incubated cells with specific antibodies against key actors in immune cells activation and differentiation that expression (Figure 4a). Mo incubated with USUV- or WNV-infected supernatants showed greater expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin. They also showed higher expression of maturation and activation factors, including HLA-DR, CD80, CD83 and DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), suggesting activation and differentiation into DCs (Figure 4b).

MoDCs only showed a modest increased expression of DC-SIGN after 48h of incubation with either USUV- or WNV- infected-BBB supernatants (Figure 4c).

These data indicate potential phenotype change of monocytes and DCs as well as their possible recruitment at the BBB after USUV or WNV infection.

USUV and WNV infected-BBB promotes binding of leukocytes

Since USUV- and WNV-infected-BBB displayed upregulation of inflammatory, chemotaxis and cell interaction factors, we then assessed leukocyte binding on infected-hBBB. At 7dpi, we incubated CFSE-labeled PBMC-purified or -derived human lymphocytes T $CD4^+$ (LyT), monocytes or MoDCs for 30 min. We could observe a significant increase LyT recruitment for USUV- and WNV-infected hBLECs (Figure 5a). Infection also led to significant increase of binding of monocytes (Figure 5b), and MoDCs (Figure 5c). Moreover, recruited MoDC displayed differential morphology after binding to USUV and WNV-infected hBLECs (Figure 5d and 5e). These observations could be consistent with the beginning of transmigration across the infected-BBB.

This set of data confirm that USUV- and WNV-infected hBBB could potentially attract and recruit circulating immune cells during the course of infection. Both viruses led to an increased binding of LyT, monocytes and MoDCs at the BBB, while WNV infection led to significantly more LyT and MoDCs than USUV.

Monocyte and DC infection potentiates hBBB recruitment

CNS transmigration of infected-immune cells, in a process called "Trojan horse" mechanism, has been described for several viruses including WNV, which has been shown to access the brain through infected monocytes [27]. To monitor whether USUV could use similar mechanisms, we analyzed hBLEC binding of USUV and WNV-infected purified human monocytes. Cells were infected for 48h (Supp. Figure 2b) and allowed to bind to hBLEC for 30min (Figure 6a). In this condition, we could detect significant increased binding of both

352 USUV- and WNV-infected monocytes to non-infected hBLEC (Figure 6b), similarly than what
353 we observed for non-infected monocyte binding to infected-hBLECs.

354 Human arboviral infections occur initially at the epidermis or dermal site at the
355 mosquito bite site. At this stage, the first infected-cells can be the local immune cells such as
356 Langerhans and dendritic cells. Therefore, we first measured the response of MoDC to USUV
357 and WNV infections. Cells were infected with USUV and WNV for 48h (Supp. Figure 2a) and
358 mRNA harvested. Cells were incubated for 30 min on hBLEC, rinsed and fixed prior
359 immunofluorescence labeling and imaging. We observed significant higher recruitment of
360 USUV-infected MoDC compared to WNV-infected MoDC (Figure 6c).

361 RT-qPCR analyzes showed that USUV infection leads to the upregulation of mRNA
362 expression of integrins and CAMs in a more pronounced manner than WNV (Figure 6d).
363 Interestingly, DCs have been shown to express some migratory factors and TJ proteins that
364 could facilitate passage across endothelium or epithelium [43]. We therefore monitored
365 whether infection could modulate the expression of such factors. We observed that USUV and
366 WNV infection induced over-expression of CCR7 and tight junction protein (Occludin) (Figure
367 6e) that can facilitate recruitment and transmigration across the BBB.

368 Altogether, this set of data suggest that DCs respond differently during USUV and
369 WNV infections, and interestingly, could represent a CNS entry pathway during USUV
370 infection. USUV infected-MoDCs express integrins, CAM, selectins, chemokine receptor and
371 TJ proteins, that can facilitate the transmigration across endothelia, in contrast to WNV
372 infected-DCs.

373 **Discussion**

374 USUV and WNV are closely related flaviviruses and display several similar
375 epidemiological and molecular features. In particular, CNS infection and impairments are
376 found associated with human infections, with few cases reported for USUV Europe 2 strain in
377 Europe and several thousand cases in America and Europe for WNV lineage 2, which can
378 sometimes prove fatal to patients [21,44]. Both viruses have been shown to target several CNS
379 cell types including neurons, astrocytes and microglia cells. Importantly, viral CNS replication
380 was associated with local inflammatory responses, thought to potentiate and/or exacerbate
381 neurological impairments [48]. Moreover, studies have reported that USUV and WNV showed
382 differences in permissiveness and associated-inflammatory responses during infection of
383 various immune cells. In MoDC and Langerhans cells for instance, USUV replicates more
384 rapidly, possibly due to its greater susceptibility to antiviral response, which forces it to outrun
385 these host defence mechanisms [31]. WNV seems to have developed more resistance
386 mechanisms to counteract immune response [46]. Whether neuroinflammatory responses due
387 to direct (viral) or indirect (immune response) differ between the two viruses is still poorly
388 characterized.

389 ***Viral and immune cell neuroinvasion and neuroinflammation***.

390 Direct infection of brain endothelial cells has been reported for several arboviruses,
391 including ZIKV, WNV and USUV [2,12,24]. The production of known BBB-destabilization
392 factors during brain infection such as TGF-β, TNF-α, IL-6 and IL1-β have been shown to
393 perturb BBB permeability [47]. Here we show that *in vitro*, USUV and WNV infection led to
394 the increased release in both apical and basolateral compartments of the human BBB of IL-6
395 and TNF-α, whereas the genetic modulation of *IL1-β* led also to an upregulation of mRNA
396 expression. *In vivo*, we could also observe increased serum concentration in USUV-infected

397 *Ifnar*$^{-/-}$ mice of IL1-β, IL6 and TNF-α. Similarly that was reported for WNV [48], albeit in a
398 much less marked manner, one can hypothesize that inflammatory molecules produced locally
399 during USUV BBB infection could lead to subtle and restricted BBB integrity modulation.
400 Notably, we report here that USUV led only to a slight modulation of hBBB permeability in a
401 similar manner that what we showed for ZIKV [12]. In this regard, USUV led also to a modest
402 but significant genetic downregulation of TJ factors ZO-1 and Occludin *in vitro*. Therefore,
403 albeit USUV infection of *in vitro* hBBB or *in vivo* led to upregulation of inflammatory and
404 destabilizing BBB factors, as well as modest downregulation of TJ protein, important
405 differences exist between the two related flavivirus regarding the global effect on BBB
406 integrity.

407 Moreover, systemic and CNS inflammation result in an extracellular environment
408 favouring immune cell recruitments to brain barriers, including the BSCFB and BBB [16].
409 Here, we also show that USUV and WNV BBB direct infection led to the release of potent
410 chemoattractants such as CXCL10, CCL5 and CCL2 *in vitro* and *in vivo*. The interaction
411 between immune cells and the apical side of the BBB will trigger downstream signalling that
412 will favour binding, crawling and transmigration. For instance, binding to ICAM-1 will activate
413 upregulation of intracellular calcium and modulation of Rho/ROCK and actin signalling,
414 leading to disruption of inter-cellular junctions [49]. Here, we showed that USUV- and WNV-
415 infected BBB upregulated expression and secretion of ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM,
416 ALCAM but also selectins *in vitro*. These observations then correlated with the increased
417 expression of selected CAM on monocytes and DCs incubated with supernatants from USUV
418 and WNV-infected hBBB and greater leukocyte recruitment that we observed in USUV- and
419 WNV-infected BBB. Whether the differential upregulation of chemokines and CAMs observed
420 in USUV and WNV infections will lead to different type or quantity of immune cell BBB
421 recruitment and CNS infiltration remain to be fully addressed but our *in vitro* results suggest

422 difference correlated with the quantity of chemoattractant and inflammatory factors released
423 (WNV leading to more T lymphocyte, monocyte and DC recruitment) or the direct infection
424 rate of immune cells (higher USUV infection of DCs leading to higher BBB binding).
425 However, even though the general inflammatory response is more potent for WNV than for
426 USUV, some chemokines such as CCL2 are more secreted by the hBBB upon USUV infection.
427 Whether differences in key inflammatory factors will dictate differential neuroinvasion and
428 neuroinfllammation during viral brain infection will need to be demonstrated.

429 ***A focus on monocytes, DC, Trojan horse and brain infections***

430 Numerous studies regarding WNV neuroinfection showed the key role of circulating
431 leukocytes and monocytes, both in favouring CNS access (Trojan horse mechanism, see below)
432 or in protecting against brain infection [50,51]. Most of the studies have been focusing on the
433 role of CD4 and $CD8^+$ T cells but emerging data suggest that monocytes have a key role during
434 the course of the pathology [27,52]. Studies reporting the proliferation of monocytes during
435 WNV infection suggested that this occured prior brain targeting [53]. However, very little is
436 reported regarding the role of DCs during WNV CNS infection or the immune cells involved
437 in USUV-induced cellular infiltration during brain infection. During inflammation, monocytes
438 can be recruited and differentiate in DCs. Studies suggest that BBB interaction, as well as
439 following transmigration may induce monocyte differentiation towards DCs. For instance, in a
440 mouse model of multiple sclerosis, TGF-β and GM-CSF secreted by the BBB have been shown
441 to induce the differentiation of $CD14^+$ BBB-bound monocytes towards $CD83^+CD209^+$ DCs
442 [54]. Interestingly, we found both *in vitro* (hBBB) and *in vivo* (*Ifnar*$^{-/-}$ mice) that GM-CSF
443 concentration was increased upon USUV and WNV infections. Moreover, the local
444 inflammatory environment induced by hBBB USUV and WNV infections led to a change of
445 status of PBMC-derived monocytes, which expressed molecules that sign a differentiation
446 towards DCs. Regarding their role as Trojan horse, infected-monocytes have been proposed to

447 act as viral CNS carriers for several viruses including HIV [55]. Similarly, here we show that
448 USUV-infected human primary monocytes are also preferentially recruited at the hBBB *in*
449 *vitro* and could represent a CNS access platform for this flavivirus.

450 DCs are natural sentinels of the brain, they can also have important role during CNS
451 infection by potentiate T cell responses for example, and they can release pro-inflammatory
452 cytokines participating in detrimental neuroinflammation [15]. In brain disorders, DCs have
453 been found to be correlated with severity of the disease [56]. Under local or systemic
454 inflammatory environment, chemotactic factors such as CCL2 [57] have been shown to favour
455 DC recruitment and lead to their interaction with the BBB through expression of CAMs and
456 their transmigration through the activation of specific adhesion and signalling mechanisms
457 [15]. Interestingly, both the inflammatory environment of USUV- and WNV-infected BBB and
458 the direct infection of DCs by both viruses led to the upregulation of CAMs, in particular DC-
459 SIGN. This was particularly the case for USUV infection. Finally, it was suggested that the
460 expression of some TJ proteins by DCs could facilitate their transmigration across the BBB
461 [43]. These molecules may assist in BBB transcytosis by helping to maintain barrier integrity
462 by forming transient TJ-like structures with surrounding endothelial cells during DC
463 extravasation. For instance, DC subpopulations have been shown to express JAM-A and
464 Occludin, both important cell-cell interaction molecules involved in TJ maintenance [58,59].
465 Notably, USUV- and WNV-infected DCs showed upregulation of JAM-A and Occludin, which
466 could allow facilitated transmigration in a similar mechanism. Because USUV led to a better
467 infection of DCs, the upregulation of molecules involved in binding and transmigration was
468 much more pronounced, which could suggest that this type of immune cells may have a more
469 pronounced role during USUV neuroinvasion than for WNV. Very little data exist regarding
470 their role as a potential Trojan horse. Evidence has shown that infected-DCs could participate
471 in Nipah and Toscana virus infection of CNS [17,60]. Here, we show that USUV-infected DCs

472 are preferentially binding to the human BBB *in vitro*. This could be partially explained by a
473 better permissivity for USUV and subsequent upregulation of key CAMs, favouring BBB
474 binding. DCs may represent a different or more efficient CNS access platform for USUV
475 compared to WNV.

476 **Conclusion**

477 Understanding the mechanisms behind neuroinvasion and associated-
478 neuroinflammation during arbovirus infection is of interest as specific therapeutical approaches
479 are still missing. Identifying key aspects of brain invasion and potential peripheral biomarkers
480 that could predict severe forms is of crucial importance. Moreover, there is a clear need to
481 assess the difference between closely related viruses and different strains or lineages that can
482 prove more or less (neuro)virulent to anticipate potential emergence of variants of concern for
483 public health.

Declarations

Acknowledgements

We are thankful to Mireiga Pelegrin for the *Ifnar*-/- mouse model, Fabien Gosselet from Lens University, Karine Bolloré and all members of PCCEI for advise and help on this project, as well as Nolwen Jouvenet for help with the manuscript. We thank the Montpellier RIOImaging facility and the "Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier" (RHEM) histology facility for their immonufluorescence, histology techniques and expertise.

Disclosure statement

The authors declare no competing interests.

Funding

This work was publicly funded by Agence Nationale de la Recherche, ANR-21-CE15-0041-02; ANR-16-IDEX-0006 and Région Occitanie Pyrénées-Méditerranée, R19068FF.

497 **References**

498 [1] Schwerk C, Tenenbaum T, Kim KS, et al. The choroid plexus—a multi-role player
499 during infectious diseases of the CNS. Front Cell Neurosci. 2015;9:1–11.

500 [2] Mustafá YM, Meuren LM, Coelho SVA, et al. Pathways Exploited by Flaviviruses to
501 Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. Front
502 Microbiol. 2019;10.

503 [3] Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood–brain barrier overview on structure, function,
504 impairment, and biomarkers of integrity. Fluids Barriers CNS. 2020;17:1–24.

505 [4] Tohidpour A, Morgun A V., Boitsova EB, et al. Neuroinflammation and Infection:
506 Molecular Mechanisms Associated with Dysfunction of Neurovascular Unit. Front Cell
507 Infect Microbiol. 2017;7.

508 [5] Schaeffer S, Iadecola C. Revisiting the neurovascular unit. Nat Neurosci. 2021;24:1198–
509 1209.

510 [6] Clé M, Eldin P, Briant L, et al. Neurocognitive impacts of arbovirus infections. J
511 Neuroinflammation. 2020;17:1–14.

512 [7] Hsieh JT, St John AL. Japanese encephalitis virus and its mechanisms of neuroinvasion.
513 PLoS Pathog. 2020;16:1–6.

514 [8] Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, et al. Zika, Chikungunya, and Other Emerging
515 Vector-Borne Viral Diseases. Annu Rev Med. 2018;69:395–408.

516 [9] Debiasi RL. West nile virus neuroinvasive disease. Curr Infect Dis Rep. 2011;13:350–
517 359.

518 [10] Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, et al. Human Usutu virus infection with atypical
519 neurologic presentation, Montpellier, France, 2016. Emerg Infect Dis. 2018;24:875–
520 878.

521 [11] Zou SS, Zou QC, Xiong WJ, et al. Brain Microvascular Endothelial Cell-Derived
522 HMGB1 Facilitates Monocyte Adhesion and Transmigration to Promote JEV
523 Neuroinvasion. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:1–13.

524 [12] Clé M, Desmetz C, Barthelemy J, et al. Zika Virus Infection Promotes Local
525 Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the

526 Blood-Brain Barrier. Diamond MS, editor. MBio. 2020;11.

527 [13] Michalicová A, Bhide K, Bhide M, et al. How viruses infiltrate the central nervous
528 system. Acta Virol. 2017;61:393–400.

529 [14] Buckley MW, McGavern DB. Immune dynamics in the CNS and its barriers during
530 homeostasis and disease*. Immunol Rev. 2022;306:58–75.

531 [15] Constant O, Maarifi G, Blanchet FP, et al. Role of Dendritic Cells in Viral Brain
532 Infections. Front Immunol. 2022;13:1–15.

533 [16] Marchetti L, Engelhardt B. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the
534 absence and presence of neuroinflammation. Vasc Biol. 2020;2:H1–H18.

535 [17] Tiong V, Shu MH, Wong WF, et al. Nipah virus infection of immature dendritic cells
536 increases its transendothelial migration across human brain microvascular endothelial
537 cells. Front Microbiol. 2018;9:1–12.

538 [18] Nagy A, Mezei E, Nagy O, et al. Extraordinary increase in West Nile virus cases and
539 first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. Eurosurveillance.
540 2019;24:1–9.

541 [19] Pfeffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration.
542 Parasit Vectors. 2010;3:35.

543 [20] Michel F, Sieg M, Fischer D, et al. Evidence for West Nile Virus and Usutu Virus
544 Infections in Wild and Resident Birds in Germany, 2017 and 2018. Viruses.
545 2019;11:674.

546 [21] Zannoli S, Sambri V. West nile virus and usutu virus co-circulation in europe:
547 Epidemiology and implications. Microorganisms. 2019;7:1–13.

548 [22] Vilibic-Cavlek T, Savic V, Petrovic T, et al. Emerging Trends in the Epidemiology of
549 West Nile and Usutu Virus Infections in Southern Europe. Front Vet Sci. 2019;6.

550 [23] Constant O, Gil P, Barthelemy J, et al. One Health surveillance of West Nile and Usutu
551 viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in
552 Southern France, 2016 to 2020. Eurosurveillance. 2022;27.

553 [24] Clé M, Constant O, Barthelemy J, et al. Differential neurovirulence of Usutu virus
554 lineages in mice and neuronal cells. J Neuroinflammation. 2021;18:11.

555 [25] Soung A, Klein RS. Viral Encephalitis and Neurologic Diseases: Focus on Astrocytes.
556 Trends Mol Med. 2018;24:950–962.

557 [26] Miner JJ, Daniels BP, Shrestha B, et al. The TAM receptor Mertk protects against
558 neuroinvasive viral infection by maintaining blood-brain barrier integrity. Nat Med.
559 2015;21:1464–1472.

560 [27] Roe K, Orillo B, Verma S. West nile virus-induced cell adhesion molecules on human
561 brain microvascular endothelial cells regulate leukocyte adhesion and modulate
562 permeability of the in vitro blood-brain barrier model. PLoS One. 2014;9:1–12.

563 [28] Roe K, Kumar M, Lum S, et al. West nile virus-induced disruption of the blood-brain
564 barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins
565 and increase in multiple matrix metalloproteinases. J Gen Virol. 2012;93:1193–1203.

566 [29] Verma S, Lo Y, Chapagain M, et al. West Nile virus infection modulates human brain
567 microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules:
568 Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. Virology. 2009;385:425–433.

569 [30] Daniels BP, Holman DW, Cruz-Orengo L, et al. Viral pathogen-associated molecular
570 patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals.
571 Griffin DE, editor. MBio. 2014;5:e01476-14.

572 [31] Martin MF, Maarifi G, Abiven H, et al. Usutu Virus escapes langerin-induced restriction
573 to productively infect human Langerhans cells, unlike West Nile virus. Emerg Microbes
574 Infect. 2022;11:761–774.

575 [32] Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
576 Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol. 1931;162:480–483.

577 [33] Cecchelli R, Aday S, Sevin E, et al. A Stable and Reproducible Human Blood-Brain
578 Barrier Model Derived from Hematopoietic Stem Cells. Klein R, editor. PLoS One.
579 2014;9:e99733.

580 [34] Cecchelli R, Aday S, Sevin E, et al. A stable and reproducible human blood-brain barrier
581 model derived from hematopoietic stem cells. PLoS One. 2014;9.

582 [35] Heymans M, Figueiredo R, Dehouck L, et al. Contribution of brain pericytes in blood-
583 brain barrier formation and maintenance: A transcriptomic study of cocultured human
584 endothelial cells derived from hematopoietic stem cells. Fluids Barriers CNS.

2020;17:1–28.

[36] Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, et al. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. Brain Res. 2015;1594:15–26.

[37] Lyck R, Lécuyer MA, Abadier M, et al. ALCAM (CD166) is involved in extravasation of monocytes rather than T cells across the blood–brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab. 2017;37:2894–2909.

[38] Clé M, Beck C, Salinas S, et al. Usutu virus: A new threat? Epidemiol Infect. 2019;147:e232.

[39] Martin M-F, Simonin Y. West Nile virus historical progression in Europe. Virologie. 2019;23:265–270.

[40] Rochfort KD, Cummins PM. Cytokine-mediated dysregulation of zonula occludens-1 properties in human brain microvascular endothelium. Microvasc Res. 2015;100:48–53.

[41] Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. Biochim Biophys Acta - Biomembr. 2008;1778:660–669.

[42] Benzarti E, Sarlet M, Franssen M, et al. New Insights into the Susceptibility of Immunocompetent Mice to Usutu Virus. Viruses. 2020;12:189.

[43] De Laere M, Berneman ZN, Cools N. To the brain and back: Migratory paths of dendritic cells in multiple sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol. 2018;77:178–192.

[44] Mencattelli G, Ndione MHD, Rosà R, et al. Epidemiology of West Nile virus in Africa: An underestimated threat. Fuehrer H-P, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2022;16:e0010075.

[45] Mastorakos P, Mihelson N, Luby M, et al. Temporally distinct myeloid cell responses mediate damage and repair after cerebrovascular injury. Nat Neurosci. 2021;24:245–258.

[46] Martin M-F, Nisole S. West Nile Virus Restriction in Mosquito and Human Cells: A Virus under Confinement. Vaccines. 2020;8:256.

[47] Erickson MA, Banks WA. Neuroimmune axes of the blood-brain barriers and blood-brain interfaces: Bases for physiological regulation, disease states, and pharmacological

614 interventions. Pharmacol Rev. 2018;70:278–314.

615 [48] Wang T, Town T, Alexopoulou L, et al. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus
616 entry into the brain causing lethal encephalitis. Nat Med. 2004;10:1366–1373.

617 [49] Cernuda-Morollón E, Ridley AJ. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor
618 expression and function in endothelial cells. Circ Res. 2006;98:757–767.

619 [50] Bardina S V., Michlmayr D, Hoffman KW, et al. Differential Roles of Chemokines
620 CCL2 and CCL7 in Monocytosis and Leukocyte Migration during West Nile Virus
621 Infection. J Immunol. 2015;195:4306–4318.

622 [51] Bardina S V., Brown JA, Michlmayr D, et al. Chemokine Receptor Ccr7 Restricts Fatal
623 West Nile Virus Encephalitis. Jung JU, editor. J Virol. 2017;91:1–14.

624 [52] Yewdell JW, Brooke CB. Monocytes, viruses and metaphors: Hanging the Trojan horse.
625 Cell Cycle. 2012;11:1748–1749.

626 [53] Lim JK, Obara CJ, Rivollier A, et al. Chemokine Receptor Ccr2 Is Critical for Monocyte
627 Accumulation and Survival in West Nile Virus Encephalitis. J Immunol. 2011;186:471–
628 478.

629 [54] Ifergan I, Kébir H, Bernard M, et al. The blood-brain barrier induces differentiation of
630 migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. Brain. 2008;131:785–799.

631 [55] Liu Y, Tang XP, McArthur JC, et al. Analysis of human immunodeficiency virus type
632 1 gp160 sequences from a patient with HIV dementia: evidence for monocyte trafficking
633 into brain. J Neurovirol. 2000;6 Suppl 1:S70-81.

634 [56] Ludewig P, Gallizioli M, Urra X, et al. Dendritic cells in brain diseases. Biochim
635 Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2016;1862:352–367.

636 [57] Zozulya AL, Reinke E, Baiu DC, et al. Dendritic Cell Transmigration through Brain
637 Microvessel Endothelium Is Regulated by MIP-1α Chemokine and Matrix
638 Metalloproteinases. J Immunol. 2007;178:520–529.

639 [58] Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, et al. Dendritic cells express tight junction proteins
640 and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol. 2001;2:361–
641 367.

642 [59] Ogasawara N, Kojima T, Go M, et al. Induction of JAM-A during differentiation of

643 human THP-1 dendritic cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009;389:543–549.

644 [60] Cusi MG, Gandolfo C, Terrosi C, et al. Toscana virus infects dendritic and endothelial
645 cells opening the way for the central nervous system. J Neurovirol. 2016;22:307–315.

646

647

Figures

Figure 1: USUV and WNV differentially impact the human BBB integrity in vitro. **a** The human *in vitro* BBB model used in this study is composed of brain pericytes (basolateral compartment) and allowing the differentiation of CD34+-derived endothelial cells towards hBLEC on transwell filters (apical compartment). **b** After infection of hBLECs (MOI of 0.1), supernatants from apical and basolateral compartments were collected at 4, 7 and 10dpi; USUV (blue dots) and WNV (orange dots) replication was determined using the TCID50 method. Results are expressed as mean ± SEM (n=12). **c** At 7dpi, mRNA of mock, USUV or WNV-infected (MOI of 0.1) hBLECs were collected. The expression of tight junction factors and transporters were normalized to housekeeping gene *HPRT1* and compared to mock-infected hBLECs (CTL) in the context of USUV (blue bar chart) and WNV (orange bar chart) infection. Results are expressed as mean ± SEM (n=6; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **d** Infected- or mock-infected hBLECs (MOI of 0.1) were fixed after 10dpi and indirect immunofluorescence assays performed to show hBLECs structure with actin (green), viral replication with pan-flavivirus (magenta), junctions with β-catenin labelling (cyan) and nuclei with Hoescht (blue). Scale bar 10 µm. **e** The permeability coefficient (Pe) was measured using the Lucifer Yellow transport assay at 10dpi with USUV at MOI 0.1 (blue), USUV MOI 1 (dark blue), WNV MOI 0.1 (orange), WNV MOI 1 (dark orange) and mock-infected CTL (black). Bars represent mean ± SEM (n=6; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Figure 2: Characterization of innate immune response and CAM regulation in USUV- and WNV-infected hBLECs. **a, b** After infection of hBLECs (MOI of 0.1), mRNAs were collected at 4 (**a**) or at 7dpi (**b**). Gene expression was normalized to *HPRT1* and compared to mock-infected hBLECs (CTL) in the context of USUV (blue bar chart) and WNV (orange bar chart) infection. Transcripts of a panel of genes were quantified by RT-qPCR. Data of each indicated transcript are represented as mean ± SEM, relative to mock-infected cells (n=6; * $p < 0.05$, **

673 $p < 0.01$). **c, d, e and f** Supernatants from apical (**c and d**) or basolateral (**e and f**) compartments
674 were collected at 7dpi and secreted molecules were measured using a multiplexed ELISA
675 assay. Concentrations of cytokines and interferons (**c and e**) or of chemokines, attractant
676 growth factors and CAMs (**d and f**) for mock-CTL (black dots), USUV (blue dots) and WNV
677 (orange dots)-infected conditions are represented, bars show mean ± SEM (n=6; * $p < 0.05$, **
678 $p < 0.01$). **g, h and i** After infection of hBLECs (MOI of 0.1), mRNAs were collected at 7dpi.
679 Gene expression of α-integrins (**g**), β-integrins (**h**), CAMs and selectins (**i**) were normalized to
680 *RPL13A* and compared to mock-infected hBLECs in the context of USUV (blue bar chart) and
681 WNV (orange bar chart) infections. Results are expressed as mean ± SEM (n=6; * $p < 0.05$, **
682 $p < 0.01$).

683 ***Figure 3: USUV and WNV infection induce different systemic and neuro-inflammation in***
684 ***vivo*** **a** Mice sera were collected at 2 or 3dpi and inflammatory molecules were measured using
685 a multiplexed ELISA assay. Concentrations of cytokines, IFNs, attractant growth factors and
686 chemokines from mock-infected (CTL, black dots, n=15), USUV (blue dots, n=18) and WNV
687 (orange dots, n=14) are represented, bars show mean ± SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p <$
688 0.001, **** $p < 0.0001$**). b, c, and d** After ip infection of *Ifnar*$^{-/-}$ mice, brain mRNAs were
689 extracted and purified. Gene expression of anti-viral and pro-inflammatory (**b**), cell adhesion
690 (**c**) or tight junction (**d**) molecules were normalized to *GAPDH* and compared to control mice
691 brain (CTL) in the context of USUV (blue bar chart) and WNV (orange bar chart) infection.
692 Results are expressed as mean ± SEM (n=6; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

693 ***Figure 4: The inflammatory environment of infected-BBB modulates molecular and***
694 ***functional human primary immune cell phenotype*** **a** Apical supernatants of mock-, USUV-
695 or WNV-infected hBLECs were collected 7dpi, and, after viral inactivation by heating at 56°C,
696 incubated for 48 h with monocytes or MoDCs. Cells were analyzed by flow cytometry for
697 characteristic membrane factors**. b** Surface expression percentage of ICAM, VCAM, E-

698 selectin, HLA-DR, CD80 and CD83 on monocyte. **c** Surface expression percentage of DC-
699 SIGN on MoDC.

700 ***Figure 5: The infected BBB can recruit T cells, monocytes and MoDCs*. a, b and c** After 7
701 dpi of hBLECs, CFSE labelled-T cells (**a**), monocytes (**b**) or MoDCs (**c**) were incubated on the
702 apical side of infected-hBLECs during 30 min, cells were rinsed and fixed to analyze number
703 of immune cells bound. Indirect immunofluorescence images show immune cells (LyT,
704 monocytes and MoDCs, in green) and hBLECs nucleus (magenta). Scale bar 50 µm. Box plots
705 represent quantitative analyses of immune cell per field (20x) in mock-infected CTL, USUV
706 or WNV-infected hBBB (**** $p < 0.0001$). **d** CFSE-labelled MoDCs show cell spreading on
707 infected-hBLECs (ZO-1, cyan; nucleus, blue). Scale bar 10 µm**. e** On WNV-infected BBB
708 (pan-flavivirus in magenta), MoDCs (green) bind to hBLECs (β-catenin, cyan; nucleus, blue)
709 and are displaying change in morphology consistent with cell spreading. Scale bar 10 µm.

710 ***Figure 6: Infected-monocytes and DCs interact with the human BBB*. a** Monocytes and
711 MoDCs were infected with USUV or WNV at MOI 0.1 for 48 h and CFSE-labelled before
712 being added on hBLECs for 30 min. hBLECs were rinsed, fixed, and analyzed by microscopy.
713 **b and c** CFSE labelled- and infected-monocytes (**b**) or MoDCs (**c**) were incubated on hBLECs.
714 Indirect immunofluorescence images show monocytes (in green) and hBLECs nucleus
715 (magenta). Scale bar 50 µm. Box plots represent quantitative analyses of mock-infected CTL
716 and USUV or WNV-infected monocyte numbers per field (20x) (*$p < 0.05$, **** $p < 0.0001$).
717 **d** After 48h of infection, MoDC mRNA were extracted. Gene expression was normalized to
718 *RPL13A* and compared to mock-infected MoDCs (CTL) in the context of USUV (blue bar
719 chart) and WNV (orange bar chart) infection. Results are expressed as mean ± SEM (n=6). **e**
720 After 48h of infection, MoDC mRNA was extracted. Gene expression was normalized to
721 *GAPDH* and compared to mock-infected MoDCs (CTL) in the context of USUV (blue bar

722 chart) and WNV (orange bar chart) infection. Results are expressed as mean ± SEM (n=6).

723

724

725

726

727

728 **Supplemental table**

Human Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
ALCAM	ACTTGACGTACCTCAGAATCTCA	CATCGTCGTACTGCACACTTT
CCL2	CAGCCAGATGCAATCAATGC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
CCL5	ACTGCCCCGTGCCACATCAA	CTGGGTTGGCACACACTTGGCC
CCR5	ATGTGAAGCAAATCGCAGCC	CCAGCATGTTGCCCACAAAA
CCR7	GGCTCAAGACCATGACCGAT	AAAGTGGACACCGAAGACCC
Claudin-5	TTAACAGACGGAATGAAGTT	AAGCGAAATCCTCAGTCT
CXCL10	TATTCCTGCAAGCCAATTTTGTC	TCTTGATCGCCTTCGATTCTG
DC-SIGN	TCCTACAGCTGCAGTCTTCC	ATACTGCTTGAAGCTGGGCA
GAPDH	CATTGACCTCAACTACATGC	GCCATGCCAGTGAGCTTCC
HPRT1	AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC	TTTATAGTCAAGGGCATATCC
ICAM1	GCAGACAGTGACCATCTACAGC	CCTCACACTTCACTGTCACCTC
ICAM2	CGGATGAGAAGGTATTCGAGGT	CACCCACTTCAGGCTGGTTAC
IFNα	TGGCTGTGAAGAAATACTTCCG	TGTTTTCATGTTGGACCAGATG
IFNβ	GTCTCCTCCAAATTGCTCTC	ACAGGAGCTTCTGACACTGA
IL1β	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
IL6	CCAGGAGCCCAGCTATGAAC	CCCAGGGAGAAGGCAACTG
IL8	GGCTCTCTTGGCAGCCTTCCT	TTTGGGGTGGAAAGGTTTGGA
ITGA1	GGCAGCACAATTCATGCACA	GCGGAGCTCCTATCACGATG
ITGA2	ATCATTCTCCCTGCCGGTTG	CCTACATCGCAGGCAACAGA
ITGA3	CATGATTCAGCGCAAGGAGTG	GCCTACCTGCATCGTGTACC
ITGA4	ACTGGACTGGCTCTCTTTTTGT	AATGACCAGCTCCGACTGAA
ITGA5	GGCTTCAACTTAGACGCGGA	CACACTGACCCCGTCTGTTC
ITGA6	AGCTGTGCTTGCTCTACCTG	CCGGGGTCTCCATATTTCCG
ITGA7	CTGTGGCCCTGGACTATGTG	TTACGGCTCAGGAACGTCAC
ITGA8	CACCCTCCGCAGATTGTTCT	CCAATGGTCCAACCTCCTCC
ITGAM	GTCCAGCTTCAGGGATCCAG	TAGTCGCACTGGTAGAGGCT
ITGAV	CGCTTCTTCTCTCGGGACTC	GAAGAAATCCACGGCGAAGC
ITGB1	CCAACCTGATCCTGTGTCCC	ACCATGACCTCGTTGTTCCC
ITGB2	GGTGCGTCCTCTCTCAGGA	GTGAAGTTCAGCTTCTGGCAC
ITGB3	TGCGAGTGTGACGACTTCTC	GTCCAGTCGGAGTCACACAG
ITGB4	TGTCCATCCCCATCATCCCT	CCCGATGGAGAGCGTAGAAC
ITGB5	CGGCTCGCAGGTCTCAAC	GAGCACCAGGCACATTTTGG
ITGB6	CCTGTGGTGACCCCTGTAAC	CCACACATTCTTCTCGGGCT
ITGB7	AGAGTGTGTCCGGCAATCTG	GGGACACATTTCTCCAGCCA
ITGB8	TCCCGTGACTTTCGTCTTGG	GGGGAGGCATGCAGTCTAAA
JAM-A	TATAGCCGAGGCCACTTTGAC	CCAGGAATGACGAGGTCTGTT
MMP2	GAGCTCTATGGGGCCTCTCC	CGTCACAGTCCGCCAAATGA
MMP9	GGGAAGATGCTGCTGTTCA	AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC
Occludin	TTCTGGATCTCTATATGGTTCA	CCACAACACAGTAGTGATAC
PECAM	AACAGTGTTGACATGAAGAGCC	TGTAAAACAGCACGTCATCCTT
P-gp	CAGACAGCAGCTGACAGTCCAAGAACAGGACT	GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATACACAAAATT
PSGL-1	GCCCTGTCCATGGAACCTAC	GACGGACAAATTGCTGGCTG
RPL13A	AACAGCTCATGAGGCTACGG	TGGGTCTTGAGGACCTCTGT
SELE-E	CAGCAAAGGTACACACACCTG	CAGACCCACACATTGTTGACTT
SELE-P	ATGGGTGGGAACCAAAAAGG	GGCTGACGGACTCTTGATGTA
TNFα	CCGAGTGACAAGCCTGTAGA	GAAGGAGACGGTAAAGTTGTTGA
VCAM1	GCCTCTTTCTGAGAATGCAACT	TCCACTTCCTTTCTGCTTCTTC
ZO-1	CCTGAACCAGTATCTGATAA	AATCTTCTCACTCCTTCTG
Mouse Target	**Forward primer (5'-3')**	**Reverse primer (5'-3')**
CCL5	CTGCTTTGCCTACATTGCCC	TCGGGTGACAAAGACGACTG
Claudin-5	GCAAGGTGTATGAATCTGTGCT	GTCAAGGTAACAAAGAGTGCCA
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA
ICAM1	GTGATGCTCAGGTATCCATCCA	CACAGTTCTCAAAGCACAGCG
IFNβ	CTCACCTACAGGGCGGACT	GGCAAAGGCAGTGTAACTCTT
IL1β	TTCAGGCAGGCAGTATCACTC	GAAGGTCCACGGGAAAGACAC
IL6		
Occludin	CTGGATCTATGTACGGCTCACA	TCCACGTAGAGACCAGTACCT
PECAM	ACGCTGGTGCTCTATGCAAG	TCAGTTGCTGCCCATTCATCA
SELE-E	ATGAAGCCAGTGCATACTGTC	CGGTGAATGTTTCAGATTGGAGT
TNFα	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
V-cadherin	CCAACGTGAACCGCCAGAA	GTGTTAGCATCGACCCCGAA
VCAM1	TTCGGTTGTTCTGACGTGTG	TACCACCCCATTGAGGGGAC
ZO-1	GCTTTAGCGAACAGAAGGAGC	TTCATTTTTCCGAGACTTCACCA
Viral Target	**Forward primer (5'-3')**	**Reverse primer (5'-3')**
USUV	AACAGACGGTGATGCGAACT	TACAGCTTCGGAAACGGCTT
729 WNV	AGTTGAGTAGACGGTGCTGC	CTCCTTCCGAGACGGTTCTG

730 **Supplemental figures**

731 ***Supplemental figure 1: Primary human brain endothelial cells (CEC) are also permissive to***
732 ***USUV and WNV infection and trigger innate immune response*****. a** After infection of CEC,
733 supernatants were collected at 4 and 7 days, and virus replication was determined using the
734 TCID50 method (USUV in blue and WNV in orange). Results are expressed as mean ± SEM
735 (n=6). **b** mRNA of CEC were collected at 4 dpi. The fold induction expressions of anti-viral
736 and pro-inflammatory molecules were normalized to HPRT1 and compared to mock-infected
737 ECs (CTL). Results are represented as bar chart (USUV in blue and WNV in orange) and
738 expressed as mean ± SEM (n=6; ** $p < 0.01$).

739 ***Supplemental figure 2: Analyses of viral RNA in infected-mice, Mo and MoDCs*****. a** After
740 RNA extraction from freezed spleen and brain of infected- or CTL mice, RT-qPCR were done
741 to target Usutu or West-Nile viral RNA. Values show interval of cycle quantification for USUV
742 or WNV detection. **b** After RNA extraction from 48 hours infected- or CTL monocytes or
743 MoDCs, RT-qPCR were done to target Usutu or West-Nile viral RNA. Values show interval
744 of cycle quantification for USUV or WNV detection.

745

Figure 1

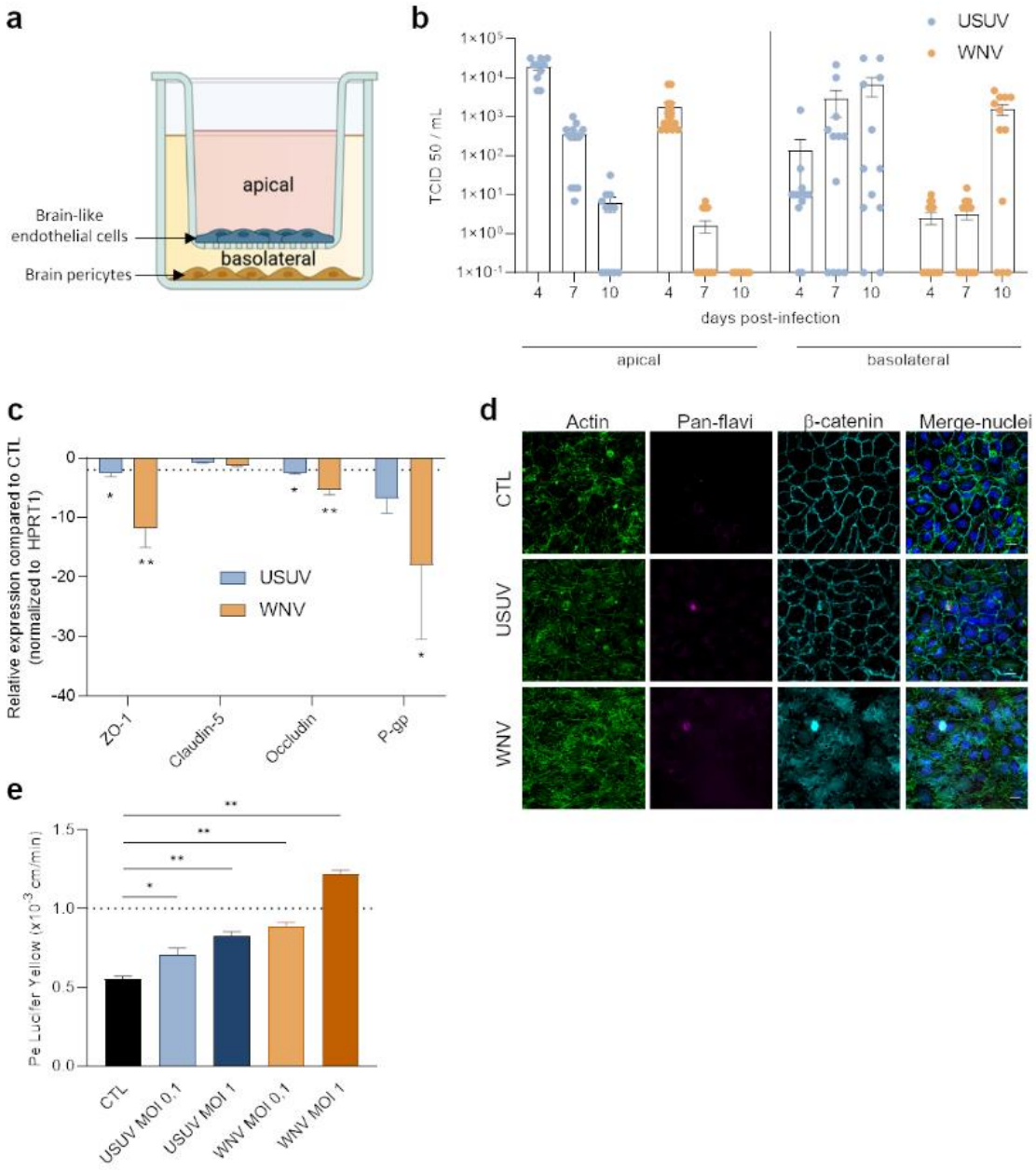

a
apical
Brain-like endothelial cells
basolateral
Brain pericytes
b
USUV
WNV
TCID 50 / mL
days post-infection
apical
basolateral
c
Relative expression compared to CTL (normalized to HPRT1)
USUV
WNV
ZO-1
Claudin-5
Occludin
P-gp
d
Actin
Pan-flavi
β-catenin
Merge-nuclei
CTL
USUV
WNV
e
Pe Lucifer Yellow (x10-3 cm/min)
CTL
USUV MOI 0,1
USUV MOI 1
WNV MOI 0,1
WNV MOI 1

Figure 2

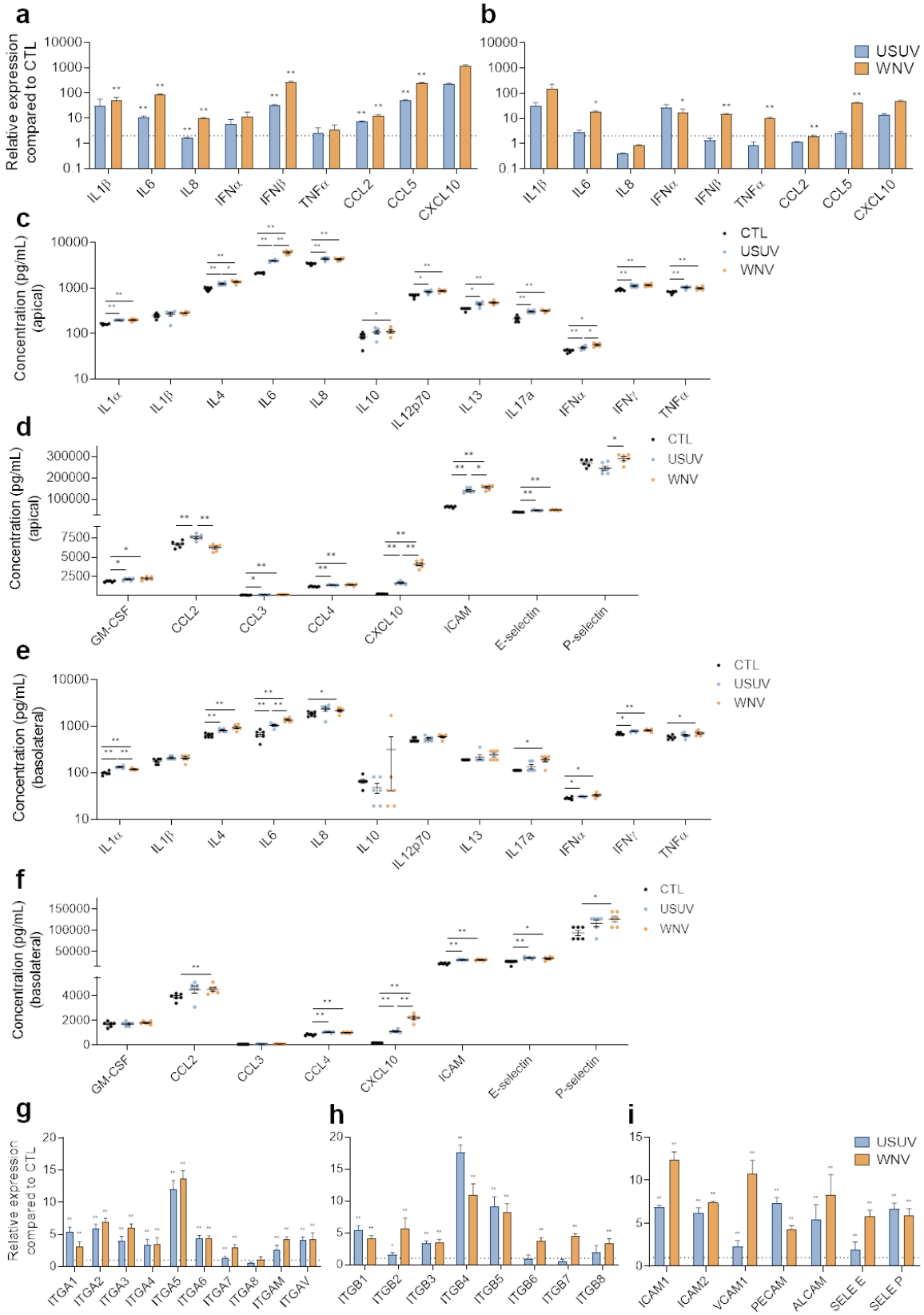

a
b
Relative expression compared to CTL
USUV
WNV
IL1β
IL6
IL8
IFNα
IFNβ
TNFα
CCL2
CCL5
CXCL10
c
Concentration (pg/mL) (apical)
CTL
USUV
WNV
IL1α
IL1β
IL4
IL6
IL8
IL10
IL12p70
IL13
IL17a
IFNα
IFNγ
TNFα
d
Concentration (pg/mL) (apical)
GM-CSF
CCL2
CCL3
CCL4
CXCL10
ICAM
E-selectin
P-selectin
e
Concentration (pg/mL) (basolateral)
f
Concentration (pg/mL) (basolateral)
g
h
i
Relative expression compared to CTL
ITGA1
ITGA2
ITGA3
ITGA4
ITGA5
ITGA6
ITGA7
ITGA8
ITGAM
ITGAV
ITGB1
ITGB2
ITGB3
ITGB4
ITGB5
ITGB6
ITGB7
ITGB8
ICAM1
ICAM2
VCAM1
PECAM
ALCAM
SELE E
SELE P

Figure 3

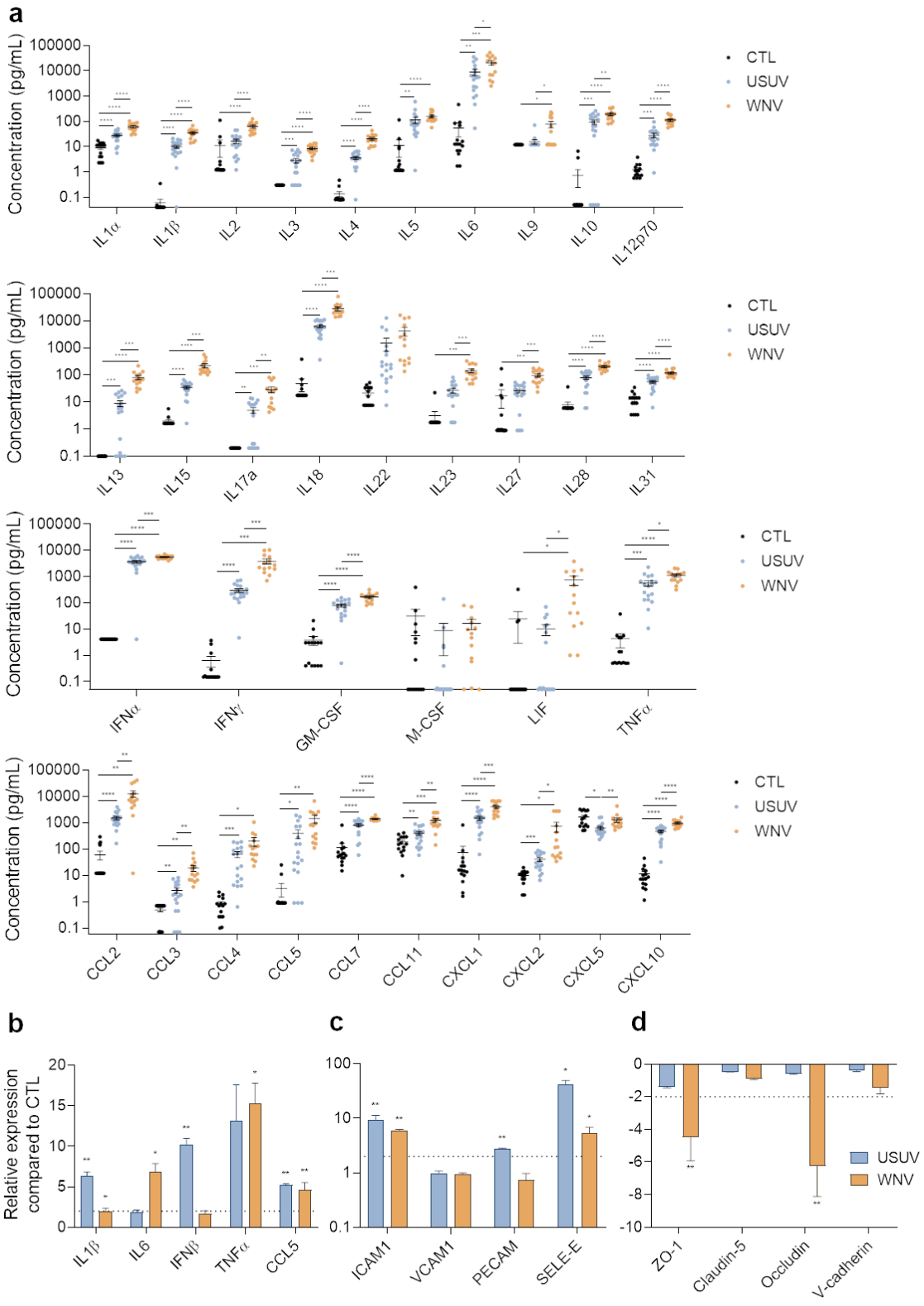

a
Concentration (pg/mL)
CTL
USUV
WNV
IL1α
IL1β
IL2
IL3
IL4
IL5
IL6
IL9
IL10
IL12p70
IL13
IL15
IL17a
IL18
IL22
IL23
IL27
IL28
IL31
IFNα
IFNγ
GM-CSF
M-CSF
LIF
TNFα
CCL2
CCL3
CCL4
CCL5
CCL7
CCL11
CXCL1
CXCL2
CXCL5
CXCL10
b
Relative expression compared to CTL
IL1β
IL6
IFNβ
TNFα
CCL5
c
ICAM1
VCAM1
PECAM
SELE-E
d
USUV
WNV
ZO-1
Claudin-5
Occludin
V-cadherin

Figure 4

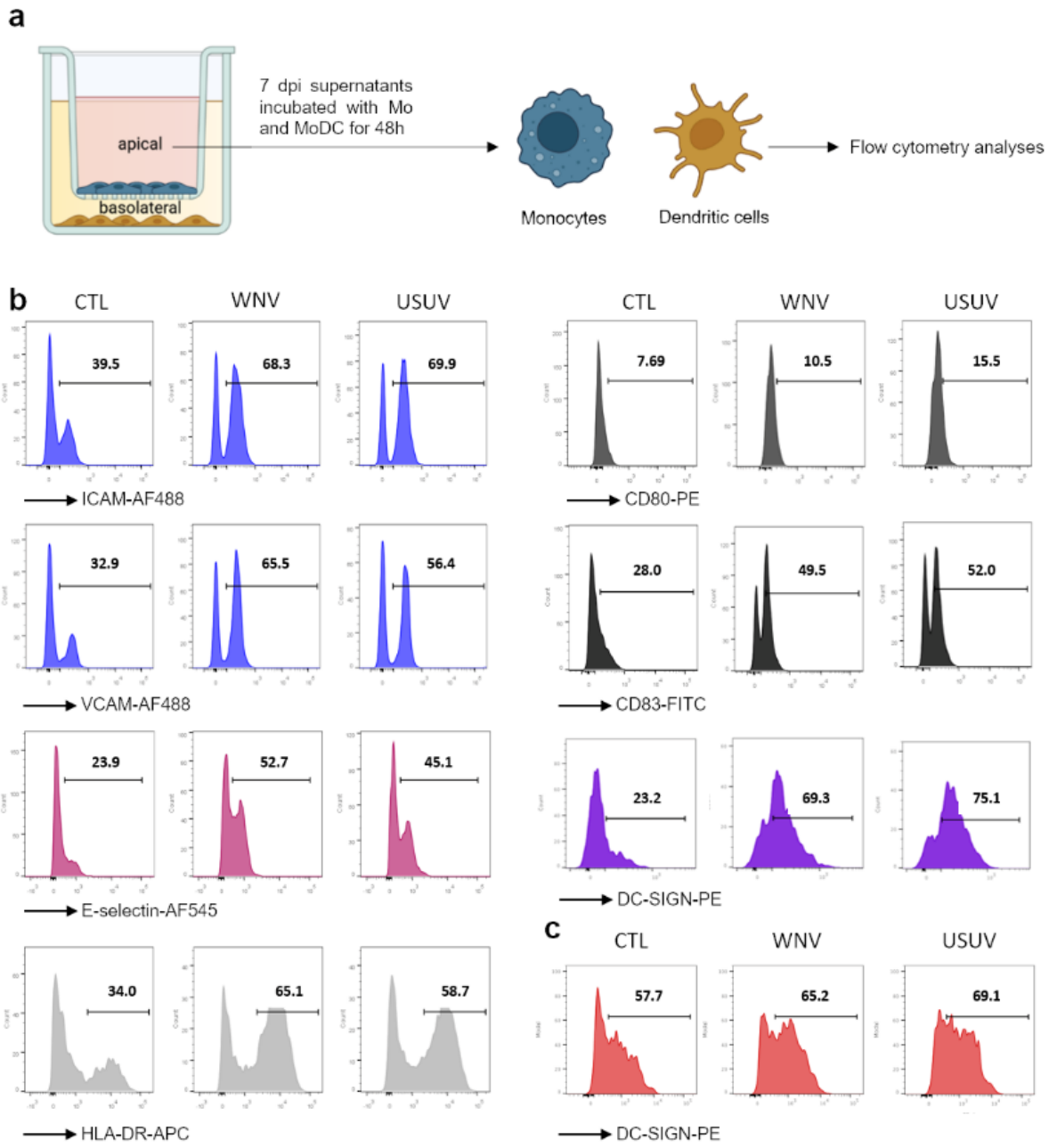

a
apical
basolateral
7 dpi supernatants incubated with Mo and MoDC for 48h
Monocytes
Dendritic cells
Flow cytometry analyses
b
CTL
WNV
USUV
39.5
68.3
69.9
ICAM-AF488
32.9
65.5
56.4
VCAM-AF488
23.9
52.7
45.1
E-selectin-AF545
34.0
65.1
58.7
HLA-DR-APC
7.69
10.5
15.5
CD80-PE
28.0
49.5
52.0
CD83-FITC
23.2
69.3
75.1
DC-SIGN-PE
c
CTL
WNV
USUV
57.7
65.2
69.1
DC-SIGN-PE

Figure 5

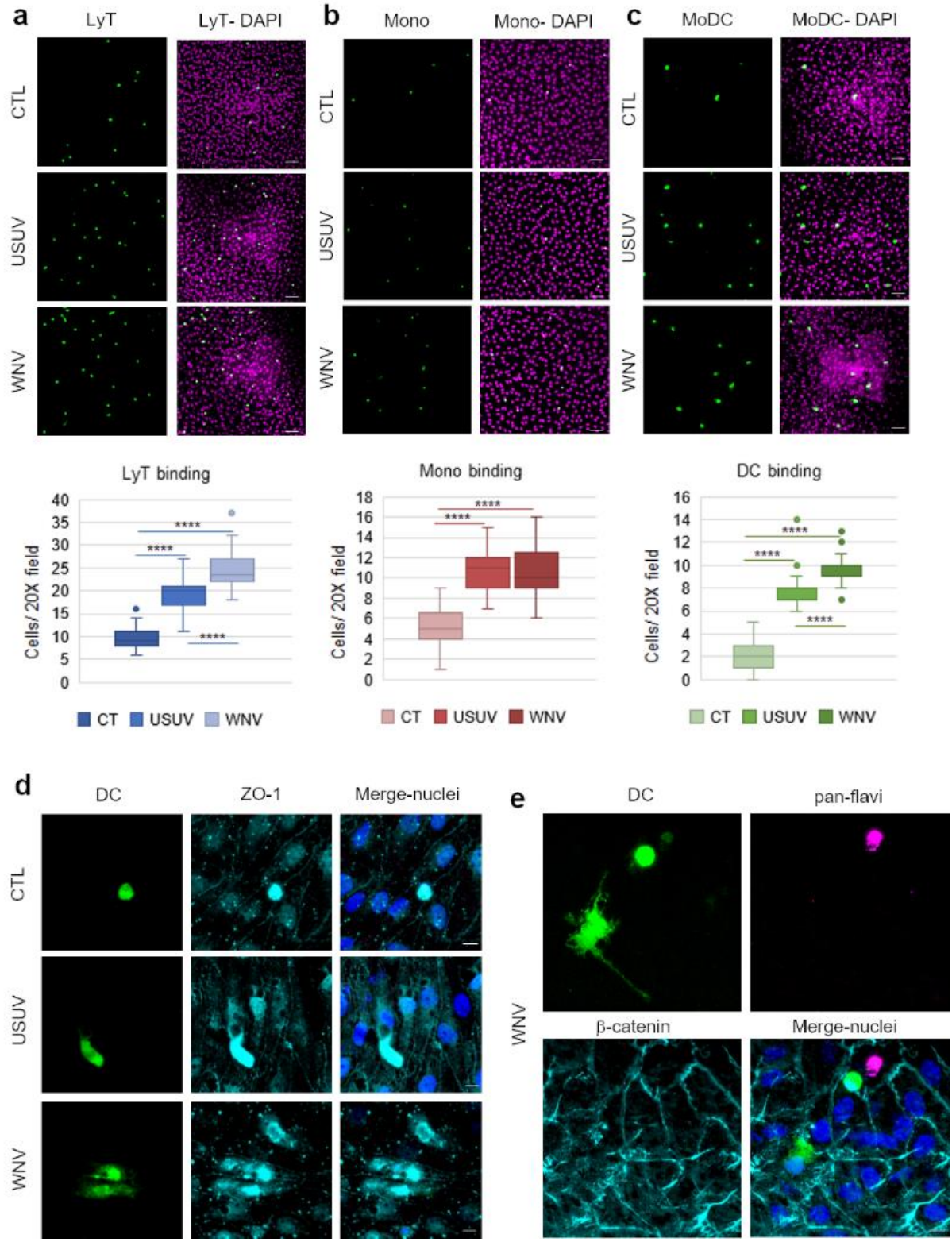

a
LyT
LyT- DAPI
b
Mono
Mono- DAPI
c
MoDC
MoDC- DAPI
CTL
USUV
WNV
LyT binding
Mono binding
DC binding
Cells/ 20X field
CT
USUV
WNV
****
d
DC
ZO-1
Merge-nuclei
e
DC
pan-flavi
β-catenin
Merge-nuclei

Figure 6

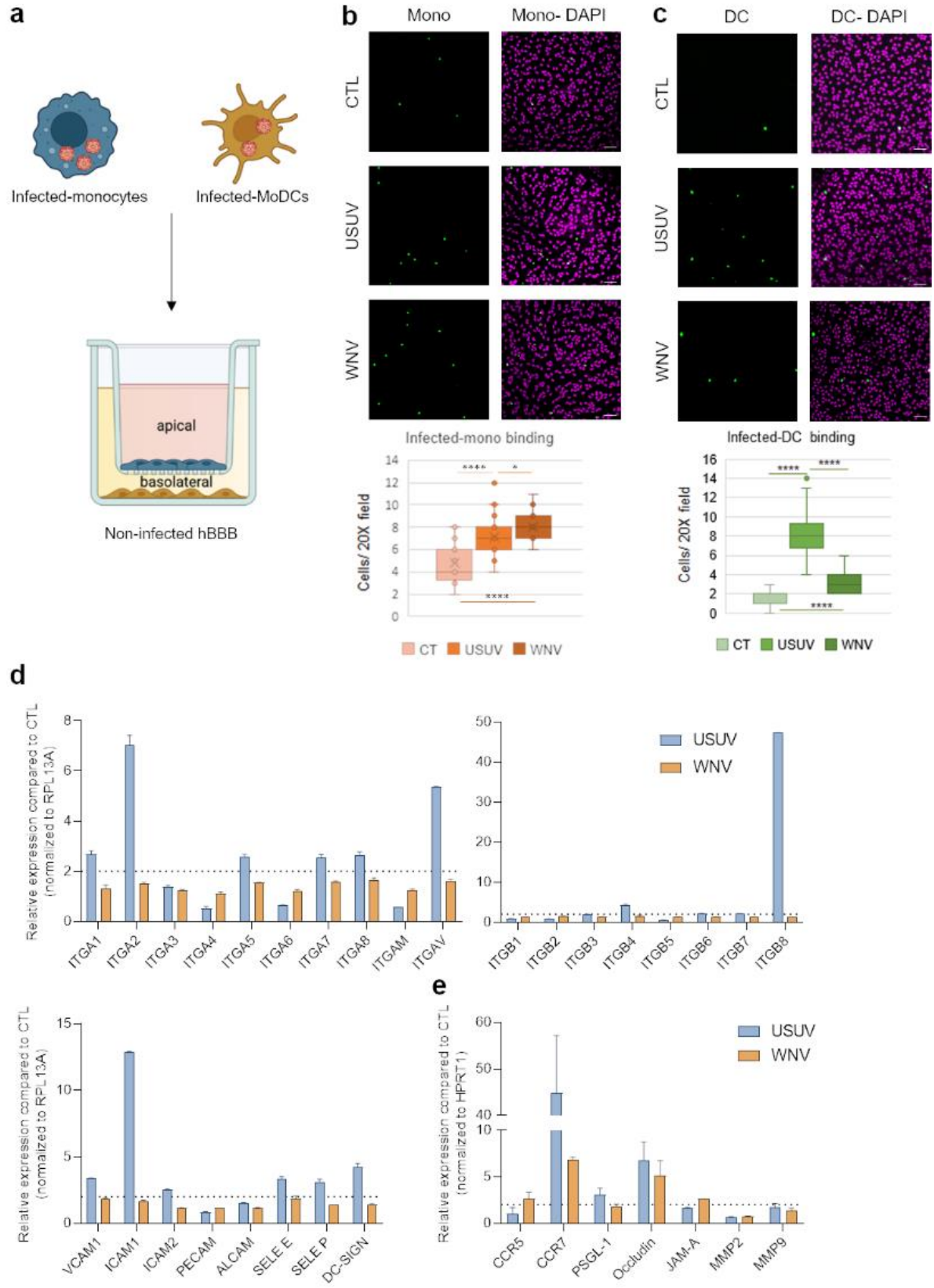

a
Infected-monocytes
Infected-MoDCs
apical
basolateral
Non-infected hBBB
b
Mono
Mono- DAPI
CTL
USUV
WNV
Infected-mono binding
Cells/ 20X field
CT
USUV
WNV
c
DC
DC- DAPI
Infected-DC binding
d
Relative expression compared to CTL (normalized to RPL13A)
ITGA1
ITGA2
ITGA3
ITGA4
ITGA5
ITGA6
ITGA7
ITGA8
ITGAM
ITGAV
ITGB1
ITGB2
ITGB3
ITGB4
ITGB5
ITGB6
ITGB7
ITGB8
e
Relative expression compared to CTL (normalized to HPRT1)
VCAM1
ICAM1
ICAM2
PECAM
ALCAM
SELE E
SELE P
DC-SIGN
CCR5
CCR7
PSGL-1
Occludin
JAM-A
MMP2
MMP9

Figure supplémentaire 1

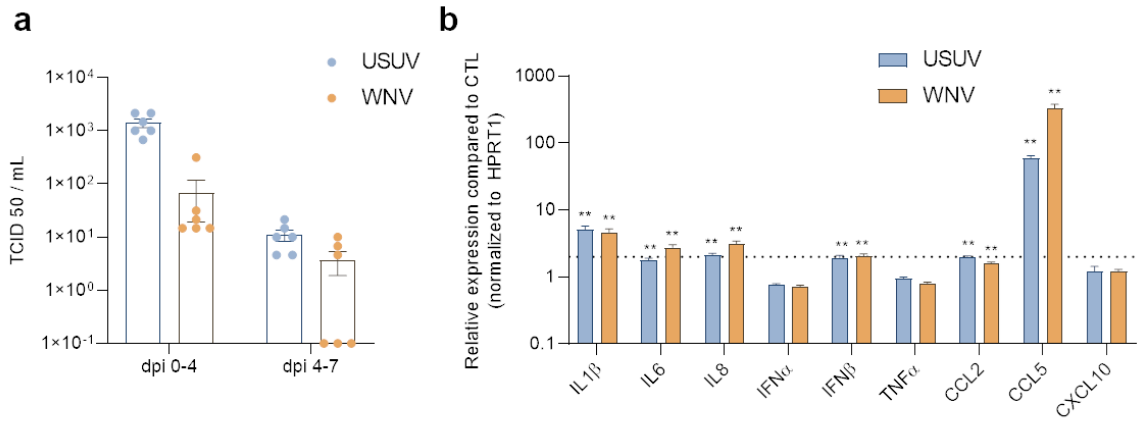


Figure supplémentaire 2

a

Ifnar$^{-/-}$ mice infection 10^3 TCID50

Spleens	Cq values (min-max)
USUV	16.98-19.73
WNV	20.32-23.72
Brains	Cq values (min-max)
USUV	24.3-25.53
WNV	22.85-23.44

b

Cell infection at moi of 0.1 at 48 h

Monocytes	Cq values (min-max)
USUV	28.26-29.97
WNV	23.75-24.74
MoDCs	Cq values (min-max)
USUV	18.92-20.58
WNV	22.18-23.16

2 Neuroinflammation par WNV

La neuroinflammation est un paramètre important dans la prise en charge des infections neuronales. En effet elle peut être à l'origine de complications parfois sur le long terme qui peuvent devenir des problèmes de santé publique importants. De plus la recherche de marqueurs signifiant ou prédisant des atteintes neuronales permettrait d'améliorer la prise en charge des patients.

En 2018, l'épidémie de WNV qui toucha l'Europe a entrainé le développement de nombreux cas neurologiques. Ces individus ont connu différents types de symptômes neuronaux (encéphalites, méningites ou méningo-encéphalites par exemple dans le cas de WNND) ou un syndrome fébrile (WNF). Afin de caractériser le statut inflammatoire de ces différents patients et d'étudier la présence éventuelle de marqueurs d'atteintes neuronales dans le sérum et le LCR, nous avons travaillé sur une cohorte de patients infectés par WNV entre 2018 et 2019 en Hongrie.

Après avoir analysé la réponse inflammatoire développée *in vivo* suite à l'infection par WNV, nous avons étudié dans le sérum des patients, les différences de concentrations de facteurs inflammatoires liés à la réponse antivirale entre les différents groupes de patient (selon leur symptomatologie) et sur la durée de l'infection (analyse des prélèvements aux 10 premiers jours d'infection et ceux effectués plus de 20 jours après l'apparition de symptômes). En termes de marqueurs neuronaux, nous avons aussi évalué la présence de ces molécules dans le sérum et le LCR des patients infectés pas WNV en comparant les groupes symptomatiques.

Ce travail a permis de mettre en évidence une forte inflammation systémique suite à l'infection par WNV qui est notamment plus importante et plus marquée lorsque les patients souffrent d'atteintes neurologiques. De plus la présence de marqueurs neurologiques à de fortes concentrations dans le LCR et à des concentrations significativement plus importantes dans le sérum des patients WNND, appuie la relevance et l'utilité de ces biomarqueurs pour la prise en charge. Des études complémentaires et notamment longitudinales seraient nécessaires afin d'obtenir plus de données sur la prévention des cas graves et des complications au long terme grâce à ces biomarqueurs.

viruses

MDPI

Article

West Nile Virus Neuroinfection in Humans: Peripheral Biomarkers of Neuroinflammation and Neuronal Damage

Orianne Constant [1], Jonathan Barthelemy [1], Anna Nagy [2,†], Sara Salinas [1,†] and Yannick Simonin [1,*,†]

[1] Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, University of Montpellier, INSERM, EFS, 34000 Montpellier, France; orianne.constant@etu.umontpellier.fr (O.C.); jonathan.barthelemy@inserm.fr (J.B.); sara.salinas@inserm.fr (S.S.)
[2] National Reference Laboratory for Viral Zoonoses, National Public Health Center, 1097 Albert Flórián Road 2-6, 1097 Budapest, Hungary; nagy.anna@nnk.gov.hu
* Correspondence: yannick.simonin@umontpellier.fr; Tel.: +33-(04)-34-35-91
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Among emerging arthropod-borne viruses (arbovirus), West Nile virus (WNV) is a flavivirus that can be associated with severe neuroinvasive infections in humans. In 2018, the European WNV epidemic resulted in over 2000 cases, representing the most important arboviral epidemic in the European continent. Characterization of inflammation and neuronal biomarkers released during WNV infection, especially in the context of neuronal impairments, could provide insight into the development of predictive tools that could be beneficial for patient outcomes. We first analyzed the inflammatory signature in the serum of WNV-infected mice and found increased concentrations of several inflammatory cytokines. We next analyzed serum and cerebrospinal-fluid (CSF) samples from a cohort of patients infected by WNV between 2018 and 2019 in Hungary to quantify a large panel of inflammatory cytokines and neurological factors. We found higher levels of inflammatory cytokines (e.g., IL4, IL6, and IL10) and neuronal factors (e.g., BDNF, GFAP, MIF, TDP-43) in the sera of WNV-infected patients with neuroinvasive disease. Furthermore, the serum inflammatory profile of these patients persisted for several weeks after initial infection, potentially leading to long-term sequelae and having a deleterious effect on brain neurovasculature. This work suggests that early signs of increased serum concentrations of inflammatory cytokines and neuronal factors could be a signature underlying the development of severe neurological impairments. Biomarkers could play an important role in patient monitoring to improve care and prevent undesirable outcomes.

Keywords: West Nile virus; flavivirus; neuroinvasive disease; peripheral biomarkers

check for updates

Citation: Constant, O.; Barthelemy, J.; Nagy, A.; Salinas, S.; Simonin, Y. West Nile Virus Neuroinfection in Humans: Peripheral Biomarkers of Neuroinflammation and Neuronal Damage. *Viruses* **2022**, *14*, 756. https://doi.org/10.3390/v14040756

Academic Editor: Maria Cecilia Garibaldi Marcondes

Received: 3 March 2022
Accepted: 1 April 2022
Published: 4 April 2022

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

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

1. Introduction

West Nile virus (WNV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) belonging to the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae* and is a member of the Japanese encephalitis virus (JEV) serocomplex [1]. WNV is maintained in the environment through an enzootic cycle involving mosquitoes (*Culex* spp.) as vectors and birds as primary reservoir hosts, while spread to mammals is occasional. WNV infection in humans results in different outcomes, ranging from asymptomatic to severe neuroinvasive disease. Approximately 80% of cases are asymptomatic while others lead primarily to WNV fever (WNF) with mild flu-like febrile illness whereas ≈1% of cases display a WNV neuroinvasive disease (WNND) [1–3]. The neuroinvasive disease typically manifests as meningitis, meningoencephalitis, encephalitis, or acute-flaccid paralysis, which are commonly associated with diarrhea/vomiting, weakness, vision impairment, confusion, or somnolence [4]. Thus, inter-individual responses to WNV infection are highly heterogeneous. WNV was first detected in the West Nile region of Uganda in 1937 from the blood of a febrile woman [5]. The geographical distribution of WNV has greatly expanded over the last two decades, leading to nearly global distribution. WNV is currently common and can cause outbreaks

in Africa, the Middle East, India, Australia, Central and Southern Europe, and in North, Central and South America [6,7]. The largest European WNV epidemic was in 2018, with 181 recorded deaths and more human cases than in the previous seven years combined [8].

WNV is a spherical, enveloped virus approximately 50 nm in diameter. The genome is a positive single-stranded RNA molecule of approximately 11 kilobases in length encoding three structural and seven non-structural proteins [9]. WNV has great genetic diversity with at least eight different lineages, among which two major lineages (lineages 1 and 2) are responsible for the outbreaks observed in Europe over the past years. Acute WNV infection in humans induces the production of various cytokines, chemokines, and other factors that play an important role in antiviral immunity. On the other hand, the post-infection inflammatory response is thought to have a critical role in disease pathogenesis [10]. The innate immune response to WNV infection is mainly initiated by Toll-like receptors 7 and 3 (TLR7, TLR3). Following recognition of single-stranded viral RNA or double-stranded viral RNA (while genomic RNA is replicating), TLR7 and TLR3 activate IRF-3 and NF-κB signaling pathways, inducing the synthesis of type I IFN, as well as a variety of pro-inflammatory cytokines, including TNF-α, IL-6, IL-1β, and IL-12; these mediate early antiviral responses. This initial antiviral response limits viral dissemination and likely underlies the majority of asymptomatic cases [11]. Nonetheless, high-level viremia may occur in some patients, associated with major host immune responses which can participate in viral spread. This spread occurs notably into the central nervous system (CNS), giving WNV a role in severe diseases, such as neurological disorders [12,13]. WNV gains access to the CNS via multiple pathways, including infection of olfactory and peripheral neurons with direct retrograde axonal transport [14], infiltration of infected immune cells (known as the Trojan-horse mechanism) [15,16], direct infection of brain barriers [17], or transport across brain barriers facilitated by their disruption during host inflammation [18]. CNS infection also exacerbates the host immune response by secretion of cytokines, chemokines, and other neuro-inflammatory mediators into the serum and cerebrospinal fluid (CSF) [19]. Inversely, the circulation of pro-inflammatory mediators participates in the disruption of brain barrier permeability and facilitates greater propagation of WNV in the CNS [20]. Both inflammation and neuronal response are important parameters associated with the outcomes for WNV-infected patients. The evaluation of these factors in blood and CSF samples (biomarkers) can allow for patient monitoring and improve patient care [21,22].

To date, several studies and case reports have suggested long-term consequences of WNV infection, such as prolonged fatigue until six months after infection [23], WNV retinopathy [24], or prolonged neuromuscular symptoms [25]. Persistent neuroinflammation in WNND patients could also affect the development of neurodegenerative diseases [26,27]. The ability to predict clinical evolution to either recovery or CNS involvement has not been yet elucidated. Thus, the identification of biomarkers associated with disease severity could enable better forecasting of WNV disease progression (i.e., the distinction between WNND and WNF) and could improve our knowledge of WNV-caused brain alteration in light of defining novel potential drug targets. The main aim of this study was to assess the inflammatory profile following WNV infection. We examined the differences in levels of cytokines and chemokines in infected mice and in patients with WNND and WNF, notably in serum and CSF, in the context of clinically relevant parameters.

2. Materials and Methods

2.1. Cells and Virus Strains

C6/36 cells (ATCC CRL-1660) and Vero cells (ATCC CCL81) were respectively cultured in Roswell Park Memorial Institute culture medium (RPMI) or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U penicillin, 100 µg/mL streptomycin supplementation. C6/36 cells were maintained at 28 °C whereas Vero cells were maintained at 37 °C with 5% CO_2. The WNV lineage 2 (WNV-3125/France/2018) strain was provided by ANSES (National Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety, 94700 Maisons-Alfort, France). It was amplified in a limit

of four times on C6/36 cells and the viral stocks were prepared by infecting 70% confluent C6/36 cells. Supernatants were collected 5 to 7 days after infection. Viral titers were determined on Vero cells using the Spearman-Kärber method [28] and expressed as TCID50/mL.

2.2. Mouse Experiments

C57/BL6 mice of three-weeks-old were provided from Janvier Laboratories (France). Mice were bred and maintained in a biosafety level 3 (BSL-3) animal facility according to the French Ministry of Agriculture and European institutional guidelines (Appendix A STE n°123). They were inoculated by subcutaneous injection with 10^3 TCID50/mice of WNV or with an equivalent volume amount of PBS for the mock-infected group (n = 9 per group). At the end of the experiments or if mice presented health deterioration, they were euthanized by cervical dislocation and sera were collected and frozen at −80 °C. According to European institutional guidelines (Appendix A STE n°123) and the French Ministry of Agriculture, mice were bred and maintained. Experiments were approved by the French ethics committee (approval N° 6773–201609161356607).

2.3. Patients and Sample Collection

A total of 183 patients from Hungary with WNV infection detected during two consecutive transmission seasons (2018–2019) were available for the study. In patients with WNND (n = 58), serum, and for some of them CSF, samples were analyzed. In patients with WNV fever (n = 26), serum samples were analyzed. WNV diagnosis was confirmed according to the EU case definition for diagnosing and reporting WNV infection by detection of (a) WNV RNA in blood or CSF, (b) WNV IgM antibodies in CSF, or (c) WNV IgM high titer in serum and detection of WNV IgG and confirmation by virus neutralization test (VNT). This cohort harbors 78 (42.6%) females (median age: 51 years; interquartile range (IQR): 44–72 years) and 105 (57.4%) males (median age: 63 years; IQR 54–71 years). Patients had WNF (n = 52; 44 years; IQR 35–52 years) or WNND (n = 131; 62 years; IQR 51–71 years). The main symptoms are fever (79.92%), exanthema (71.15%), and headache (32.69%) for WNF patients and for WNND patients: meningitis (37.40%), encephalitis (15.27%), meningoencephalitis (5.34%) and encephalomyelitis (2.29%) associated with fever (67.94%), headache (41.22%), confusion (28.24%), vomiting (10.92%), dizziness (6.52%), and unconsciousness (5.34%). A control population was used in this study with sera samples from outpatients attending hospitals for occupational medicine without detected disease or infection. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Hungarian National Public Health Center (protocol code 45554-1/2020/MRLAB, approved on 20 September 2020).

2.4. Multiplex Assay

The quantification of mouse and human inflammatory factors was performed using the ProcartaPlex assay and recorded with a Luminex apparatus (MAGPIX; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For human samples, 20 inflammatory cytokines were quantified in sera and CSF using a ProcartaPlex Human Inflammation Panel 20plex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 18 neurological inflammatory factors were quantified with a ProcartaPlex Human Neuroscience Panel 18-plex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For the study of the mouse inflammatory response, a ProcartaPlex Mouse Cytokine and Chemokine Convenience Panel 1A 36-plex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used. Both were conducted according to the manufacturer's procedure.

2.5. In Vitro Human Blood-Brain Barrier Model

Human umbilical cord bloods were collected after an infant's parents signed a consent form in compliance with French legislation. From these and following a previously published protocol [29], $CD34^+$ blood-derived endothelial cells were cultured on matrigel-

coated transwell filters (Costar, 0.4 µm). These cells were placed on top of bovine brain pericytes for 5 to 7 days allowing differentiation to human brain-like endothelial cells (hBLECs) that achieved human blood-brain barrier (BBB) characteristics as tight-junction proteins and transporters expression [30,31]. During this period, the medium was changed every 2 days and before experiments, the endothelial permeability coefficient (Pe) was measured using Lucifer Yellow (LY) (Life Technologies, Van Allen Way Carlsbad, California, United States, 20 µM). Before and after experiments on the human BBB model, Pe was measured after detection of the paracellular passage of LY by fluorescence detection on a Tecan SPARK 10M machine (432/538 nm of excitation/emission wavelength settings). With $Pe < 1 \times 10^{-3}$ cm/min, the endothelium was considered impermeable and was considered to be disturbed with $Pe > 1 \times 10^{-3}$ cm/min [32]. To evaluate the effect of WNND-serum on the endothelium, 50 µL of healthy-control or WNND serum mixed in 250 µL of medium were added to hBLECs for 4 days. Then the Pe was calculated as described below.

2.6. Statistical Analyses

All analyses of the multiplex assay were conducted using Prism software (Graphpad Prism 8, 9.3. 1, Dr. Harvey Motulsk, University of California, San Diego, United States) using unpaired *t*-tests, Welch's *t*-tests, or Mann–Whitney tests following the number of samples compared.

3. Results

3.1. Characterization of Systemic Inflammation in Immunocompetent Mice

Previous studies in immunocompetent mice have shown that both innate and adaptive immune responses participate to control WNV disease [33–35]. To evaluate the systemic inflammatory response following WNV infection, we first assessed inflammation in the serum of infected wild-type C57/BL6 mice (described to be sensitive to WNV infection). Tissue (particularly the brain) cytokine profiles were investigated in several studies, but the serum cytokine profile in mice models remains poorly described [36–38]. Mice were inoculated by subcutaneous (sc.) injection and sera were collected six days post-infection (dpi). To characterize the immune profiles associated with the acute phase of WNV infection, we used an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) multiplex assay containing different sets of soluble markers (a total of 36 molecules). We considered these markers valuable for assessment based on their reports in the literature in clinical cases of flavivirus infection. We detected significantly higher concentrations of cytokines (IL6, IL12p70, IL22, IL31, TNFα) and chemokines (CCL2, CCL4, CCL7, CCL11, CXCL1, CXCL2, CXCL10) in infected mice compared to control mice, reflecting a strong systemic inflammation in WNV-infected mice (Figure 1).

3.2. WNV Infection Leads to Systemic Inflammation, Particularly in Patients with Neuroinvasive Disease

WNV is one of the most incident viral zoonotic infections in Hungary, which was exposed to its largest WNV outbreak in 2018 where 215 diagnosed human cases were recorded. To characterize the inflammatory profile of patients exposed to WNV infection, we analyzed sera collected between 2018 and 2019 from 183 WNV-infected patients from Hungary. Paired samples of serum and CSF samples were available and analyzed for 19 patients with WNND. We first analyzed the expression of 20 cytokine and chemokine mediators: innate immunity factors (such as IFNα, IL-1α, IL6, TNFα); several other pro- and anti-inflammatory cytokines (GM-CSF, IFNγ, IL-1β, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A (CTLA-8)), and chemokines (IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1α (CCL3), MIP-1β (CCL4)). Comparing sera from non-infected patients to WNV-infected patients showed a global upregulation of cytokines (mainly interleukins) and chemokines in infected patients compared to healthy controls (Figure A1). More interestingly, the systemic inflammatory profile was different between patients with WNF versus WNND (including patients with encephalitis, meningitis, or meningoencephalitis). We found significantly

higher concentrations of pro-inflammatory markers in WNND patients. Overall, several inflammatory factors were found more elevated in the WNND group than in the WNF or control group; with the WNF group displaying no difference from the control group (Figure 2). Precisely, WNND patients demonstrated more increased concentrations of IL1β, IL1α, IL4, IL8, IL10, IL13, IL17, and CCL2. IFNα and IFNγ were also upregulated in the sera of the WNND group. Within the WNND group, we did not observe a significant difference in the concentration of pro-inflammatory cytokines between patients with meningitis, encephalitis, or meningoencephalitis. Several cytokine expressions did however appear slightly higher in patients with meningitis (Figure A2).

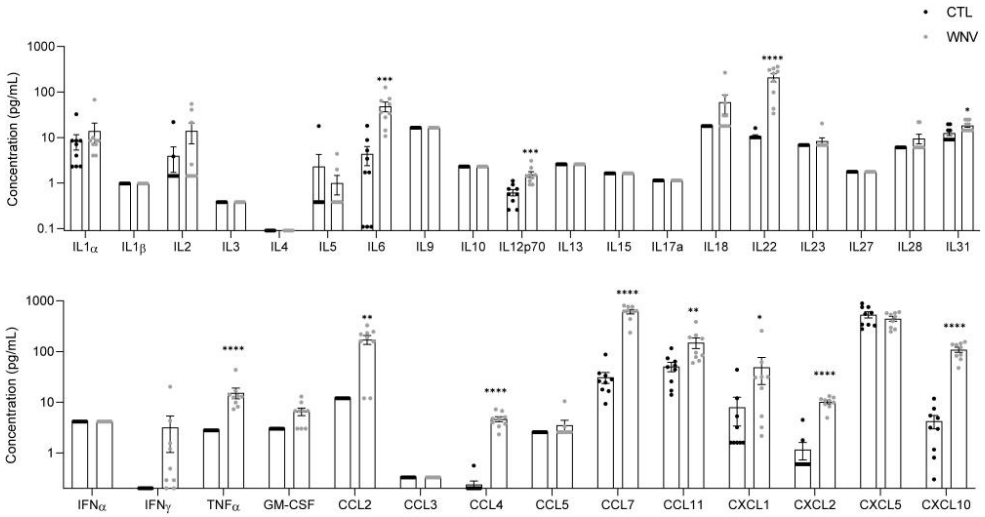


Figure 1. Upregulation of pro-inflammatory mediators after WNV infection in the serum of C57/BL6 mice (6 dpi). Plasma concentration in pg/mL of pro-inflammatory markers measured by multiplex bead-based ELISA in non-infected (black) and WNV-infected mice (grey). Bars show means ± SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.3. Identification of Neuroinflammation and Neuronal Damage Factors in WNND

We then questioned the presence of neuroinflammation and neuronal damage factors in the CSF of WNND patients presenting strong systemic inflammation. To investigate this, we used ELISA targeting 18 neuronal markers described as having a role in neuroinflammation and/or neurodegenerative diseases (such as Alzheimer's disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), dementia, etc.). The markers included: β-amyloid (1–42), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), YKL-40 (also known as Chitinase 3-like 1 (CHI3L1)), ciliary neurotrophic factor (CNTF), fibroblast growth factor-21 (FGF-21), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), glial fibrillary acidic protein (GFAP), Kallikrein-6 (KLK6), macrophage migration inhibitory factor (MIF), neuronal cellular adhesion molecule 1 (NCAM-1), Neurogranin (NRGN), Neurofilament H (NF-H), nerve growth factor β (β-NGF), S100 Calcium Binding Protein B (S100B), Tubulin associated unit (Tau (total)), Tau (pT181), TAR DNA-binding protein (TDP-43), and Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1). Due to the limited availability of CSF samples from healthy individuals or WNF patients given the ethical implications, we did not have a control group for comparison of the results from CSF samples of WNND patients. We, therefore, decided to compare CSF samples from patients with meningitis versus those with encephalitis (meningitis and encephalitis have the highest incidence among our patients with WNND). (Figure 3A). We found that CSF from WNND patients contains a high concentration of

neuronal biomarkers, such as amyloid-β, GFAP, Kallikrein-6, NF-H, S100N, Tau, TDP-43, and UCHL1 (Figure 3A).

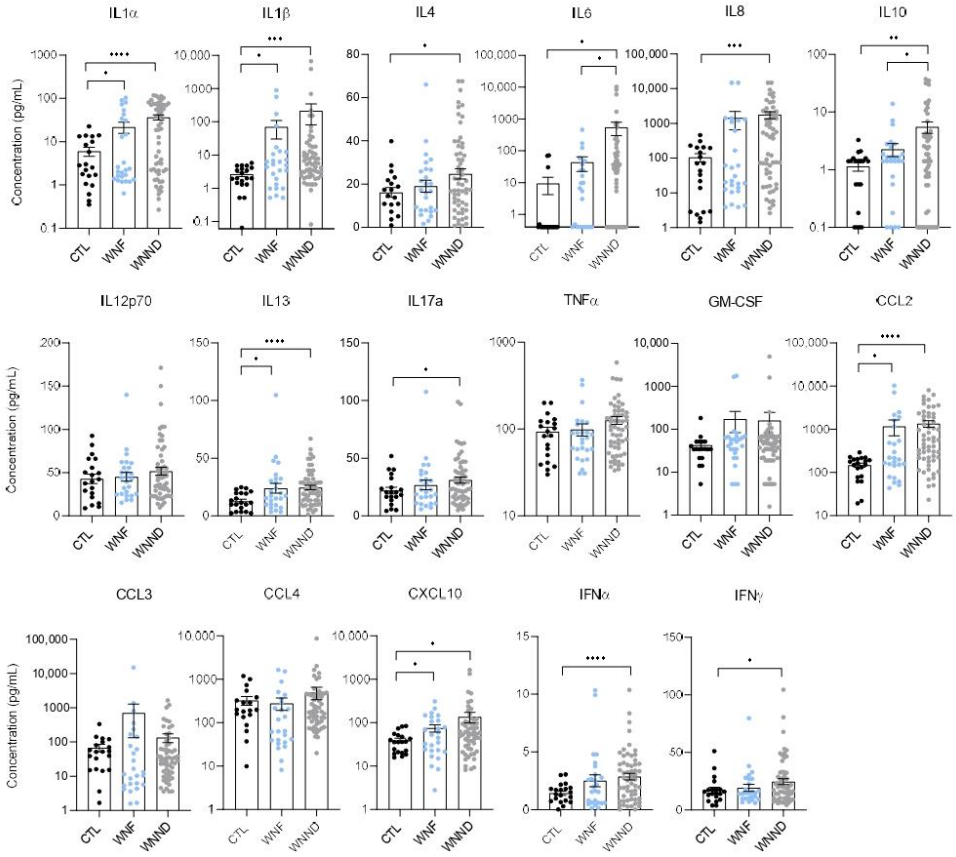


Figure 2. WNV infection results in systemic inflammation in patient sera. Plasma concentration in pg/mL of different pro-inflammatory markers of non-infected CTL (black), WNF (blue) and WNND (grey) humans, measured by multiplex bead-based ELISA. Bars show means ± SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

It is not unexpected to find a high concentration of these markers in CSF. However, interestingly we also found a significant increase in some of these markers in the sera from patients with WNND, unlike WNF patients. MIF, NCAM1, TDP-43, and YKL-40 (CHI3L1) were significantly increased compared to healthy controls (found at equivalent levels in serum and CSF samples) (Figure 4). We also observed an increase in GFAP, GDNF, KLK6, and BDNF in the serum of patients with WNND, but to a lesser extent than in CSF samples. Overall, we did not find a significant difference for the majority of markers between patients with meningitis versus with encephalitis. Nevertheless, some markers differed in concentration in CSF samples, such as IFNγ and Neurogranin; these were significantly higher in patients with encephalitis. Conversely, GDNF was specifically higher in the CSF of patients with meningitis (median: 14 pg/mL; IQR 14–50.3 pg/mL) (Figure 3B).

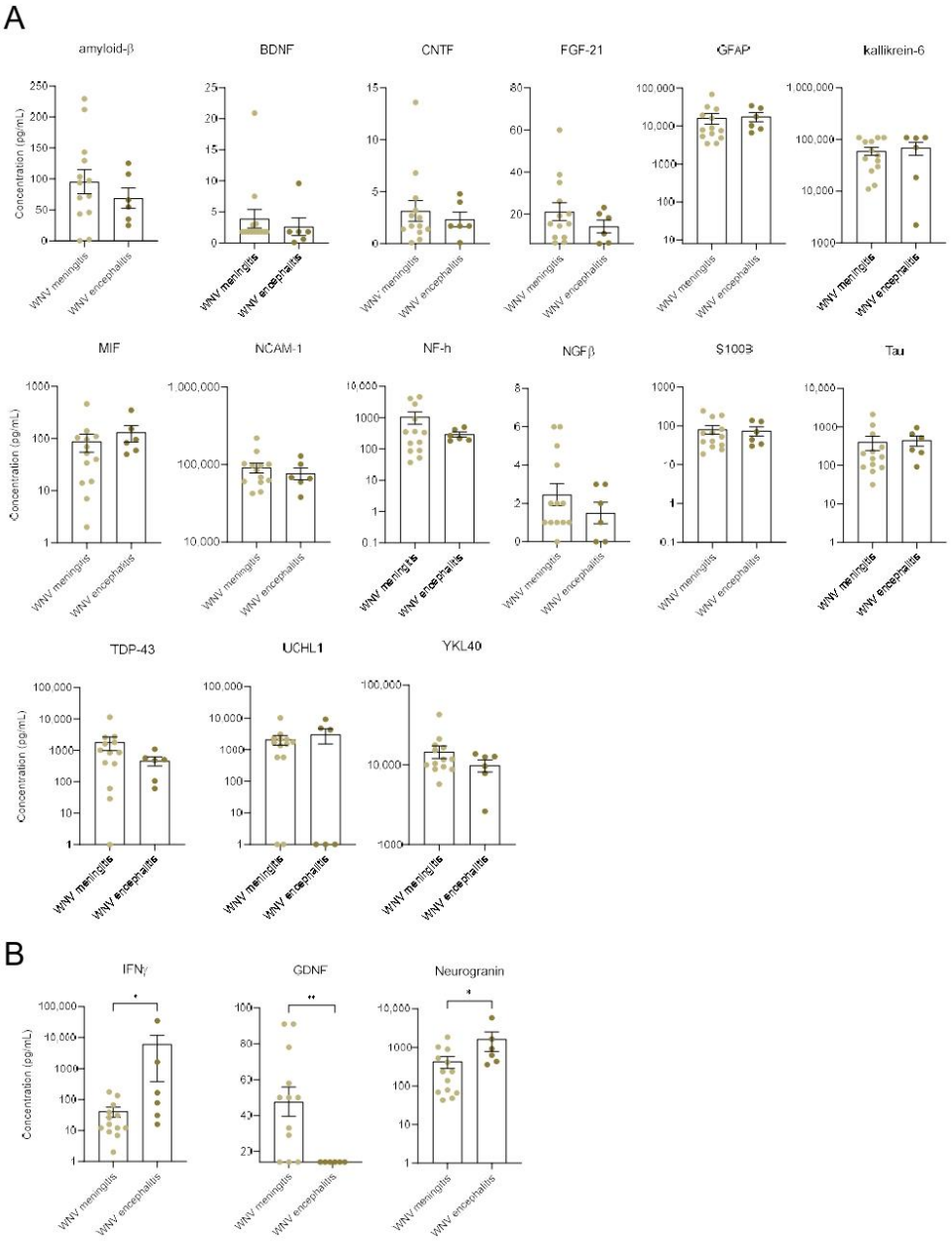


Figure 3. Identification of biomarkers of neuroinflammation in CSF of WNND patients. (**A**) CSF concentration in pg/mL of different neuronal markers of non-infected CTL (black), WNV-meningitis (yellow), and WNV-encephalitis (orange) humans, measured by multiplex bead-based ELISA. (**B**) IFNγ, GDNF, and neurogranin are differentially expressed in patients with meningitis and encephalitis. Bars show means ± SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

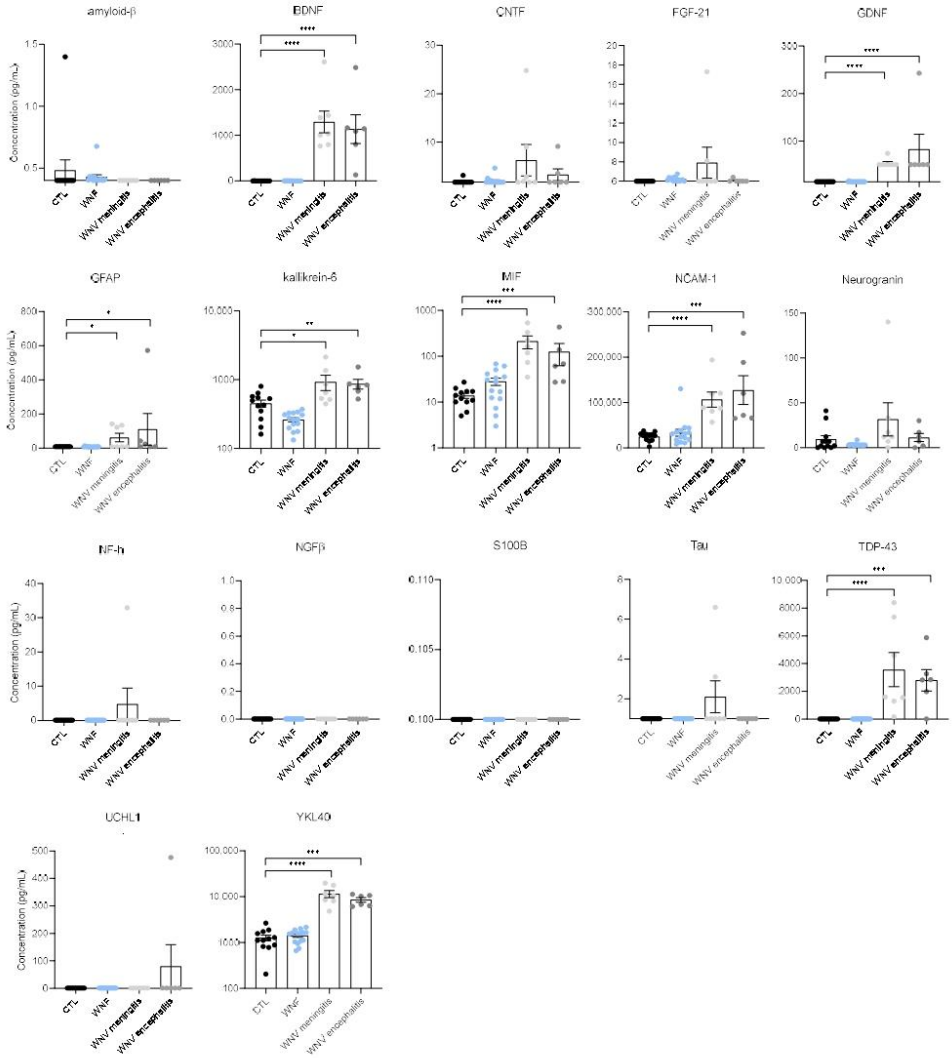


Figure 4. Sera of WNND patients display markers of neuro-inflammation and neuronal injuries. Plasma concentration in pg/mL of different pro-inflammatory markers of non-infected CTL (black), WNF (blue), WNV-meningitis (light grey) and WNV-encephalitis (dark grey) humans, measured by multiplex bead-based ELISA. Bars show means ± SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.4. Systemic Inflammation Is Persistent

Another important parameter during the course of WNV infection is the duration of inflammation [39]. To determine whether cytokine/chemokine induction differed according to time, we were able to assess inflammation in the sera of several infected patients over a short-term (0–11 days post-infection) and long-term (>20 days post-infection) period compared to healthy controls. We did not observe late inflammation for patients with WNF,

and serum cytokine and chemokine levels remained low both in the short and long term (Figure 5). On the other hand, we observed the maintenance of a long-term inflammatory context for the majority of patients with WNND for many of the cytokines/chemokines studied (changes not always significant). Cytokine and chemokine levels tended to decrease over time but remained very high for certain proteins, such as IL8, IL13, and CCL2 (Figure 5). In some patients, we were even able to detect an increase in certain cytokines, such as CCL3 or CCL4, 33 days after the suspected date of infection (Figure A3). This long-term inflammation following WNV infection among patients developing neuronal disease can have very deleterious effects on health, including prolonged fatigue, irreversible neurological impairments, or neurocognitive alterations. Furthermore, other neuronal injuries can include vascular leakage by the direct effect of WNV or the effects of systemic inflammation on the BBB [40].

3.5. Serum from Patients with WNND Could Affect BBB Integrity

The increase in cytokine and chemokine levels after WNV infection could play a role in vascular endothelium leakage already described in many case reports [41]. In addition to the high-level and prolonged inflammation found in the sera of WNND patients, as well as the presence of neuronal markers, these patients are at risk of developing vascular leakage in the CNS. We, therefore, investigated the effect of the inflammatory environment on the cerebral endothelium integrity. We incubated sera from WNND patients or healthy controls using an innovative human in vitro BBB model recapitulating the main characteristics of the endothelial barrier observed in vivo [29,42–46]. Briefly, $CD34^+$ cord blood-derived hematopoietic stem cell-derived endothelial cells were allowed to differentiate on culture inserts in contact with pericytes for 6–7 days to acquire BBB characteristics (Figure 6A). The permeability coefficient (Pe was measured four days post-incubation by measuring yellow Luciferase passage across the endothelium (medium required changing after to maintain cells in appropriate physiological conditions). Mock-infected endothelium (exposed to healthy control serum) demonstrated a Pe of ~0.62×10^{-3} cm/min, consistent with "tight" BBB endothelia. Serum from patients with WNND induced a slight increase in Pe (~0.69×10^{-3} cm/min). This value is still consistent with a "tight" BBB, suggesting that in our conditions WNV serum did not vastly impair BBB integrity, but may trigger a subtle effect on barrier integrity that could increase access of cytokines/chemokines to the brain or perturb vascular functions (Figure 6B).

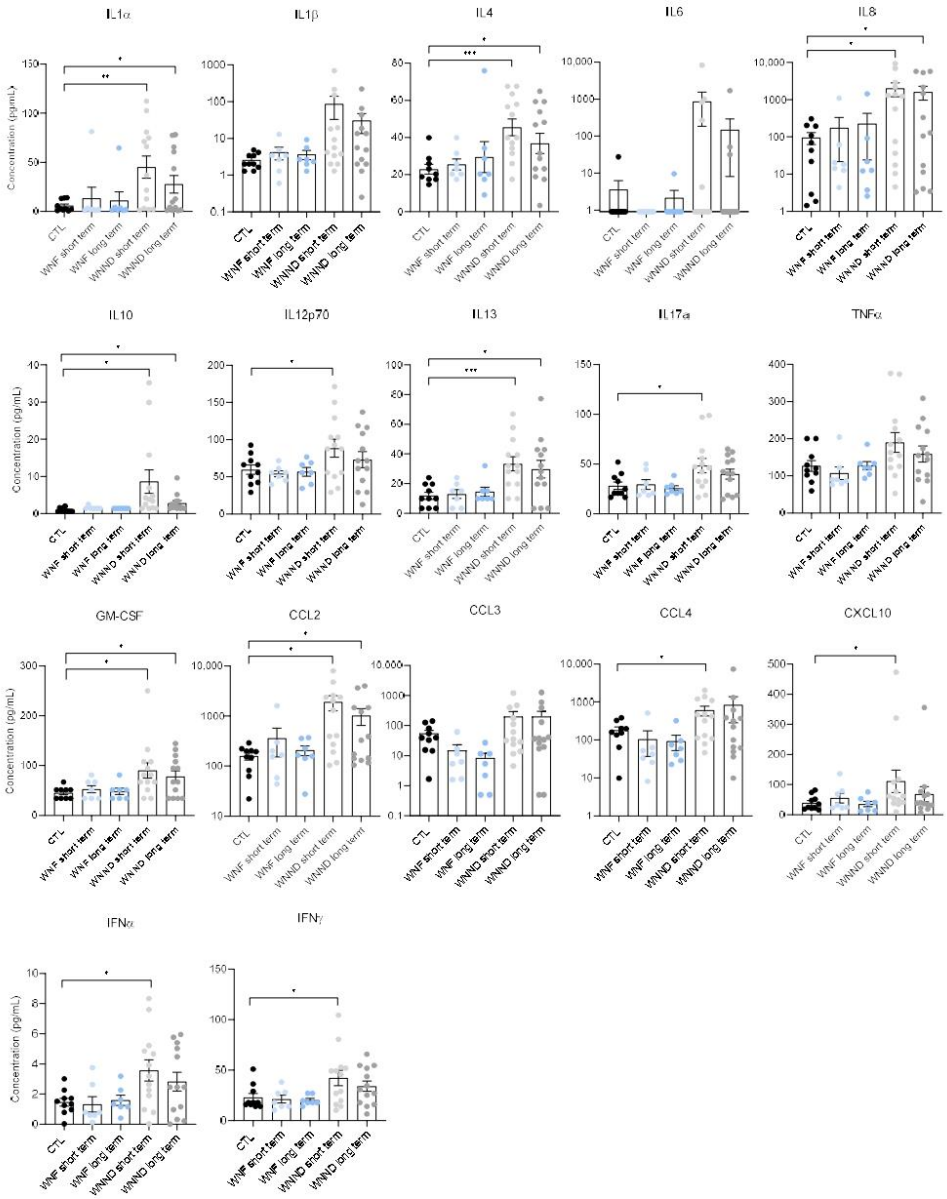


Figure 5. Persistence of inflammation in WNND patient sera. Plasma concentration in pg/mL of different pro-inflammatory markers of non-infected CTL (black), WNVF-short term (light blue), WNVF-long term (dark blue), WNVND-short term (light grey) and WNVND-long term (dark grey) humans, measured by multiplex bead-based ELISA. Bars show means ± SEM ((short term = 2 to 11 days, long term = more than 20 days); * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$).

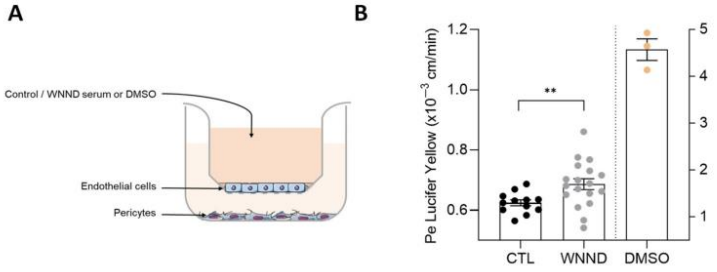


Figure 6. WNND serum slightly perturbs the endothelium in a human BBB model. (**A**) Primary brain pericytes cultured in the basolateral compartment allow differentiation of CD34+ blood cord-derived endothelial cells in human brain-like endothelial cells cultured on transwell filters in the apical compartment. Serum can be added in the apical compartment of this human in vitro BBB model representing the blood. (**B**) Permeability coefficient (Pe) of the paracellular marker Lucifer Yellow was measured 4 days after the addition of CTL or WNND serum or DMSO as a positive control. ** $p < 0.01$.

4. Discussion

The clinical outcomes of WNV infection can vary from asymptomatic cases and mild symptoms (fever) to neurological impairments in the more severe forms. These outcomes depend on factors such as age or virus strain but also host genetics factors or coinfection with parasites may also dictate susceptibility to WNV infection [47–49]. A better knowledge of the inflammation associated with WNV infection is an important element for better understanding the underlying pathogenesis, and in particular the mechanisms involved in mild flu-like febrile illness or WNV-induced neurological disorders. Very few studies have evaluated the human immune response to WNV infection, and even more so in the context of serum and CSF samples from patients with WNV or WNND in a clinical setting [10,22,50–52]. In this study, we aimed to determine the mouse and human inflammatory profile following WNV infection, as well as biomarkers specific to the neuro-infection. Overall, we provide new insights on systemic inflammation following WNV infection. Firstly, using mouse models we found a strong systemic inflammatory response in the serum of WNV-infected mice with upregulation of a panel of cytokines and chemokines. The inflammatory profile observed in the serum of WNV-infected mice is similar to that of the brain inflammatory profile of WNV-infected mice. Both profiles are associated with elevated concentrations of a broad spectrum of cytokines or chemokines such as TNFα, IL6, CCL2, CCL4, and CCL7 [35,53,54].

When we compared serum from WNV-infected patients to healthy controls we also detected higher levels of inflammation: nine (including IL1α, IL4, IFNα) out of twenty markers were significantly increased. Specifically, patients developing WNND (pooling meningitis, meningoencephalitis, and encephalitis) have significantly increased levels of several pro-inflammatory mediators in comparison to healthy and WNF-infected individuals. This increased inflammation could be due to uncontrolled anti-viral responses and could participate in neuronal symptom development given that many brain infections lead to exacerbated immune response and associated-neuronal damage [52]. Indeed, a key feature during viral infections, whether they affect the brain or not, is the induction of inflammatory responses that can be both beneficial (control viral replication) or detrimental (trigger cellular toxicity). We observed the increased response of type 2 cytokines (IL4 and IL13) and IL10, an immunomodulatory interleukin, in WNND patients. Type 2 cytokines are crucial to the pathogenesis of many diseases. They suppress the development of protective type 1 immunity to a wide range of viral, bacterial, and protozoan pathogens and could contribute to regulating the excessive inflammatory response in WNND patients, in combination with IL10 [55]. In light of determining the molecular signature of WNV

infection to better orientate patient care (i.e., anticipate severe symptoms), we also compared groups of patients with encephalitis, meningoencephalitis, and meningitis. We did not find significantly different levels of any relevant cytokines or chemokines in the sera to allow for distinction between these groups while there are only some differences in the CSF, including IFNγ, GDNF, or neurogranin. Patients who initially presented encephalitis have high rates of persistent neurological abnormalities several years after infection compared with those who presented meningitis [56]. It will be interesting to perform longer-term analyses to determine if certain of these biomarkers or other factors might be involved in this unfavorable evolution.

WNV infection can be deleterious to the brain as the CNS can undergo direct neuronal infection (WNV may infect neurons, microglia, and astrocytes), but also due to the indirect effects of global neuroinflammation and post-infectious mechanisms that can occur in distinct anatomical regions [44]. Severe and persistent neuroinflammation can trigger neurological disorders, including encephalitis, paralysis, ophthalmological impairments, or developmental defects, which in some cases can lead to long-term CNS defects. For example, the release of pro-inflammatory factors in the serum (IL6 or TNFα) can perturb brain barrier integrity and trigger neuronal impairments [57]. Direct WNV-CNS infection leads to neuroinflammation and neurotoxicity [58]. Prolonged systemic inflammation can activate pathophysiological axes (e.g., lipid and lipoprotein metabolism) and is related to a number of diseases (i.e., depression, other brain diseases, or persistent fatigue) [59–61]. In another aspect, control of early WNV infection steps is crucial; the initial type I IFN response must be controlled, but should also occur throughout the course of infection to avoid severe damage [22]. WNND patients in our study here showed high serum levels of inflammatory molecules for over 20 days, an effect that can cause many adverse effects. Neuroinvasion is a serious complication, with long-term sequelae that include ocular involvement, cognitive impairment, muscle weakness, and flaccid paralysis [62]. Previous studies have shown significantly higher concentrations of IFNα, IL-2, IL-6, IL-12p70, CXCL10, and GM-CSF in patients with a clinical diagnosis of prolonged post-infection fatigue (>6 months) reporting a history of symptomatic WNV infection [23]. More recently, another study reported elevated levels of TNF-α up to 36 months post-onset of illness in four patients with serologically-confirmed WNND. These patients had persistent post-infectious symptoms, suggesting a potential role for this cytokine in the extended post-inflammatory state and long-term morbidity associated with WNV infection [63].

Patients generally recover from WNF within a few days without deleterious effects, whereas WNND forms are more prone to the development of long-term impairments; hence the importance of patient follow-up during infection evolution, notably by the assessment of biomarkers that can orient care and anticipate neurological outcomes. Indeed, biomarkers are under intensive investigation as potential predictors of neurological impairments (neurodegenerative diseases or encephalitis) and severe long-term effects, and could in turn orient patient care early upon admission [64–66]. Neurodegeneration and/or the modulation of neurodegenerative mechanisms are hallmarks of numerous viral brain infections [27]. Indeed, it is now accepted that viral agents could be considered risk factors in the etiology of some neurodegenerative diseases [27,67,68]. We detected the presence of several neuronal biomarkers involved in neuroinflammation (MIF), neuroinjury (NCAM-1), and neurodegeneration (KLK6, TDP43, and YKL40) in the serum of patients with WNND. The relation of these biomarkers with neuronal diseases, cognitive impairments, or dementia could make them robust targets for the long-term follow-up of WNV patients.

The brain neurovasculature is emerging as a key structure required for brain homeostasis and is often perturbed (i.e., by viruses) and/or has a role in the perturbations underlying neurodegenerative diseases [69,70]. To monitor whether neuroinflammation exists and/or the BBB integrity is affected, the analysis of specific neurobiomarkers in serum, such as Tau, NFL, or GFAP, is now commonly investigated. In this context, we investigated neurotrophic factors in the serum of WNV patients to assess potential brain

perturbations occurring during infection. Interestingly, we found significant increases in several factors in the serum of WNND patients, such as TDP-43. TDP-43 is a DNA-binding factor that plays key functions in RNA processing by interacting with ribonucleoproteins and regulating gene expression. Mutations in TDP-43, as well as TDP-43 aggregates, are now considered to have a role in neurodegenerative disorders, such as ALS, AD, and frontotemporal dementia [71–74]. TDP-43 aggregates have been found to accumulate during Coxsackievirus B3 brain infection, possibly due to a direct effect of viral proteins on the redistribution and cleavage of TDP-43; a process favoring viral replication [75]. Therefore, the major release of TDP-43 in WNV infection could be the result of dysregulation of TDP-43 expression and/or activity, and could thus be considered a potential risk factor for the development of neurodegenerative disease.

YKL40 is a glycoprotein that, among other functions, regulates apoptosis and inflammasomes. YKL40 can be secreted by activated microglia during neuroinflammation [76]. Interestingly, this inflammatory mediator has a role in AD and is now considered a potential biomarker for the differential diagnosis of AD [77,78]. The high serum concentration of YKL40 in our study indicates the monitoring of this protein as a potential biomarker for WNV infection. In addition, YKL40 has been put forward as a potential biomarker for other viral infections, such as SARS-CoV2 and tick-borne encephalitis virus (TBEV) [79,80]. Regarding TBEV infection, differences in YKL-40 levels in CSF samples between patients with meningoencephalitis versus those with meningitis were proposed as a biomarker for the differentiation between clinical forms of TBE [79]. However, here we could not detect significant differences in YKL-40 levels between encephalitis and meningitis in WNV infection. GFAP is a neuronal marker of astrocyte activation, a signature of neuroinvasive diseases including AD [19,81,82], but also during viral brain infections [83,84]. In the serum, GFAP level can be correlated with vascular leakage. In this cohort, the serum concentration of GFAP was elevated in WNV encephalitis and meningitis patient groups, highlighting potential neuronal inflammation and vascular damage, and correlating with a previous WNV infection description [47]. Kallikrein-6 (KLK6) is an enzyme with a major role in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases [85]. KLK6 has been considered an early biomarker in the context of traumatic brain injury in rats [86], whereas it has been put forward as a therapeutic target in multiple sclerosis [87] and for AD patient care [88]. The roles of KLK6 in varicella-zoster virus pathogenesis were also examined [89]. KLK6 was proposed as a biomarker for human papilloma virus-positive cervical cancer [90], axonal injury in HIV infection [91], and for patient prognosis in glioblastoma follow-up [92]. In our study, similarly for GFAP, the concentration of KLK6 was found upregulated in sera from WNND patients. This biomarker is further evidence of neuronal damage that should be explored in the context of neuroinfection scoring.

We also report a strong increase in serum BDNF concentration, a key neurotrophic factor involved in the maintenance of CNS cells. The serum concentration of BDNF was higher in WNND patients than in healthy individuals. BDNF is described as elevated in other brain disorders, such as viral encephalitis and bacterial CNS infections [93,94]. The release of BDNF seems to have a role in the severity of CNS injury and its capacity to predict neuronal involvement is increasingly studied [95,96]. Moreover, BDNF is associated with various degenerative diseases and is shown to be upregulated in chronic stress, including ischemia injury or schizophrenia [97,98].

Another interesting marker in our study is GDNF, a neurotrophic factor also involved in neural cell survival. Previously, this molecule was assessed in the context of bacterial or viral encephalitis or meningitis with unconvincing results [99]. Then, a link between the CSF concentration of this marker and HIV brain disease was suggested [100]. Here, we found a significantly elevated level of GDNF in the CSF of WNV meningitis patients when compared to encephalitis patients. The role of GDNF as a biomarker of WNND requires further investigation. Interestingly, we also detected a significant increase in IFNγ and Neurogranin in the CFS of encephalitis patients. Neurogranin is a small protein primarily expressed in granule-like structures in pyramidal cells of the hippocampus and cortex and is involved

in synaptic plasticity, synaptic regeneration, and long-term potentiation mediated by the calcium- and calmodulin-signaling pathways [101]. This protein was recently described as a potential biomarker of neurological disorders given its role in several brain diseases, such as AD, Parkinson's disease, Creutzfeldt–Jakob disease, and neurological complications of HIV, and is expressed in the serum after brain trauma [101,102]. Furthermore, in the context of leukocyte recruitment initiating neuroinflammation, MIF is an important chemokine that is correlated to glial activation and chronic inflammation [103], as well as with BBB impairment [20]. The increased concentration of MIF found in WNND sera could initiate neuroinflammation and BBB injury. Finally, NCAM-1, an adhesion molecule involved in neural cell adhesion and synaptic plasticity, has also been related to neuroinflammation. The expression of NCAM-1 has been found dysregulated during the course of COVID-19 neuroinfection and a potential role in Guillain-Barre syndrome has been reported [104,105]. In our study, increased serum NCAM-1 concentration in WNND patients suggests a peripheral neuronal effect that can occur during WNV infection.

5. Conclusions

In this study, we demonstrate systemic inflammation in WNND patients by the release of neuronal molecules related to neuronal diseases and potential neurodegeneration. In addition, this (neuro-) inflammatory condition can prolong for several weeks and could impair BBB integrity. The specificity of and mechanistic implication of these biomarkers in WNV infection and BBB impairment requires deeper evaluation. Altogether, these results give insight into the crucial role of biomarkers and patient monitoring in improving WNV infection care and preventing undesirable outcomes.

Author Contributions: Conceptualization, Y.S.; methodology, Y.S. and S.S.; investigation, O.C. and J.B.; resources, A.N.; writing—original draft preparation, Y.S.; writing—review and editing, Y.S., S.S. and A.N.; funding acquisition, Y.S. and S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the Montpellier University of Excellence (MUSE) through ANR (the French National Research Agency) for Yannick Simonin and Sara Salinas with the reference ANR-16-IDEX-0006 and the Labex EpiGenMed "Investissements d'avenir", program "ANR-10-LABX-12-01".

Institutional Review Board Statement: According to European institutional guidelines (Appendix A STE n°123) and the French Ministry of Agriculture, mice were bred and maintained. Experiments were approved by the French ethics committee (approval N° 6773–201609161356607). The human cohort study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Hungarian National Public Health Center (protocol code 45554-1/2020/MRLAB, approved on 20 September 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

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

Appendix A

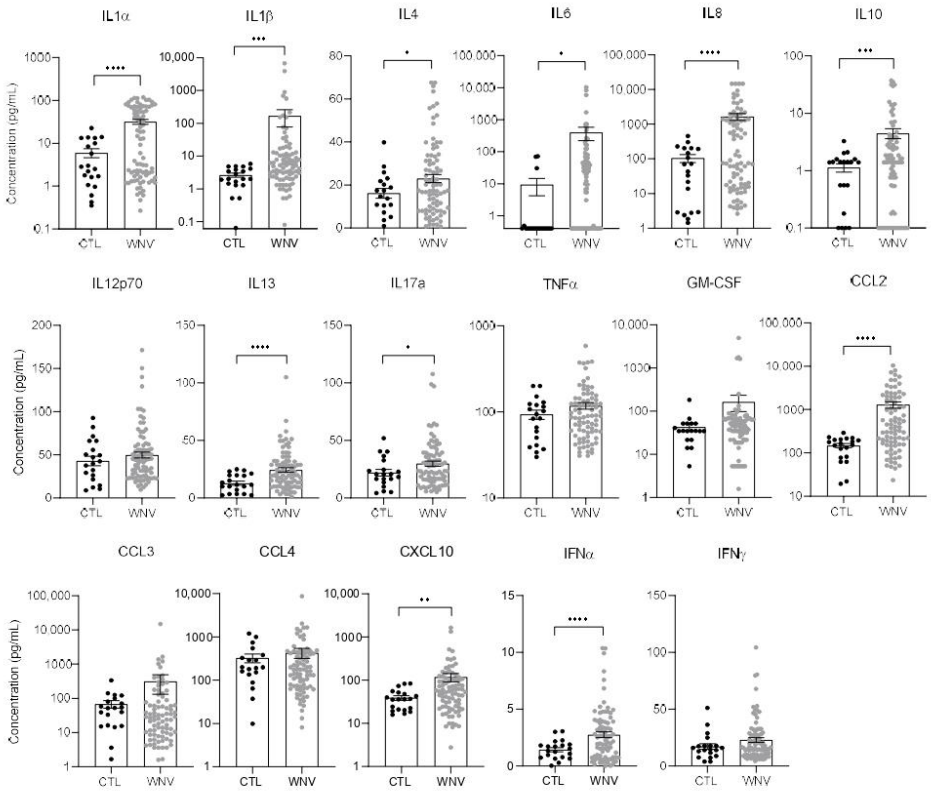


Figure A1. Biomarkers of inflammation in WNV-patients compared to healthy individuals. Plasma concentration in pg/mL of different pro-inflammatory markers of non-infected (black) and WNV-infected (grey) humans, measured by multiplex bead-based ELISA. Bars show means ± SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

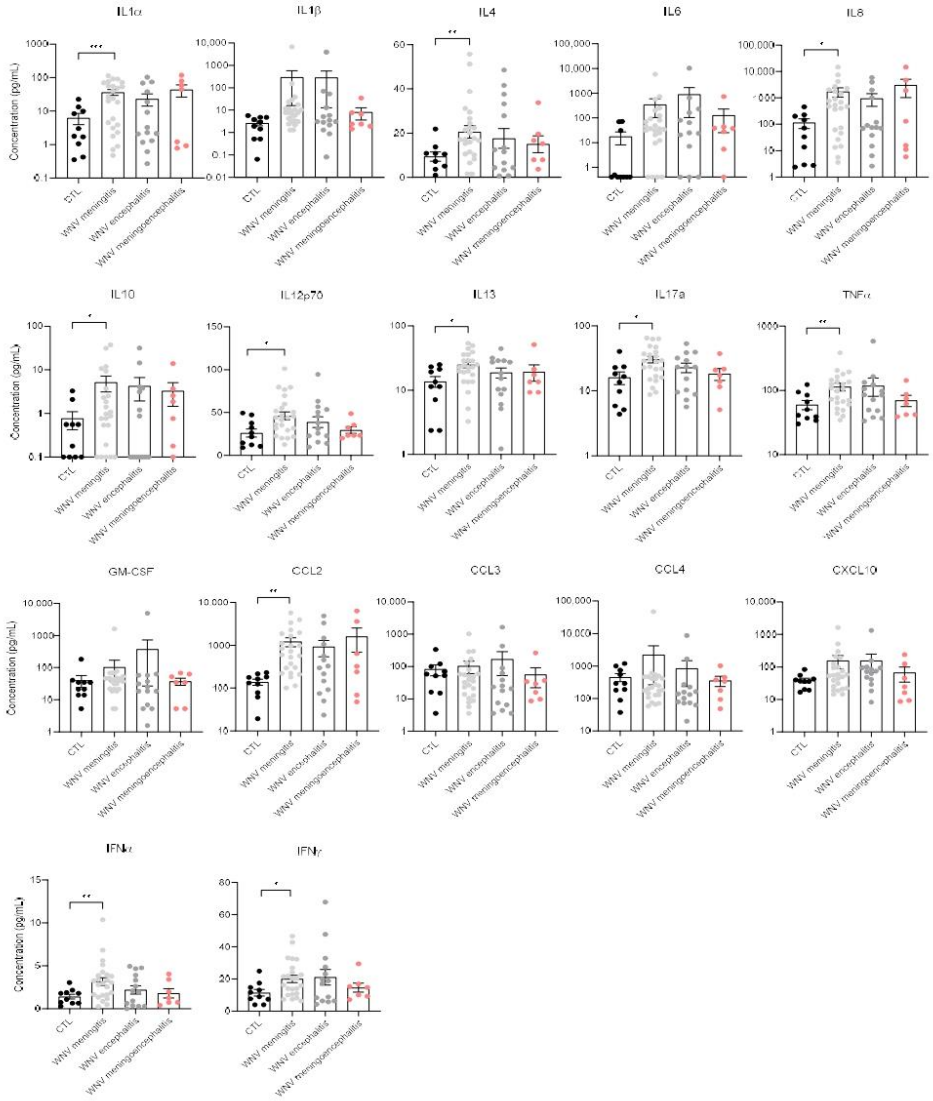


Figure A2. Same inflammation profile in patients with meningitis, encephalitis, or meningoencephalitis. Plasma concentration in pg/mL of different pro-inflammatory markers of non-infected CTL (black), WNV-meningitis (light grey), WNV-encephalitis (dark grey) and WNV-meningoencephalitis (light red) humans, measured by multiplex bead-based ELISA. Bars show means ± SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

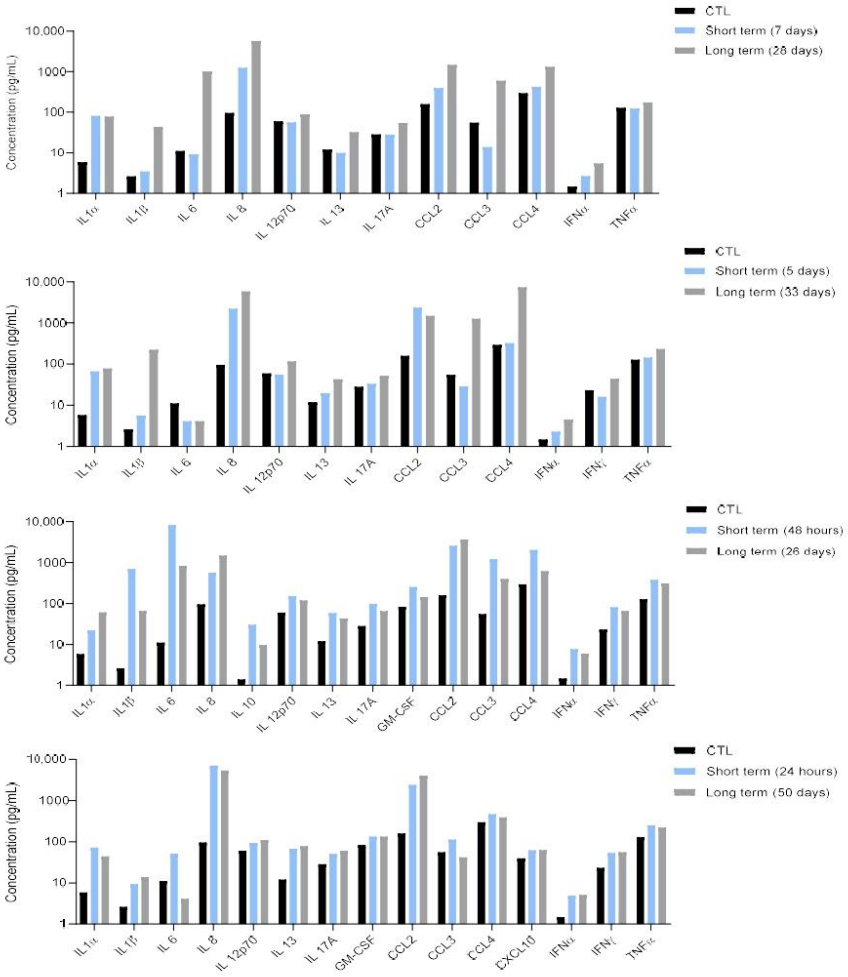


Figure A3. Examples of patients with persistent inflammation. Plasma concentration in pg/mL of different pro-inflammatory markers of non-infected CTL (black), WNND-short term (blue), and WNND-long term (grey) humans, measured by multiplex bead-based ELISA. Bars show value.

References

1. Kramer, L.D.; Li, J.; Shi, P.Y. West Nile virus. *Lancet Neurol.* **2007**, *6*, 171–181. [CrossRef]
2. Campbell, G.L.; Marfin, A.A.; Lanciotti, R.S.; Gubler, D.J. West Nile virus. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 519–529. [CrossRef]
3. Sejvar, J.J.; Marfin, A.A. Manifestations of West Nile neuroinvasive disease. *Rev. Med. Virol.* **2006**, *16*, 209–224. [CrossRef] [PubMed]
4. Hayes, E.B.; Gubler, D.J. West Nile virus: Epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu. Rev. Med.* **2006**, *57*, 181–194. [CrossRef] [PubMed]
5. Calisher, C.H.; Gould, E.A. Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv. Virus Res.* **2003**, *59*, 1–19. [CrossRef] [PubMed]
6. Petersen, L.R.; Brault, A.C.; Nasci, R.S. West Nile Virus: Review of the Literature. *JAMA* **2013**, *310*, 308. [CrossRef] [PubMed]
7. Lecollinet, S.; Pronost, S.; Coulpier, M.; Beck, C.; Gonzalez, G.; Leblond, A.; Tritz, P. Viral Equine Encephalitis, a Growing Threat to the Horse Population in Europe? *Viruses* **2019**, *12*, 23. [CrossRef]

8. ECDC. *West Nile Virus Infection Key Facts*; ECDC: Stockholm, Sweden, 2019. Available online: https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-virus-infection (accessed on 1 January 2019).
9. Brinton, M.A. Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus. *Viruses* **2013**, *6*, 13–53. [CrossRef]
10. Tobler, L.H.; Cameron, M.J.; Lanteri, M.C.; Prince, H.E.; Danesh, A.; Persad, D.; Lanciotti, R.S.; Norris, P.J.; Kelvin, D.J.; Busch, M.P. Interferon and interferon-induced chemokine expression is associated with control of acute viremia in west nile virus-infected blood donors. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 979–983. [CrossRef]
11. Martin, M.-F.; Nisole, S. West Nile Virus Restriction in Mosquito and Human Cells: A Virus under Confinement. *Vaccines* **2020**, *8*, 256. [CrossRef]
12. Klein, R.S.; Garber, C.; Funk, K.E.; Salimi, H.; Soung, A.; Kanmogne, M.; Manivasagam, S.; Agner, S.; Cain, M. Neuroinflammation during RNA Viral Infections. *Annu. Rev. Immunol.* **2019**, *37*, 73–95. [CrossRef]
13. Morganti-Kossmann, M.C.; Kossmann, T.; Wahl, S.M. Cytokines and neuropathology. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 286–291. [CrossRef]
14. Samuel, M.A.; Wang, H.; Siddharthan, V.; Morrey, J.D.; Diamond, M.S. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17140–17145. [CrossRef]
15. Roe, K.; Orillo, B.; Verma, S. West nile virus-induced cell adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells regulate leukocyte adhesion and modulate permeability of the in vitro blood-brain barrier model. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102598. [CrossRef]
16. Bai, F.; Kong, K.F.; Dai, J.; Qian, F.; Zhang, L.; Brown, C.R.; Fikrig, E.; Montgomery, R.R. A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J. Infect. Dis.* **2010**, *202*, 1804–1812. [CrossRef]
17. Verma, S.; Lo, Y.; Chapagain, M.; Lum, S.; Kumar, M.; Gurjav, U.; Luo, H.; Nakatsuka, A.; Nerurkar, V.R. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology* **2009**, *385*, 425–433. [CrossRef]
18. Wang, P.; Dai, J.; Bai, F.; Kong, K.-F.; Wong, S.J.; Montgomery, R.R.; Madri, J.A.; Fikrig, E. Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates West Nile Virus Entry into the Brain. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8978–8985. [CrossRef]
19. Bai, F.; Ashley Thompson, E.; Vig, P.J.S.; Arturo Leis, A. Current understanding of west nile virus clinical manifestations, immune responses, neuroinvasion, and immunotherapeutic implications. *Pathogens* **2019**, *8*, 193. [CrossRef]
20. Winkelmann, E.R.; Luo, H.; Wang, T. West Nile Virus Infection in the Central Nervous System. *F1000Research* **2016**, *5*, 105. [CrossRef]
21. Fares-Gusmao, R.; Rocha, B.C.; Sippert, E.; Lanteri, M.C.; Áñez, G.; Rios, M. Differential Pattern of Soluble Immune Markers in Asymptomatic Dengue, West Nile and Zika Virus Infections. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17172. [CrossRef]
22. Hoffman, K.W.; Sachs, D.; Bardina, S.V.; Michlmayr, D.; Rodriguez, C.A.; Sum, J.; Foster, G.A.; Krysztof, D.; Stramer, S.L.; Lim, J.K. Differences in early cytokine production are associated with development of a greater number of symptoms following west nile virus infection. *J. Infect. Dis.* **2016**, *214*, 634–643. [CrossRef] [PubMed]
23. Garcia, M.N.; Hause, A.M.; Walker, C.M.; Orange, J.S.; Hasbun, R.; Murray, K.O. Evaluation of prolonged fatigue post-west nile virus infection and association of fatigue with elevated antiviral and proinflammatory cytokines. *Viral Immunol.* **2014**, *27*, 327–333. [CrossRef] [PubMed]
24. Hasbun, R.; Garcia, M.N.; Kellaway, J.; Baker, L.; Salazar, L.; Woods, S.P.; Murray, K.O. West nile virus retinopathy and associations with long term neurological and neurocognitive sequelae. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148898. [CrossRef] [PubMed]
25. Leis, A.A.; Stokic, D.S. Neuromuscular Manifestations of West Nile Virus Infection. *Front. Neurol.* **2012**, *3*, 37. [CrossRef]
26. Schafernak, K.T.; Bigio, E.H. West Nile virus encephalomyelitis with polio-like paralysis & nigral degeneration. *Can. J. Neurol. Sci.* **2006**, *33*, 407–410.
27. Danics, K.; Forrest, S.L.; Kapas, I.; Erber, I.; Schmid, S.; Törő, K.; Majtenyi, K.; Kovacs, G.G. Neurodegenerative proteinopathies associated with neuroinfections. *J. Neural Transm.* **2021**, *128*, 1551–1566. [CrossRef]
28. Kärber, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1931**, *162*, 480–483. [CrossRef]
29. Clé, M.; Constant, O.; Barthelemy, J.; Desmetz, C.; Martin, M.F.; Lapeyre, L.; Cadar, D.; Savini, G.; Teodori, L.; Monaco, F.; et al. Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells. *J. Neuroinflamm.* **2021**, *18*, 11. [CrossRef]
30. Cecchelli, R.; Aday, S.; Sevin, E.; Almeida, C.; Culot, M.; Dehouck, L.; Coisne, C.; Engelhardt, B.; Dehouck, M.P.; Ferreira, L. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99733. [CrossRef]
31. Heymans, M.; Figueiredo, R.; Dehouck, L.; Francisco, D.; Sano, Y.; Shimizu, F.; Kanda, T.; Bruggmann, R.; Engelhardt, B.; Winter, P.; et al. Contribution of brain pericytes in blood-brain barrier formation and maintenance: A transcriptomic study of cocultured human endothelial cells derived from hematopoietic stem cells. *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17*, 48. [CrossRef]
32. Candela, P.; Saint-Pol, J.; Kuntz, M.; Boucau, M.C.; Lamartiniere, Y.; Gosselet, F.; Fenart, L. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res.* **2015**, *1594*, 15–26. [CrossRef]
33. Errett, J.S.; Suthar, M.S.; McMillan, A.; Diamond, M.S.; Gale, M. The essential, nonredundant roles of RIG-I and MDA5 in detecting and controlling West Nile virus infection. *J. Virol.* **2013**, *87*, 11416–11425. [CrossRef]

34. Klein, R.S.; Lin, E.; Zhang, B.; Luster, A.D.; Tollett, J.; Samuel, M.A.; Engle, M.; Diamond, M.S. Neuronal CXCL10 directs $CD8^+$ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *J. Virol.* **2005**, *79*, 11457–11466. [CrossRef]
35. Kumar, M.; Belcaid, M.; Nerurkar, V.R. Identification of host genes leading to West Nile virus encephalitis in mice brain using RNA-seq analysis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26350. [CrossRef]
36. Wang, T.; Town, T.; Alexopoulou, L.; Anderson, J.F.; Fikrig, E.; Flavell, R.A. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 1366–1373. [CrossRef]
37. Garcia-Tapia, D.; Hassett, D.E.; Mitchell, W.J.; Johnson, G.C.; Kleiboeker, S.B. West Nile virus encephalitis: Sequential histopathological and immunological events in a murine model of infection. *J. Neurovirol.* **2007**, *13*, 130–138. [CrossRef]
38. Peña, J.; Plante, J.A.; Carillo, A.C.; Roberts, K.K.; Smith, J.K.; Juelich, T.L.; Beasley, D.W.C.; Freiberg, A.N.; Labute, M.X.; Naraghi-Arani, P. Multiplexed digital mRNA profiling of the inflammatory response in the West Nile Swiss Webster mouse model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3216. [CrossRef] [PubMed]
39. King, N.J.C.; Getts, D.R.; Getts, M.T.; Rana, S.; Shrestha, B.; Kesson, A.M. Immunopathology of flavivirus infections. *Immunol. Cell Biol.* **2007**, *85*, 33–42. [CrossRef]
40. Puerta-Guardo, H.; Glasner, D.R.; Espinosa, D.A.; Biering, S.B.; Patana, M.; Ratnasiri, K.; Wang, C.; Beatty, P.R.; Harris, E. Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 1598–1613.e8. [CrossRef]
41. Teuwen, L.A.; Geldhof, V.; Pasut, A.; Carmeliet, P. COVID-19: The vasculature unleashed. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 389–391. [CrossRef]
42. Wimmer, I.; Tietz, S.; Nishihara, H.; Deutsch, U.; Sallusto, F.; Gosselet, F.; Lyck, R.; Muller, W.A.; Lassmann, H.; Engelhardt, B. PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular T-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 711. [CrossRef] [PubMed]
43. Constant, O.; Barthelemy, J.; Bolloré, K.; Tuaillon, E.; Gosselet, F.; Chable-Bessia, C.; Merida, P.; Muriaux, D.; Van de Perre, P.; Salinas, S.; et al. SARS-CoV-2 Poorly Replicates in Cells of the Human Blood-Brain Barrier without Associated Deleterious Effects. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 2914. [CrossRef] [PubMed]
44. Clé, M.; Eldin, P.; Briant, L.; Lannuzel, A.; Simonin, Y.; Van De Perre, P.; Cabié, A.; Salinas, S. Neurocognitive impacts of arbovirus infections. *J. Neuroinflamm.* **2020**, *17*, 233. [CrossRef] [PubMed]
45. Clé, M.; Desmetz, C.; Barthelemy, J.; Martin, M.F.; Constant, O.; Maarifi, G.; Foulongne, V.; Bolloré, K.; Glasson, Y.; De Bock, F.; et al. Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier. *MBio* **2020**, *11*, e01183-20. [CrossRef]
46. Clé, M.; Barthelemy, J.; Desmetz, C.; Foulongne, V.; Lapeyre, L.; Bolloré, K.; Tuaillon, E.; Erkilic, N.; Kalatzis, V.; Lecollinet, S.; et al. Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008223. [CrossRef]
47. Habarugira, G.; Suen, W.W.; Hobson-Peters, J.; Hall, R.A.; Bielefeldt-Ohmann, H. West nile virus: An update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and "One health" implications. *Pathogens* **2020**, *9*, 589. [CrossRef]
48. Long, D.; Deng, X.; Singh, P.; Loeb, M.; Lauring, A.S.; Seielstad, M. Identification of genetic variants associated with susceptibility to West Nile virus neuroinvasive disease. *Genes Immun.* **2016**, *17*, 298–304. [CrossRef]
49. Desai, P.; Janova, H.; White, J.P.; Reynoso, G.V.; Hickman, H.D.; Baldridge, M.T.; Urban, J.F.; Stappenbeck, T.S.; Thackray, L.B.; Diamond, M.S. Enteric helminth coinfection enhances host susceptibility to neurotropic flaviviruses via a tuft cell-IL-4 receptor signaling axis. *Cell* **2021**, *184*, 1214. [CrossRef]
50. Lanteri, M.C.; O'Brien, K.M.; Purtha, W.E.; Cameron, M.J.; Lund, J.M.; Owen, R.E.; Heitman, J.W.; Custer, B.; Hirschkorn, D.F.; Tobler, L.H.; et al. Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 3266–3277. [CrossRef]
51. Ramos, H.J.; Lanteri, M.C.; Blahnik, G.; Negash, A.; Suthar, M.S.; Brassil, M.M.; Sodhi, K.; Treuting, P.M.; Busch, M.P.; Norris, P.J.; et al. IL-1β signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1003039. [CrossRef]
52. Zidovec-Lepej, S.; Vilibic-Cavlek, T.; Barbic, L.; Ilic, M.; Savic, V.; Tabain, I.; Ferenc, T.; Grgic, I.; Gorenec, L.; Bogdanic, M.; et al. Antiviral Cytokine Response in Neuroinvasive and Non-Neuroinvasive West Nile Virus Infection. *Viruses* **2021**, *13*, 342. [CrossRef]
53. Durrant, D.M.; Robinette, M.L.; Klein, R.S. IL-1R1 is required for dendritic cell-mediated T cell reactivation within the CNS during west nile virus encephalitis. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 503–516. [CrossRef]
54. Bardina, S.V.; Brown, J.A.; Michlmayr, D.; Hoffman, K.W.; Sum, J.; Pletnev, A.G.; Lira, S.A.; Lim, J.K. Chemokine Receptor Ccr7 Restricts Fatal West Nile Virus Encephalitis. *J. Virol.* **2017**, *91*, e02409-16. [CrossRef]
55. Wynn, T.A. Type 2 cytokines: Mechanisms and therapeutic strategies. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 271–282. [CrossRef]
56. Weatherhead, J.E.; Miller, V.E.; Garcia, M.N.; Hasbun, R.; Salazar, L.; Dimachkie, M.M.; Murray, K.O. Long-term neurological outcomes in West Nile virus-infected patients: An observational study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *92*, 1006–1012. [CrossRef]
57. Varatharaj, A.; Galea, I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav. Immun.* **2017**, *60*, 1–12. [CrossRef]
58. Kumar, M.; Verma, S.; Nerurkar, V.R. Pro-inflammatory cytokines derived from West Nile virus (WNV)-infected SK-N-SH cells mediate neuroinflammatory markers and neuronal death. *J. Neuroinflamm.* **2010**, *7*, 73. [CrossRef]
59. Leonard, B.E. Inflammation and depression: A causal or coincidental link to the pathophysiology? *Acta Neuropsychiatr.* **2018**, *30*, 1–16. [CrossRef]

60. Khovidhunkit, W.; Kim, M.S.; Memon, R.A.; Shigenaga, J.K.; Moser, A.H.; Feingold, K.R.; Grunfeld, C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: Mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 1169–1196. [CrossRef]
61. Cunningham, C. Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia* **2013**, *61*, 71–90. [CrossRef]
62. Patel, H.; Sander, B.; Nelder, M.P. Long-term sequelae of West Nile virus-related illness: A systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15*, 951–959. [CrossRef]
63. Leis, A.A.; Grill, M.F.; Goodman, B.P.; Sadiq, S.B.; Sinclair, D.J.; Vig, P.J.S.; Bai, F. Tumor Necrosis Factor-Alpha Signaling May Contribute to Chronic West Nile Virus Post-infectious Proinflammatory State. *Front. Med.* **2020**, *7*, 164. [CrossRef]
64. Janigro, D.; Bailey, D.M.; Lehmann, S.; Badaut, J.; O'Flynn, R.; Hirtz, C.; Marchi, N. Peripheral Blood and Salivary Biomarkers of Blood–Brain Barrier Permeability and Neuronal Damage: Clinical and Applied Concepts. *Front. Neurol.* **2021**, *11*, 577312. [CrossRef]
65. Le, N.D.; Muri, L.; Grandgirard, D.; Kuhle, J.; Leppert, D.; Leib, S.L. Evaluation of neurofilament light chain in the cerebrospinal fluid and blood as a biomarker for neuronal damage in experimental pneumococcal meningitis. *J. Neuroinflamm.* **2020**, *17*, 293. [CrossRef] [PubMed]
66. Grygorczuk, S.; Parczewski, M.; Świerzbińska, R.; Czupryna, P.; Moniuszko, A.; Dunaj, J.; Kondrusik, M.; Pancewicz, S. The increased concentration of macrophage migration inhibitory factor in serum and cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis. *J. Neuroinflamm.* **2017**, *14*, 126. [CrossRef] [PubMed]
67. Canet, G.; Dias, C.; Gabelle, A.; Simonin, Y.; Gosselet, F.; Marchi, N.; Makinson, A.; Tuaillon, E.; Van de Perre, P.; Givalois, L.; et al. HIV Neuroinfection and Alzheimer's Disease: Similarities and Potential Links? *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 307. [CrossRef] [PubMed]
68. De Chiara, G.; Marcocci, M.E.; Sgarbanti, R.; Civitelli, L.; Ripoli, C.; Piacentini, R.; Garaci, E.; Grassi, C.; Palamara, A.T. Infectious Agents and Neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* **2012**, *46*, 614–638. [CrossRef]
69. Ayub, M.; Jin, H.K.; Bae, J.-S. The blood cerebrospinal fluid barrier orchestrates immunosurveillance, immunoprotection, and immunopathology in the central nervous system. *BMB Rep.* **2021**, *54*, 196–202. [CrossRef]
70. Brown, L.S.; Foster, C.G.; Courtney, J.M.; King, N.E.; Howells, D.W.; Sutherland, B.A. Pericytes and neurovascular function in the healthy and diseased brain. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 282. [CrossRef]
71. Neumann, M.; Sampathu, D.M.; Kwong, L.K.; Truax, A.C.; Micsenyi, M.C.; Chou, T.T.; Bruce, J.; Schuck, T.; Grossman, M.; Clark, C.M.; et al. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* **2006**, *314*, 130–133. [CrossRef]
72. Cairns, N.J.; Bigio, E.H.; Mackenzie, I.R.A.; Neumann, M.; Lee, V.M.Y.; Hatanpaa, K.J.; White, C.L.; Schneider, J.A.; Grinberg, L.T.; Halliday, G.; et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: Consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol.* **2007**, *114*, 5–22. [CrossRef]
73. De Boer, E.M.J.; Orie, V.K.; Williams, T.; Baker, M.R.; De Oliveira, H.M.; Polvikoski, T.; Silsby, M.; Menon, P.; Van Den Bos, M.; Halliday, G.M.; et al. TDP-43 proteinopathies: A new wave of neurodegenerative diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2021**, *92*, 86–95. [CrossRef]
74. James, B.D.; Wilson, R.S.; Boyle, P.A.; Trojanowski, J.Q.; Bennett, D.A.; Schneider, J.A. TDP-43 stage, mixed pathologies, and clinical Alzheimer's-type dementia. *Brain* **2016**, *139*, 2983–2993. [CrossRef]
75. Fung, G.; Shi, J.; Deng, H.; Hou, J.; Wang, C.; Hong, A.; Zhang, J.; Jia, W.; Luo, H. Cytoplasmic translocation, aggregation, and cleavage of TDP-43 by enteroviral proteases modulate viral pathogenesis. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 2087–2097. [CrossRef]
76. Østergaard, C.; Johansen, J.S.; Benfield, T.; Price, P.A.; Lundgren, J.D. YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2002**, *9*, 598–604. [CrossRef]
77. Craig-Schapiro, R.; Perrin, R.J.; Roe, C.M.; Xiong, C.; Carter, D.; Cairns, N.J.; Mintun, M.A.; Peskind, E.R.; Li, G.; Galasko, D.R.; et al. YKL-40: A novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* **2010**, *68*, 903–912. [CrossRef]
78. Hellwig, K.; Kvartsberg, H.; Portelius, E.; Andreasson, U.; Oberstein, T.J.; Lewczuk, P.; Blennow, K.; Kornhuber, J.; Maler, J.M.; Zetterberg, H.; et al. Neurogranin and YKL-40: Independent markers of synaptic degeneration and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* **2015**, *7*, 4–11. [CrossRef]
79. Czupryna, P.; Kulczyńka-Przybik, A.; Mroczko, B.; Wondim, M.A.; Grygorczuk, S.; Borawski, K.; Pancewicz, S.; Moniuszko-Malinowska, A. Assessment of the YKL-40 concentration in patients with tick-borne encephalitis. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2022**, *13*, 101895. [CrossRef]
80. Schoneveld, L.; Ladang, A.; Henket, M.; Frix, A.N.; Cavalier, E.; Guiot, J.; Schoneveld, L.; Ladang, A.; Henket, M.; Frix, A.; et al. YKL-40 as a new promising prognostic marker of severity in COVID infection. *Crit. Care* **2021**, *25*, 66. [CrossRef]
81. Fraisier, C.; Papa, A.; Granjeaud, S.; Hintzen, R.; Martina, B.; Camoin, L.; Almeras, L. Cerebrospinal fluid biomarker candidates associated with human WNV neuroinvasive disease. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93637. [CrossRef]
82. Cicognola, C.; Janelidze, S.; Hertze, J.; Zetterberg, H.; Blennow, K.; Mattsson-Carlgren, N.; Hansson, O. Plasma glial fibrillary acidic protein detects Alzheimer pathology and predicts future conversion to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. *Alzheimer's Res. Ther.* **2021**, *13*, 68. [CrossRef] [PubMed]
83. Sporer, B.; Missler, U.; Magerkurth, O.; Koedel, U.; Wiesmann, M.; Pfister, H.W. Evaluation of CSF glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a putative marker for HIV-associated dementia. *Infection* **2004**, *32*, 20–23. [CrossRef] [PubMed]

84. Fan, Y.; He, J.J. HIV-1 Tat Induces Unfolded Protein Response and Endoplasmic Reticulum Stress in Astrocytes and Causes Neurotoxicity through Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Activation and Aggregation. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 22819. [CrossRef] [PubMed]
85. Mella, C.; Figueroa, C.D.; Otth, C.; Ehrenfeld, P. Involvement of Kallikrein-Related Peptidases in Nervous System Disorders. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 166. [CrossRef] [PubMed]
86. Phipps, H.W.; Longo, L.M.; Blaber, S.I.; Blaber, M.; Vanlandingham, J.W. Kallikrein-related peptidase 6: A biomarker for traumatic brain injury in the rat. *Brain Inj.* **2013**, *27*, 1698–1706. [CrossRef] [PubMed]
87. Bando, Y.; Hagiwara, Y.; Suzuki, Y.; Yoshida, K.; Aburakawa, Y.; Kimura, T.; Murakami, C.; Ono, M.; Tanaka, T.; Jiang, Y.P.; et al. Kallikrein 6 secreted by oligodendrocytes regulates the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* **2018**, *66*, 359–378. [CrossRef] [PubMed]
88. Patra, K.; Soosaipillai, A.; Sando, S.B.; Lauridsen, C.; Berge, G.; Møller, I.; Grøntvedt, G.R.; Bråthen, G.; Begcevic, I.; Moussaud, S.; et al. Assessment of kallikrein 6 as a cross-sectional and longitudinal biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* **2018**, *10*, 9. [CrossRef]
89. Caucheteux, S.M.; Piguet, V. Kallikrein-6–Regulated Pathways Shed Light on New Potential Targets in Varicella Zoster Virus Infection. *J. Investig. Dermatol.* **2020**, *140*, 741–742. [CrossRef]
90. Kong, L.; Wang, J.; Cheng, J.; Zang, C.; Chen, F.; Wang, W.; Zhao, H.; Wang, Y.; Wang, D. Comprehensive Identification of the Human Secretome as Potential Indicators in Treatment Outcome of HPV-Positive and -Negative Cervical Cancer Patients. *Gynecol. Obstet. Investig.* **2020**, *85*, 405–415. [CrossRef]
91. Hermansson, L.; Yilmaz, A.; Axelsson, M.; Blennow, K.; Fuchs, D.; Hagberg, L.; Lycke, J.; Zetterberg, H.; Gisslén, M. Cerebrospinal fluid levels of glial marker YKL-40 strongly associated with axonal injury in HIV infection. *J. Neuroinflamm.* **2019**, *16*, 16. [CrossRef]
92. Drucker, K.L.; Gianinni, C.; Decker, P.A.; Diamandis, E.P.; Scarisbrick, I.A. Prognostic significance of multiple kallikreins in high-grade astrocytoma. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 565. [CrossRef]
93. Morichi, S.; Kashiwagi, Y.; Takekuma, K.; Hoshika, A.; Kawashima, H. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy. *Int. J. Neurosci.* **2013**, *123*, 17–23. [CrossRef]
94. Soung, A.; Klein, R.S. Viral Encephalitis and Neurologic Diseases: Focus on Astrocytes. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 950–962. [CrossRef]
95. Colucci-D'amato, L.; Speranza, L.; Volpicelli, F. Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7777. [CrossRef]
96. Li, G.; Peskind, E.R.; Millard, S.P.; Chi, P.; Sokal, I.; Yu, C.E.; Bekris, L.M.; Raskind, M.A.; Galasko, D.R.; Montine, T.J. Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5424. [CrossRef]
97. Kim, H.J.; Tsao, J.W.; Stanfill, A.G. The current state of biomarkers of mild traumatic brain injury. *JCI Insight* **2018**, *3*, e97105. [CrossRef]
98. Solár, P.; Zamani, A.; Kubíčková, L.; Dubový, P.; Joukal, M. Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17*, 35. [CrossRef]
99. Tokunaga, Y.; Kira, R.; Takahata, Y.; Gondo, K.; Mizuno, Y.; Aoki, T.; Hara, T. Neurotrophin-4 and glial cell line-derived neurotrophic factor in cerebrospinal fluid from meningitis/encephalitis patients. *Pediatr. Neurol.* **2002**, *27*, 102–105. [CrossRef]
100. Nosheny, R.L.; Bachis, A.; Aden, S.A.; De Bernardi, M.A.; Mocchetti, I. Intrastriatal administration of human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 reduces glial cell-line derived neurotrophic factor levels and causes apoptosis in the substantia nigra. *J. Neurobiol.* **2006**, *66*, 1311–1321. [CrossRef]
101. Xiang, Y.; Xin, J.; Le, W.; Yang, Y. Neurogranin: A Potential Biomarker of Neurological and Mental Diseases. *Front. Aging Neurosci.* **2020**, *12*, 311. [CrossRef]
102. Guha, D.; Wagner, M.C.E.; Ayyavoo, V. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-mediated neuroinflammation dysregulates neurogranin and induces synaptodendritic injury. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 126. [CrossRef]
103. Stark, K.; Eckart, A.; Haidari, S.; Tirniceriu, A.; Lorenz, M.; Von Brühl, M.L.; Gärtner, F.; Khandoga, A.G.; Legate, K.R.; Pless, R.; et al. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and "instruct" them with pattern-recognition and motility programs. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 41–51. [CrossRef]
104. Wang, W.; Wang, L.; Luo, J.; Xi, Z.; Wang, X.; Chen, G.; Chu, L. Role of a neural cell adhesion molecule found in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for epilepsy. *Neurochem. Res.* **2012**, *37*, 819–825. [CrossRef]
105. Laudanski, K.; Yakhkind, A.; Restrepo, M.; Draham, L.; Lang, A.E. Guillain–Barré Syndrome in COVID-19—The Potential Role of NCAM-1 and Immunotherapy. *BioMed* **2021**, *1*, 80–92. [CrossRef]

3 Circulation des virus Usutu et West-Nile

Nous venons de décrire que l'infection humaine par USUV et WNV, bien que pas encore totalement caractérisée, donne lieu à des complications neurologiques graves. En effet, de manière descriptive, nous avons montré que les deux virus étaient capables d'interagir avec la BHE pour infecter le SNC. De plus, il existe de forte interactions avec les cellules immunes qui renforcent la neuroinflammation propice à la clairance des virus mais délétères pour l'homéostasie du SNC. D'ailleurs, il semblerait que cette neuroinflammation, dans le cas des infections par WNV, puissent être suivie et permette une prise en charge adaptée des patients.

Cependant, et pour rappel, il n'existe actuellement pas de traitement contre ces infections mise à part la prise en charge symptomatologique. De plus, le caractère émergent de ces virus en fait des candidats à la surveillance dans le cadre de programme de santé publique (comme cela est le cas pour WNV de façon saisonnière). Montpellier et ses environs se trouvent dans une région du sud de la France qui comporte des critères importants favorisant la circulation d'arbovirus et plus particulièrement des *Flavivirus* WNV et USUV. En effet, Montpellier en elle-même est une zone urbaine avec une forte démographie, elle se trouve être aussi proche de la région camarguaise qui est une vaste zone humide d'espaces sauvages avec un climat Méditerranéen. La Camargue est aussi une région dans laquelle de nombreuses espèces d'oiseaux migrateurs et sauvages circulent, on y retrouve aussi d'autres espèces animales, comme les chevaux, et enfin elle abrite une forte densité et une grande diversité de moustiques[534].

3.1 Exposition aux virus USUV et WNV, au zoo de Montpellier

Les réseaux de surveillance de circulation des virus peuvent s'articuler de différentes manières et dans différents lieux. Concernant les arbovirus qui possèdent des cycles de transmission complexe, comportant parfois plusieurs types de réservoirs ou de vecteurs, la surveillance peut être un challenge important. Dans ce contexte, les zoos peuvent être des sites de référence, en effet, on y retrouve une large variété d'espèces animales soumises à des suivis vétérinaires réguliers. Par ailleurs, les animaux de ces zoos sont généralement à proximité de zone urbaine ou de zone avec une densité humaine importante[535–537]. De plus, il a déjà été montré que des épidémies d'arbovirus pouvaient avoir comme origine les zoos, comme celui du Bronx aux Etats-Unis, où le virus WNV a pu émergé en 1999[44], ou celui de Vienne en Autriche qui fût le point d'émergence de USUV dans les populations aviaires[99].

Dans cette étude, nous avons pu analyser l'exposition des animaux du zoo de Montpellier aux virus USUV et WNV entre 2003 et 2019. Pour se faire nous avons analysé les sérums de ces animaux (411 échantillons au total), en premier lieu avec un test Elisa pan-flavivirus, puis les échantillons positifs ont été testés en séroneutralisation contre USUV et WNV afin de déterminer précisément le type de virus impliqué.

Parmi les échantillons aviaires, nous avons trouvé une proportion plus importante d'individus porteurs d'anticorps contre USUV que contre WNV. Tandis que chez les mammifères, des anticorps contre USUV ont été retrouvés chez des *Canidae*, et des anticorps contre WNV ont été identifiés chez une gazelle. Pour l'ensemble, les infections semblent avoir eu lieu entre 2016 et 2018 ce qui correspond à une période pendant laquelle les deux *Flavivirus* ont particulièrement circulé en Europe. Ces travaux permettent aussi de mettre en évidence certains hôtes mammifères qui pourraient être des sentinelles dans la surveillance des virus USUV et WNV.

pathogens

MDPI

Article

Evidence of Exposure to USUV and WNV in Zoo Animals in France

Orianne Constant [1,†], Karine Bollore [1,†], Marion Clé [1], Jonathan Barthelemy [1], Vincent Foulongne [1], Baptiste Chenet [2], David Gomis [2], Laurie Virolle [2], Serafin Gutierrez [3], Caroline Desmetz [4], Rayane Amaral Moares [5], Cécile Beck [5], Sylvie Lecollinet [5], Sara Salinas [1] and Yannick Simonin [1,*]

1 Pathogenesis and Control of Chronic Infections, University of Montpellier, INSERM, EFS, 34000 Montpellier, France; orianne.constant@gmail.com (O.C.); karine.bollore@umontpellier.fr (K.B.); marion.cle@umontpellier.fr (M.C.); jonathan.barthelemy@inserm.fr (J.B.); v-foulongne@chu-montpellier.fr (V.F.); sara.salinas@inserm.fr (S.S.)
2 Parc de Lunaret—Zoo de Montpellier, 34090 Montpellier, France; Baptiste.CHENET@ville-montpellier.fr (B.C.); David.GOMIS@ville-montpellier.fr (D.G.); Laurie.VIROLLE@ville-montpellier.fr (L.V.)
3 ASTRE Research Unit, CIRAD, INRA, 34398 Montpellier, France; serafin.gutierrez@cirad.fr
4 bBioCommunication en CardioMétabolique (BC2M), Montpellier University, 34000 Montpellier, France; caroline.desmetz@umontpellier.fr
5 UMR 1161 Virology, ANSES, INRAE, ENVA, ANSES Animal Health Laboratory, EURL for Equine Diseases, 94704 Maisons-Alfort, France; rayane.amaralmoraes@anses.fr (R.A.M.); Cecile.BECK@anses.fr (C.B.); Sylvie.LECOLLINET@anses.fr (S.L.)
* Correspondence: yannick.simonin@umontpellier.fr; Tel.: +33-(0)4-3435-9114
† Equally contributed.

Received: 22 October 2020; Accepted: 29 November 2020; Published: 30 November 2020

check for updates

Abstract: West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV) are zoonotic arboviruses. These flaviviruses are mainly maintained in the environment through an enzootic cycle involving mosquitoes and birds. Horses and humans are incidental, dead-end hosts, but can develop severe neurological disorders. Nevertheless, there is little data regarding the involvement of other mammals in the epidemiology of these arboviruses. In this study, we performed a serosurvey to assess exposure to these viruses in captive birds and mammals in a zoo situated in the south of France, an area described for the circulation of these two viruses. A total of 411 samples comprising of 70 species were collected over 16 years from 2003 to 2019. The samples were first tested by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. The positive sera were then tested using virus-specific microneutralization tests against USUV and WNV. USUV seroprevalence in birds was 10 times higher than that of WNV (14.59% versus 1.46%, respectively). Among birds, greater rhea (*Rhea Americana*) and common peafowl (*Pavo cristatus*) exhibited the highest USUV seroprevalence. Infections occurred mainly between 2016–2018 corresponding to a period of high circulation of these viruses in Europe. In mammalian species, antibodies against WNV were detected in one dama gazelle (*Nanger dama*) whereas serological evidence of USUV infection was observed in several *Canidae*, especially in African wild dogs (*Lycaon pictus*). Our study helps to better understand the exposure of captive species to WNV and USUV and to identify potential host species to include in surveillance programs in zoos.

Keywords: usutu virus; west nile virus; flavivirus; arbovirus; seroprevalence; zoological garden

1. Introduction

Arboviruses are emerging pathogens on the European continent and, more generally worldwide, although they are already well established in various regions, particularly in Africa and Latin America. Among arboviruses, several flaviviruses (*Flaviviridae* family), e.g West Nile (WNV), Usutu (USUV), tick born encephalitis virus (TBEV), and Meaban (MEAV) viruses are the main flaviviruses that have been known to circulate in France [1–4]. WNV and USUV belong to the Japanese encephalitis (JEV) serocomplex in the *Flavivirus* genus and share many common features [5,6]. Their transmission cycle mainly involves ornithophilic mosquitoes such as *Culex pipiens* and birds. Wild birds play a central role in flavivirus epidemiology as they are the main amplifying hosts in the wilderness. They develop a strong and transitory viremia, are capable of infecting bird-biting mosquitoes, and may contribute to the spread of the virus with their migratory behavior [3]. Moreover, WNV and USUV occasionally infect other vertebrates including humans and horses [7]. TBEV, in the TBEV serocomplex is maintained in an enzootic cycle involving hard ticks (Ixodes ricinus in Western Europe) and rodents as the main reservoir [8]. Birds are suspected to play a role in the spread of the virus [9]. MEAV is a soft tick-borne flavivirus transmitted by *Ornithodoros maritimus* ticks among seabird colonies and has only been identified in Brittany on the Meaban island [1].

WNV was first detected in the West Nile region of Uganda in 1937 from the blood of a febrile woman [10]. Its global distribution has greatly expanded over the last two decades and is currently common in countries of Africa, the Middle East, India, Australia, Central and Southern Europe, and in North, Central, and South America where it can cause disease outbreaks [11–13]. Natural exposure to WNV has also been detected in a wide range of mammals (more than 100 species) [14]. USUV has gained the attention of the scientific community due to its recent incursions in Europe. It was isolated for the first time in South Africa in 1959 [15,16]. Since then, this emerging arbovirus has spread out of Africa, mainly in Europe [3]. Birds and humans infected by USUV can develop neuroinvasive pathologies (including encephalitis and meningoencephalitis). Serologic and molecular evidence of USUV presence in blood donors suggests the silent spread of this virus among asymptomatic humans [3]. Beyond birds and humans, USUV has also been detected in different mammals such as horses, dogs, wild boars, wild ruminants, bats, rodents, and shrews [17–24]. Seroepidemiological studies showed that USUV is probably endemic in several European countries. Whereas WNV is involved in occasional outbreaks or endemic in some of them, mainly in Southern Europe such as in Greece, Italy, or Spain [3,25]. Recently, increased and concomitant transmission of both viruses has been reported in Europe. Beyond a record drought and heat wave, the summer of 2018 saw the largest WNV epidemic reported in terms of countries involved. A total of 16 European countries, including France, were involved and 2083 human cases and 181 deaths were listed [26]. Similarly, the largest epizootic of USUV in Europe was observed in 2018, inducing a massive death of wild birds [3,27,28].

TBEV is the arbovirus with the highest public health impact in Europe. Thousands of TBEV neurological cases are recorded every year in Europe [29]. Human infections can occur through the bite from TBEV-infected ticks and more rarely through the consumption of unpasteurized milk or milk products from cattle, goats, or sheep. TBEV is endemic in many European countries, including the Baltic and Scandinavian countries, Slovenia, and the Czech Republic. In France, the virus has been reported in Eastern France, mainly in Alsace and since 2003 in the Alps (Haute-Savoie) and more recently in Auvergne-Rhône-Alpes (Loire and Haute-Loire) [2,30]. TBEV infections have been detected more largely in Eastern France in a serosurvey on wild boars and roe deer [31].

Monitoring viral circulation is difficult, especially for viruses with complex transmission cycles. Moreover, serological cross-reactions between flaviviruses can hamper the rapid identification of circulating viruses. Elisa tests suffer from a lack of specificity and need to be confirmed by seroneutralization assays. Zoological gardens represent sites of interest to gain knowledge about the distribution of emerging zoonotic pathogens in different animal species. Therefore, zoos have been proposed as sites adapted to the surveillance of zoonotic viruses, including WNV and USUV [32–36]. These sites generally contain a large diversity of captive species, including birds and mammals,

and are usually close to or within urban areas. Moreover, since captive animals are regularly monitored by veterinarians, samples can be easily available. In addition, WNV and USUV have been frequently detected in birds in zoological gardens and associated with important mortality in some species [23,24,27,28]. Nevertheless, few studies have been published on WNV or USUV exposure in zoo animals [23–26]. Montpellier zoo (south of France) is close to the Camargue area, a wetland that houses a large diversity of wild bird species, including migratory birds and various mosquito populations. This environment is considered to favor the transmission of USUV and WNV [29–32]. In this study, we evaluated in priority the seropositivity against WNV and USUV in captive birds and exotic mammals from the Montpellier zoological garden. TBEV and MEAV circulation has not been evidenced in the south of France. Consequently, when positive samples of competitive enzyme linked immunoabsorbent assay (cELISA) were found negative in WNV and USUV MNTs, TBEV and MEAV virus neutralization assays were carried out to investigate infections by alternative flaviviruses. The objective was to investigate the prevalence of flavivirus infections in a large variety of species and to assess the value of integrating their monitoring within the framework of WNV and USUV surveillance programs. Our results enlarge current knowledge on mammals and birds potentially infected by these viruses and point to species with high seroprevalence as candidates for sentinel surveillance.

2. Results

2.1. Circulation of USUV/WNV in Zoo Birds

A point to note is that no obvious abnormal bird mortality was observed in Montpellier zoo. Analysis in birds were carried out on 137 specimens of 20 different species (Table 1). Using competitive enzyme linked immunoabsorbent assay (cELISA), we identified antibodies against flaviviruses in 23 out of 137 birds (16.79%, CI95%: 10.53–23.05). Among them, 20 specimens tested positive for USUV-specific antibodies by virus-specific micro neutralization test (MNT) (14.59%, CI95%: 8.686–20.51) and 2 specimens for WNV-specific antibodies (1.45%, CI95%: 0.0–3.46). Overall, our results show a greater proportion of positive specimens for USUV than for WNV.

Moreover, one common ostrich (*Struthio camelus*) presented antibodies against an undetermined flavivirus as we did not detect TBEV or MEAVS-specific antibodies by virus-specific micro neutralization test (Table 1). The two positive birds for WNV were one orange-winged amazon (*Amazona amazonica*) and one marabou stork (*Leptoptilos crumenifer*). The individuals positive to USUV were one Abyssinian ground hornbill (*Bucorvus abyssinicus*), one scarlet ibis (*Eudocimus ruber*), and two emus (*Dromaius novaehollandiae*). We also found antibodies against USUV in 6 common peafowl (*Pavo cristatus*) and 10 greater rhea (*Rhea Americana*) representing respectively 25% and 46.7% seroprevalence in the tested populations. These species, to the best of our knowledge, have never been described as susceptible to flavivirus infection. We analyzed the samples collected from the same animals over several years in order to explore infection temporality. This analysis provided information on viral circulation over time, particularly since USUV and WNV have been only quite recently widely reported in the area. Despite the lack of a continuous sampling over years, we were able to study the temporality of infection for some of the animals. Interestingly longitudinal studies showed that all the sequentially sampled animals found seropositive on the first sampling stayed seropositive throughout the study period as all seropositive birds in 2016 were also positive in 2018 (5/5) (Table A1). Moreover, the majority of specimens were infected between 2016 to 2018 (64.2%, 9/14 for WNV or USUV-positive birds) while the remaining samples show that WNV and USUV were introduced before 2016 in the area.

Table 1. Birds species tested by ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) and for ELISA-positive samples by MNT (microneutralization tests) for West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV).

Avian Species							
Species	Species	Collection	Nb of		MNT Antibodies Titer		
(English Name)	(Scientific Name)	Date	Specimens	cElisa	USUV	WNV	Conclusion
Orange-winged amazon	*Amazona amazonica*	2016–2018	8	1	Neg	10	1/8 WNV
Brazilian teal	*Amazonetta brasiliensis*	2016–2018	6	0	Neg	Neg	Neg
Buffon's macaw	*Ara macao*	2016–2018	2	0	Neg	Neg	Neg
Great green macaw	*Ara ambiguus*	2016–2018	4	0	Neg	Neg	Neg
White-winged duck	*Asarcornis scutulata*	2016	2	0	Neg	Neg	Neg
Abyssinian ground hornbill	*Bucorvus abyssinicus*	2016–2018	5	1	640	20	1/5 USUV
Greater vasa parrot	*Coracopsis vasa*	2019	2	0	Neg	Neg	Neg
Southern screamer	*Chauna torquata*	2016–2018	2	0	Neg	Neg	Neg
White-faced whistling duck	*Dendrocygna viduata*	2016–2018	1	0	Neg	Neg	Neg
Emu	*Dromaius novaehollandiae*	2016–2018	5	2	160	20	2/5 USUV
Scarlet ibis	*Eudocimus ruber*	2016–2018	38	1	640	10	1/38 USUV
Brahma chicken	*Gallus domesticus brahma*	2016	4	0	Neg	Neg	Neg
Marabou stork	*Leptoptilos crumenifer*	2016–2018	3	1	10	40	1/3 WNV
Blue-crowned motmot	*Momotus momota*	2019	1	0	Neg	Neg	Neg
Common peafowl	*Pavo cristatus*	2016–2018	24	6	10	Neg	6/24 USUV
					10	Neg	
					10	Neg	
					20	Neg	
					40	Neg	
					40	Neg	
Grey-winged trumpeter	*Psophia crepitans*	2019	2	0	Neg	Neg	Neg
Greater rhea	*Rhea americana*	2016–2018	21	10	640	10	10/21 USUV
					640	Neg	
					320	10	
					640	10	
					320	Neg	
					320	Neg	
					640	10	
					640	10	
					40	10	
					20	Neg	
African comb duck	*Sarkidiornis melanotos*	2016–2018	3	0	Neg	Neg	Neg
Common ostrich	*Struthio camelus*	200–20016	3	1	Neg	Neg	Other flavivirus
Red-crested turaco	*Tauraco erythrolophus*	2015	1	0	Neg	Neg	

Legend: In seropositive birds, titers for USUV and WNV are indicated. Titer was considered specific when MNT titer was at least fourfold higher against one virus compared to the other.

2.2. Circulation of USUV/WNV in Zoo Mammals

The analysis of seroprevalence in mammals was performed on 274 specimens of 50 different species (Table 2). A total of 11 mammals were positive with the pan-flavivirus ELISA kit (4.01%, CI95%:

1.69–6.33). Similarly to our results with birds, most of the positives mammals had antibodies against USUV, including one Asian lion (*Panthera leo persica*), one maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), one Iberian wolf (*Canis lupus signatus*), and two African wild dogs (*Lycaon pictus*) (Table 2). In contrast, we detected antibodies against WNV in one dama gazelle (*Nanger dama*) (Table 2). Three animals presented antibodies against non-identified flaviviruses (*Acinonyx jubatus*, *Camelus dromedarieus*, and *Panthera leo leo*) (the corresponding sera turned out to be negative in TBEV and MEAV neutralization assays). Thus, according to the available data, only a small proportion of exotic mammals' species was exposed to USUV or WNV infections. African wild dog has never been identified as a susceptible species to infection by USUV. To confirm the susceptibility of this Canidae to USUV infection, we analyzed the sera of 8 African wild dogs from another zoological garden (Réserve Africaine de Sigean) located 100 km from Montpellier zoo, also in the south of France. We identified two more animals with antibodies against USUV confirming a relatively high prevalence for USUV in this species (33.3%, 4/12).

Among all mammalians and more particularly in the order *Carnivora*, *Canidae* presented the highest USUV seroprevalence as we detected 25% (CI95%: 7.67–42.32) of positive specimens (Table A2).

To conclude, in this study statistically significant associations between seropositivity and sex or age were not observed. Among the species for which a relatively large sampling was available, Greater rhea (10/21) and to a lesser extent African wild dogs (4/12) had the highest infection rates. Blood samples from species showing high seroprevalence were additionally analyzed by RT-PCR for the presence of USUV or WNV RNA but we did not identify acute viral infection in these available samples.

Table 2. Mammals species tested by ELISA and by MNT for ELISA-positive samples.

Mammal Species							
Species (English Name)	Species (Scientific Name)	Collection Date	Nb of Specimens	MNT Antibodies Titer			Conclusion
				cELISA	USUV	WNV	
Cheetah	*Acinonyx jubatus*	2016–2018	6	1	Neg	Neg	Other flavivirus
Addax	*Addax nasomaculatus*	2015–2019	12	Neg	Neg	Neg	Neg
Black howler	*Alouatta caraya*	2015–2018	3	Neg	Neg	Neg	Neg
Barbary sheep	*Ammotragus lervia*	2014–2019	10	Neg	Neg	Neg	Neg
Hog deer	*Axis porcinus*	2016–2018	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Sichuan takin	*Budorcas taxicolor tibetana*	2015	1	Neg	Neg	Neg	Neg
Common marmoset	*Callithrix jacchus*	2017	1	Neg	Neg	Neg	Neg
Dromedary	*Camelus dromedarius*	2016–2018	2	1	Neg	Neg	Other flavivirus
Iberian wolf	*Canis lupus signatus*	2013–2018	10	1	40	Neg	1/10 USUV
White rhinoceros	*Ceratotherium simum*	2004–2019	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Sika deer	*Cervus nippon*	2016	8	Neg	Neg	Neg	Neg
Linnaeus's two-toed sloth	*Choloepus didactylus*	2016	2	Neg	Neg	Neg	Neg
Maned wolf	*Chrysocyon brachyurus*	2015–2018	2	1	40	Neg	1/2 USUV
Prehensile-tailed porcupine	*Coendou prehensilis*	2016	2	Neg	Neg	Neg	Neg
Lowland paca	*Cuniculus paca*	2017	3	Neg	Neg	Neg	Neg
Blesbok	*Damaliscus pygargus phillipsi*	2017	1	Neg	Neg	Neg	Neg
Somali wild ass	*Equus africanus*	2004	2	Neg	Neg	Neg	Neg

Table 2. *Cont.*

Mammal Species							
Species (English Name)	Species (Scientific Name)	Collection Date	Nb of Specimens	MNT Antibodies Titer			Conclusion
				cELISA	USUV	WNV	
	somaliensis						
Grévy's zebra	*Equus grevyi*	2017	2	Neg	Neg	Neg	Neg
Persian onager	*Equus hemionus onager*	2004–2016	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Hartmann's	*Equus zebra hartmannae*	2017–2019	4	Neg	Neg	Neg	Neg
mountain zebra							
Crowned lemur	*Eulemur coronatus*	2017–2018	4	Neg	Neg	Neg	Neg
Mongoose lemur	*Eulemur mongoz*	2016–2017	2	Neg	Neg	Neg	Neg
Rothschild's giraffe	*Giraffa camelopardalis*	2015	1	Neg	Neg	Neg	Neg
	rothschildi						
Alaotran gentle	*Hapalemur alaotrensis*	2016–2018	7	Neg	Neg	Neg	Neg
lemur							
Sable antelope	*Hippotragus niger*	2017	4	Neg	Neg	Neg	Neg
Nile lechwe	*Kobus megaceros*	2018–2019	4	Neg	Neg	Neg	Neg
Ring-tailed lemur	*Lemur catta*	2017	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Northern tiger cat	*Leopardus tigrinus*	2018	1	Neg	Neg	Neg	Neg
African wild dog	*Lycaon pictus*	2016–2019	4 [a] + 8 [b]	2 [a] + 2 [b]	40	Neg	4/12 USUV
					160	Neg	
					40 [a]	Neg [a]	
					40 [a]	Neg [a]	
Bennett's wallaby	*Macropus rufogriseus*	2016–2018	12	Neg	Neg	Neg	Neg
Kirk's dik-dik	*Madoqua kirkii*	2016–2019	4	Neg	Neg	Neg	Neg
Reeves's muntjac	*Muntiacus reevesi*	2017	4	Neg	Neg	Neg	Neg
Giant anteater	*Myrmecophaga tridactyla*	2018	2	Neg	Neg	Neg	Neg
Dama gazelle	*Nanger dama*	2017–2019	14	1	Neg	10	1/14 WNV
Beisa oryx	*Oryx beisa*	2017	6	Neg	Neg	Neg	Neg
Scimitar-horned oryx	*Oryx dammah*	2016–2018	2	Neg	Neg	Neg	Neg
Arabian oryx	*Oryx leucoryx*	2016–2019	6	Neg	Neg	Neg	Neg
Caussenarde Sheep	*Ovis aries*	2016–2019	34	Neg	Neg	Neg	Neg
Cameroon Sheep	*Ovis aries cameroon*	2018–2019	4	Neg	Neg	Neg	Neg
Atlas lion	*Panthera leo leo*	2003–2019	4	1	Neg	Neg	Other flavivirus
Asian lion	*Panthera leo persica*	2017	1	1	40	Neg	1/1 USUV
White-faced saki	*Pithecia pithecia*	2018	1	Neg	Neg	Neg	Neg
Bharal	*Pseudois nayaur*	2015–2019	26	Neg	Neg	Neg	Neg
Emperor tamarin	*Saguinus imperator*	2019	3	Neg	Neg	Neg	Neg
South American tapir	*Tapirus terrestris*	2017	1	Neg	Neg	Neg	Neg
Nyala	*Tragelaphus angasii*	2016–2019	4	Neg	Neg	Neg	Neg
Eastern bongo	Tragelaphus eurycerus	2017–2019	3	Neg	Neg	Neg	Neg
	isaaci						
Common eland	*Tragelaphus oryx*	2016–2019	5	Neg	Neg	Neg	Neg
Lesser kudu	*Tragelaphus imberbis*	2016	2	Neg	Neg	Neg	Neg
Syrian brown bear	*Ursus arctos syriacus*	2015–2017	3	Neg	Neg	Neg	Neg
Red ruffed lemur	*Varecia rubra*	2018–2019	2	Neg	Neg	Neg	Neg
Vicuna	*Vicugna vicugna*	2017–2019	5	Neg	Neg	Neg	Neg

Legend: [a]—Montpellier zoo; [b]—Sigean zoo.

3. Discussion

Among arboviruses, WNV and USUV are neurotropic viruses characterized by an overlapping geographic distribution, host and vector ranges, as well as similar clinical manifestations [7]. The epidemiology of both WNV and USUV in Europe has changed dramatically over the last two decades. Studies performed in Italy provided evidence that USUV circulation in humans seems to be higher than WNV infection in some endemic regions where both viruses circulate [3,12,37,38]. At the end of the 90 s, there have been several reports of WNV outbreaks in Europe. Subsequently, this virus has spread widely in Central and Southern European countries, causing more important epidemics [39–46]. In 2018, WNV infections in Europe increased considerably compared to previous transmission seasons causing the biggest epidemic ever listed on the European continent [26]. This epidemic has affected more people in one year than during the previous 10 years across Europe and was concomitantly associated with a major USUV epidemic affecting several European countries and causing massive mortality in several bird species [3,28,47,48]. In accordance with human epidemiological data, our results suggest that USUV, and to a lesser extend WNV, may have circulated in zoo animals between 2016 and 2018 given that the two-thirds of seropositive animals analyzed were infected between 2016 and 2018. This higher seroprevalence during this period supports observations of an intense transmission in the surveyed area in the 2016–2018 period compared to previous transmission seasons. This exceptional level of viral circulation in 2018 for both USUV and WNV is probably related to several environmental and ecological factors influencing the spreading of these viruses such as elevated temperatures and precipitation anomalies, and other environmental factors that can favor mosquito breading [49,50].

Wild birds play a major role as reservoir hosts and as carriers for zoonotic arboviruses and their arthropod hosts to Europe. Every year, millions of birds migrate between Europe and Africa and play an important role in the spread of viruses to new areas. Both WNV and USUV can commonly infect at least 36 species of birds. Studying the seroprevalence of WNV and USUV in the avian population from zoos is therefore a good way to monitor the circulation of these viruses notably linked to the greater awareness of avian mortality in zoos compared to wild avifauna. Moreover, zoos are places where humans, mosquitoes, and birds are gathered in a relatively small space. Birds from zoological gardens have been described as victims of USUV infection. The first major outbreaks of USUV was identified in 2001 with the death of five great grey owls (*Strix nebulosa*) in a Vienna zoo [34]. In 2006 massive death were also reported in wild and captive avian species members of the orders Passeriformes (blackbirds and sparrows) and Strigiformes (owls) at a Zurich zoo [34] and deaths were reported in captive owls in Italy the same year [51]. USUV seroprevalence was studied in the zoos of Vienna, Zurich, and Basel with 5.3% to 8.75% of birds showing USUV-specific antibodies by PRNT-90, whereas no USUV antibodies were detected in the birds of the Budapest zoo [32]. Moreover, one of the first recorded WNV outbreaks in America occurred at the Bronx zoo in 1999 [52]. We identified several new avian species that appear to be susceptible to infection by WNV and USUV. Moreover, the seroprevalence appeared to be more important for USUV than for WNV in the Montpellier zoo. Of note USUV infections in the same area had previously been reported in mosquitoes [53], birds [54], and human [55] whereas WNV was reported in birds [54], horses [56–58], and humans [57,59,60]. One of the surprising outcomes of this study was that among USUV positive samples we found a very high seroprevalence for common peafowls (25.0%), emus (40.0%), and greater rheas (47.6%). To the best of our knowledge, these species have never been described as susceptible to flavivirus infection. Interestingly we identified four new orders susceptible to USUV infection (*Casuariiformes*, *Pelecaniformes*, *Psittaciformes*, and *Rheiformes*) and in particular we detected a very high seroprevalence for *Casuariiformes* and *Rheiformes* orders (40.0% and 47.6% respectively). At this point, the higher prevalence observed in *Casuariiformes* and *Rheiformes* could be due to either a higher susceptibility to flavivirus infection or to a higher rate of vector feeding (for example, due to their large size). Montpellier zoo has abundant populations of *Culex pipiens*, the main mosquito vector of USUV and WNV in the area (S. Gutierrez, personal communication). Studies on the blood-meal preference in these populations could help to define if those vertebrate species are

preferred by mosquito vectors over other vertebrates in the zoo. In our study the detection of stable antibodies titers is probably associated with either the persistence of antibodies for a long time as previously described for USUV and WNV or to periodic circulation of these viruses in the area [29,30].

Interestingly we found no flavivirus antibodies in non-human primates in the 27 individuals from the nine species that we studied (Alouatta caraya, Callithix jacchus tibetana, Eulemur coronatus, Eulemur mongoz, Hapalemur alaotrensis, Lemur catta, Pithecia pithecia, Saguinus imperator, and Varecia rubra). Although these observations must be interpreted with caution due to the limited number of animals it seems that primates are not particularly sensitive to infections by USUV and WNV may be due to the feeding preferences of *Culex pipiens* for avian species. Another study previously described a low prevalence in primates from several zoological gardens [32]. On the other hand, unlike what has been found previously in another zoo, we did not detect flavivirus antibodies in the order Perissodactyla and especially in the Equidae family in the 18 animals studied although horses have been shown to be animals particularly susceptible to USUV and WNV [22,32,61–63]. Interestingly we found a high seropositivity for USUV in Carnivora, especially in Canidae, as previously described mainly in studies on domestic dogs [23,24,64]. Our results show that other Canidae than dogs could be potentially used as sentinel animals for virus surveillance especially since a longer exposure to arboviruses can be inferred from the fact that they spend most of the time outside. Free-living mammals are naturally exposed to flavivirus infections and, thus additional studies on their host competence would help in determining if they could be involved in the virus transmission cycle.

To conclude, our study shows a relatively high exposure of some species of exotic birds and mammals to USUV and to a lesser extent to WNV in a particularly exposed area of France. The overall seroprevalence was 0.73% for WNV and 6.57% for USUV. Our results correlate with a circulation of these two viruses reported in particular in 2018. This study highlights the value of the interest developing monitoring programs to better prevent, detect, and alert arboviruses circulation in areas gathering a large numbers of animals, humans, and vectors such as zoological gardens.

4. Materials and Methods

4.1. Animal Samples

Montpellier zoo (south of France) covers an area of 80 hectares and is surrounded by an urban area and host some 106 animal species including birds and mammals. The sera were collected in this zoo between 2003 and 2019. In total, the sera of 411 animals belonging to 70 species and to 18 different orders were analyzed (for birds: *Anseriformes*, *Casuariiformes*, *Ciconiiforme*, *Coraciiformes*, *Galliformes*, *Gruiformes*, *Musophagiformes*, *Pelecaniformes*, *Psittaciformes*, *Rheiformes*, and *Struthioniformes*, for mammals: *Artiodactyla*, *Carnivora*, *Diprotodontia*, *Perissodactyla*, *Pilosa*, *Primates*, and *Rodentia*). Among them, samples from 137 zoo-birds, belonging to 20 different species and from 274 mammals from 50 different species were investigated. Samples originate from serum banks and animals undergoing medical check-ups. For all samples, 0.3 to 3 mL of blood was drawn from the cutaneous ulnar vein, the jugular vein, or a femoral vein. The blood was centrifuged at 2000× *g* for 10 min, the serum was then separated from the clot, and stored at −20 °C until analysis. Experiments were performed according to national regulations. The collection of samples was performed by veterinarians of the zoo. Samples were collected from serum banks or from animals subjected to sanitary check-ups, health programs, or surgical interventions. No animal was sampled for the only purpose of this study.

4.2. cELISA

Sera were screened using a cELISA test (ID Screen West Nile Competition Multi species ELISA kit, (IDVet, France). The technique is based on plates pre-coated with the envelope (E) protein of WNV and measure the competition between antibodies present in the animal serum tested and a monoclonal anti-WNV.E antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP). This test produces cross-reactions notably with other flaviruses and can therefore detect a large spectrum of flaviviruses including WNV

and USUV and other related flaviviruses [65,66]. Assays were performed and interpreted according manufacturer instructions as previously described [66].

4.3. Seroneutralization Assays

The MNT was carried out in flat-bottomed 96 well microplates after serum heat-inactivation at 56 °C for 30 min. First 50 µL of Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) medium (Thermoscientific) supplemented by 2% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma) was added in each well. Serum was subsequently added to a well in the first column to obtain a starting dilution of 1:5. From this well, two-fold dilutions were made by pipetting 50 µL of each well in the next, until the last column. The sera were mixed with 50 µL of virus suspension (at 100 tissue culture infectious dose 50 ($TCID_{50}$) of USUV (France2018, MT863562) or WNV (lineage 2, MT863560) or TBEV (strain Hypr, Genbank ID U39292.1) or MEAV (Brest ART707, Genbank ID AF013386.1, DQ235144)), incubated at 37 °C for 90 min to allow neutralization of the virus. Wells were then supplemented with 100 µL of Vero E6 cell suspension (ATCC) (DMEM with 2% fetal bovine serum) and incubated 3 to 5 days at 37 °C and under 5% CO_2 following the virus. After 3 days (WNV, USUV) and 5 days (TBEV, MEAV) microplates were read under the microscope to determine the presence or absence of cytopathogenic effect in samples and in positive and negative sera controls. In regards to MEAV, PRNT90 assays with sera diluted 1:20 was performed on SW13 cells as previously described [67]. Each sample was assigned a titer that was the reciprocal of the dilution in that well. Sera that showed neutralization at dilutions ≥1:10 (WNV, USUV) and ≥1:20 (TBEV, MEAV) were considered positive. When neutralization was observed against WNV and USUV, the neutralizing immune response was considered specific if the VNT titer for any given virus was at least fourfold higher than titers obtained against the other viruses. Duplicates were performed to confirm positive results.

4.4. RT-qPCR

Viral RNAs were extracted from 50 µL of serum with the EZ1 apparatus running the EZ1 DSP virus kit (Qiagen). Viral RNA levels were measured by a one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay (RT-qPCR) on the Light Cycler 480 (Roche) with primers, probe, and cycling conditions previously described for USUV [68] and WNV [69].

4.5. Statistical Analysis

Seroprevalence for USUV and WNV was estimated by dividing the number of positive animals by total animals tested, using two-sided exact binomial 95% confidence intervals (95%CI). Correlation between the seroprevalence and other independent variables (sex, age, etc.) were analyzed by means of a Pearson's chi-square test or by the Fisher's exact test (less than 6 samples per group).

Author Contributions: Conceptualization, Y.S.; methodology, Y.S., K.B., C.B., S.L. and V.F.; investigation, O.C., M.C., J.B., C.D., K.B., R.A.M.; resources, B.C., D.G., L.V., C.B., S.L.; writing—original draft preparation, Y.S.; writing—review and editing, Y.S., B.C., D.G., L.V., S.G., S.S., C.B., S.L., C.D.; funding acquisition, Y.S. and S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by REACTing (reference: YY/FC/2018-032) and the Montpellier University of Excellence (MUSE) through ANR (the French National Research Agency) under the "Investissements d'avenir" program with the reference ANR-16-IDEX-0006.

Acknowledgments: We thank the zoological garden of Montpellier and the "Réserve Africaine de Sigean", especially Marielle Beltrame, for providing samples for analysis.

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

Appendix A

Table A1. WNV and USUV seroprevalence in longitudinally sampled birds (2016 and 2018).

	2016		2018		
Species	**USUV**	**WNV**	**USUV**	**WNV**	**Period of Infection**
Amazona amazonica	Neg	Neg	Neg	10	between 2016 and 2018
Dromaius novaehollandiae	80	10	160	10	before 2016
Eudocimus ruber	Neg	Neg	640	10	between 2016 and 2018
Leptoptilos crumenifer	10	20	10	40	before 2016
Pavo cristatus	Neg	Neg	40	10	between 2016 and 2018
	10	Neg	10	Neg	before 2016
Rhea americana	640	20	640	20	before 2016
	Neg	Neg	640	Neg	between 2016 and 2018
	20	Neg	320	10	before 2016
	Neg	Neg	640	10	between 2016 and 2018
	Neg	Neg	320	Neg	between 2016 and 2018
	Neg	Neg	320	Neg	between 2016 and 2018
	Neg	Neg	640	10	between 2016 and 2018
	Neg	Neg	640	10	between 2016 and 2018

Table A2. Prevalence of WNV or USUV antibodies in birds and mammalian species sampled classified by order and family.

Classification	Number	Positives	%WNV	%USUV
Class Aves Order				
Anseriformes				
Family Anatidae	12	0	0.0	0.0
Family Anhimidae	2	0	0.0	0.0
Order Casuariiformes				
Family Casuariidae	5	2 USUV	0.0	40.0
Order Ciconiiforme				
Family Ciconiidae	3	1 WNV	33.0	0.0
Order Coraciiformes				
Family Momotidae	1	0	0.0	0.0
Order Galliformes				
Family Phasianidae	28	6 USUV	0.0	17.2
Order Gruiformes				
Family Psophiidae	2	0	0.0	0.0
Order Musophagiformes				
Family Musophagidae	1	0	0.0	0.0
Order Pelecaniformes				
Family Threskiornithidae	38	1 USUV	0.0	2.6
Order Psittaciformes				
Family Psittacidae	16	1 WNV	6.2	0.0
Family Psittaculidae	5	1 USUV	0.0	20.0
Order Rheiformes				
Family Rheidae	21	10 USUV	0.0	47.6
Order Struthioniformes				
Family Struthionidae	3	0	0.0	0.0
TOTAL Birds	**137**	**22**	**1.45**	**14.59**

Table A2. *Cont.*

Classification	Number	Positives	%WNV	%USUV
Class Mammalia Order Artiodactyla				
Family Bovidae	142	1 WNV	0.7	0.0
Family Cervidae	17	0	0.0	0.0
Family Camelidae	7	0	0.0	0.0
Family Giraffidae	1	0	0.0	0.0
Order Carnivora				
Family Canidae	24	6 USUV	0.0	25.0
Family Felidae	12	1 USUV	0.0	8.3
Family Ursidae	3	0	0.0	0.0
Order Diprotodontia				
Family Macropodidae	12	0	0.0	0.0
Order Perissodactyla				
Family Equidae	13	0	0.0	0.0
Family Rhinocerotidae	5	0	0.0	0.0
Family Tapiridae	1	0	0.0	0.0
Order Pilosa				
Family Choloepodidae	2	0	0.0	0.0
Family Myrmecophagidae	2	0	0.0	0.0
Order Primates				
Family Atelidae	3	0	0.0	0.0
Family Callitrichidae	4	0	0.0	0.0
Family Lemuridae	20	0	0.0	0.0
Family Pitheciidae	1	0	0.0	0.0
Order Rodentia				
Family Cuniculidae	3	0	0.0	0.0
Family Erethizontidae	2	0	0.0	0.0
TOTAL Mammalian	**274**	**8**	**0.36**	**2.55**
TOTAL Animals	**411**	**30**	**0.73**	**6.57**

References

1. Chastel, C.; Main, A.J.; Guiguen, C.; le Lay, G.; Quillien, M.C.; Monnat, J.Y.; Beaucournu, J.C. The isolation of Meaban virus, a new Flavivirus from the seabird tick Ornithodoros (Alectorobius) maritimus in France. *Arch. Virol.* **1985**, *83*, 129–140. [CrossRef]
2. Velay, A.; Solis, M.; Kack-Kack, W.; Gantner, P.; Maquart, M.; Martinot, M.; Augereau, O.; De Briel, D.; Kieffer, P.; Lohmann, C.; et al. A new hot spot for tick-borne encephalitis (TBE): A marked increase of TBE cases in France in 2016. *Ticks Tick Borne Dis.* **2018**, *9*, 120–125. [CrossRef]
3. Clé, M.; Beck, C.; Salinas, S.; Lecollinet, S.; Gutierrez, S.; Van de Perre, P.; Baldet, T.; Foulongne, V.; Simonin, Y. Usutu virus: A new threat? *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, e232. [CrossRef]
4. Beck, C.; Goffart, I.L.; Franke, F.; Gonzalez, G.; Dumarest, M.; Lowenski, S.; Blanchard, Y.; Lucas, P.; de Lamballerie, X.; Grard, G.; et al. Contrasted epidemiological patterns of west nile virus lineages 1 and 2 infections in France from 2015 to 2019. *Pathogens* **2020**, *9*, 908. [CrossRef] [PubMed]
5. Calisher, C.H.; Gould, E.A. Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv. Virus Res.* **2003**, *59*, 1–19. [CrossRef] [PubMed]
6. Beck, C.; Jimenez-Clavero, M.A.; Leblond, A.; Durand, B.; Nowotny, N.; Leparc-Goffart, I.; Zientara, S.; Jourdain, E.; Lecollinet, S. Flaviviruses in Europe: Complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 6049–6083. [CrossRef] [PubMed]
7. Zannoli, S.; Sambri, V. West nile virus and usutu virus co-circulation in europe: Epidemiology and implications. *Microorganisms* **2019**, *7*, 184. [CrossRef] [PubMed]

8. Michelitsch, A.; Wernike, K.; Klaus, C.; Dobler, G.; Beer, M. Exploring the reservoir hosts of tick-borne encephalitis virus. *Viruses* **2019**, *11*, 669. [CrossRef] [PubMed]
9. Waldenström, J.; Lundkvist, Å.; Falk, K.I.; Garpmo, U.; Bergström, S.; Lindegren, G.; Sjöstedt, A.; Mejlon, H.; Fransson, T.; Haemig, P.D.; et al. Migrating birds and tickborne encephalitis virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 1215–1218. [CrossRef]
10. Smithburn, K.C.; Hughes, T.P.; Burke, A.W.P.J. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1940**, *s1–s20*, 471–492. [CrossRef]
11. Petersen, L.R.; Brault, A.C.; Nasci, R.S. West Nile virus: Review of the literature. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2013**, *310*, 308–315. [CrossRef]
12. Lustig, Y.; Sofer, D.; Bucris, E.D.; Mendelson, E. Surveillance and diagnosis of west nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2421. [CrossRef] [PubMed]
13. Lecollinet, S.; Pronost, S.; Coulpier, M.; Beck, C.; Gonzalez, G.; Leblond, A.; Tritz, P. Viral equine encephalitis, a growing threat to the horse population in Europe? *Viruses* **2019**, *12*, 23. [CrossRef] [PubMed]
14. Root, J.J.; Bosco-Lauth, A.M. West Nile Virus Associations in Wild Mammals: An Update. *Viruses* **2019**, *11*, 459. [CrossRef] [PubMed]
15. McIntosh, B.M. Usutu (SAAr 1776); nouvel arbovirus du groupe B. *Int. Cat. Arboviruses* **1985**, *3*, 1059–1060.
16. Woodall, J. The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending December 1963. *Proc. E. Afr. Acad.* **1964**, *2*, 141–146.
17. Escribano-Romero, E.; Lupulović, D.; Merino-Ramos, T.; Blázquez, A.-B.; Lazić, G.; Lazić, S.; Saiz, J.-C.; Petrović, T. West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Vet. Microbiol.* **2015**, *176*, 365–369. [CrossRef]
18. Cadar, D.; Becker, N.; de Mendonca Campos, R.; Börstler, J.; Jöst, H.; Schmidt-Chanasit, J. Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1771–1773. [CrossRef]
19. Diagne, M.; Ndione, M.; Di Paola, N.; Fall, G.; Bedekelabou, A.; Sembène, P.; Faye, O.; Zanotto, P.; Sall, A. Usutu Virus Isolated from Rodents in Senegal. *Viruses* **2019**, *11*, 181. [CrossRef]
20. Nikolay, B.; Diallo, M.; Boye, C.S.B.; Sall, A.A. Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1417–1423. [CrossRef]
21. Bażanów, B.; Jansen van Vuren, P.; Szymański, P.; Stygar, D.; Frącka, A.; Twardoń, J.; Kozdrowski, R.; Pawęska, J. A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. *Viruses* **2018**, *10*, 87. [CrossRef]
22. Ben Hassine, T.; De Massis, F.; Calistri, P.; Savini, G.; BelHaj Mohamed, B.; Ranen, A.; Di Gennaro, A.; Sghaier, S.; Hammami, S. First Detection of Co-circulation of West Nile and Usutu Viruses in Equids in the South-west of Tunisia. *Transbound. Emerg. Dis.* **2014**, *61*, 385–389. [CrossRef]
23. Montagnaro, S.; Piantedosi, D.; Ciarcia, R.; Loponte, R.; Veneziano, V.; Fusco, G.; Amoroso, M.G.; Ferrara, G.; Damiano, S.; Iovane, G.; et al. Serological Evidence of Mosquito-Borne Flaviviruses Circulation in Hunting Dogs in Campania Region, Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2019**, *19*, 142–147. [CrossRef]
24. Durand, B.; Haskouri, H.; Lowenski, S.; Vachiery, N.; Beck, C.; Lecollinet, S. Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: Dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiol. Infect.* **2016**, *144*, 1857–1864. [CrossRef]
25. Vilibic-Cavlek, T.; Savic, V.; Petrovic, T.; Toplak, I.; Barbic, L.; Petric, D.; Tabain, I.; Hrnjakovic-Cvjetkovic, I.; Bogdanic, M.; Klobucar, A.; et al. *Emerging Trends in the Epidemiology of West. Nile and Usutu Virus Infections in Southern Europe*; Frontiers Media S.A.: Lausanne, Switzerland, 2019; Volume 6, p. 437.
26. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *West Nile Fever in Europe in 2018*; ECDC: Solna, Sweden, 2018.
27. Čabanová, V.; Šikutová, S.; Straková, P.; Šebesta, O.O.; Vichová, B.; Zubríková, D.; Miterpáková, M.; Mendel, J.; Hurníková, Z.; Hubálek, Z.; et al. Co-Circulation of West Nile and Usutu Flaviviruses in Mosquitoes in Slovakia, 2018. *Viruses* **2019**, *11*, 639. [CrossRef]
28. Nagy, A.; Mezei, E.; Nagy, O.; Bakonyi, T.; Csonka, N.; Kaposi, M.; Koroknai, A.; Szomor, K.; Rigó, Z.; Molnár, Z.; et al. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1900038. [CrossRef]
29. Süss, J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-An overview. *Ticks Tick Borne Dis.* **2011**, *2*, 2–15. [CrossRef]

30. Botelho-Nevers, E.; Gagneux-Brunon, A.; Velay, A.; Guerbois-Galla, M.; Grard, G.; Bretagne, C.; Mailles, A.; Verhoeven, P.O.; Pozzetto, B.; Gonzalo, S.; et al. Tick-borne encephalitis in auvergne-rhône-alpes region, France, 2017-2018. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1944–1948. [CrossRef]
31. Bournez, L.; Umhang, G.; Faure, E.; Boucher, J.-M.; Boué, F.; Jourdain, E.; Sarasa, M.; Llorente, F.; Jiménez-Clavero, M.A.; Moutailler, S.; et al. Exposure of Wild Ungulates to the Usutu and Tick-Borne Encephalitis Viruses in France in 2009-2014: Evidence of Undetected Flavivirus Circulation a Decade Ago. *Viruses 2020* **2019**, *12*, 10. [CrossRef] [PubMed]
32. Buchebner, N.; Zenker, W.; Wenker, C.; Steinmetz, H.W.; Sós, E.; Lussy, H.; Nowotny, N. Low Usutu virus seroprevalence in four zoological gardens in central Europe. *BMC Vet. Res.* **2013**, *9*, 153. [CrossRef]
33. Caballero-Gómez, J.; Cano-Terriza, D.; Lecollinet, S.; Carbonell, M.D.; Martínez-Valverde, R.; Martínez-Nevado, E.; García-Párraga, D.; Lowenski, S.; García-Bocanegra, I. Evidence of exposure to zoonotic flaviviruses in zoo mammals in Spain and their potential role as sentinel species. *Vet. Microbiol.* **2020**, *247*, 108763. [CrossRef]
34. Steinmetz, H.W.; Bakonyi, T.; Weissenböck, H.; Hatt, J.M.; Eulenberger, U.; Robert, N.; Hoop, R.; Nowotny, N. Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland-Genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet. Microbiol.* **2011**, *148*, 207–212. [CrossRef] [PubMed]
35. Hidalgo-Martínez, A.; Puerto, F.I.; Farfán-Ale, J.A.; García-Rejón, J.E.; Rosado-Paredes, E.D.P.; Méndez-Galván, J.; Figueroa-Ocampo, R.; Takashima, I.; Ramos, C. Prevalencia de infección por el virus del Nilo occidental en dos zoológicos del estado de Tabasco. *Salud Pública de México* **2008**, *50*, 76–85. [CrossRef] [PubMed]
36. Ziegler, U.; Fast, C.; Eiden, M.; Bock, S.; Schulze, C.; Hoeper, D.; Ochs, A.; Schlieben, P.; Keller, M.; Zielke, D.E.; et al. Evidence for an independent third Usutu virus introduction into Germany. *Vet. Microbiol.* **2016**, *192*, 60–66. [CrossRef] [PubMed]
37. Percivalle, E.; Sassera, D.; Rovida, F.; Isernia, P.; Fabbi, M.; Baldanti, F.; Marone, P. Usutu Virus Antibodies in Blood Donors and Healthy Forestry Workers in the Lombardy Region, Northern Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 658–661. [CrossRef]
38. Grottola, A.; Marcacci, M.; Tagliazucchi, S.; Gennari, W.; Di Gennaro, A.; Orsini, M.; Monaco, F.; Marchegiano, P.; Marini, V.; Meacci, M.; et al. Usutu virus infections in humans: A retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 33–37. [CrossRef]
39. Tsai, T.F.; Popovici, F.; Cernescu, C.; Campbell, G.L.; Nedelcu, N.I. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* **1998**, *352*, 767–771. [CrossRef]
40. Bakonyi, T.; Ivanics, É.; Erdélyi, K.; Ursu, K.; Ferenczi, E.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 618–623. [CrossRef]
41. Kutasi, O.; Bakonyi, T.; Lecollinet, S.; Biksi, I.; Ferenczi, E.; Bahuon, C.; Sardi, S.; Zientara, S.; Szenci, O. Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 west nile virus in Hungary. *J. Vet. Intern. Med.* **2011**, *25*, 586–591. [CrossRef]
42. Popović, N.; Milošević, B.; Urošević, A.; Poluga, J.; Lavadinović, L.; Nedelijković, J.; Jevtović, D.; Dulović, O. Outbreak of west Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. *Eurosurveillance* **2013**, *18*, 20613. [CrossRef]
43. Bakonyi, T.; Ferenczi, E.; Erdélyi, K.; Kutasi, O.; Csörgo, T.; Seidel, B.; Weissenböck, H.; Brugger, K.; Bán, E.; Nowotny, N. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet. Microbiol.* **2013**, *165*, 61–70. [CrossRef]
44. Savini, G.; Capelli, G.; Monaco, F.; Polci, A.; Russo, F.; Di Gennaro, A.; Marini, V.; Teodori, L.; Montarsi, F.; Pinoni, C.; et al. Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet. Microbiol.* **2012**, *158*, 267–273. [CrossRef]
45. Barzon, L.; Pacenti, M.; Franchin, E.; Pagni, S.; Lavezzo, E.; Squarzon, L.; Martello, T.; Russo, F.; Nicoletti, L.; Rezza, G.; et al. Large human outbreak of West Nile virus infection in north-eastern Italy in 2012. *Viruses* **2013**, *5*, 2825–2839. [CrossRef]
46. Sribu, A.; Ceianu, C.S.; Panculescu-Gatej, R.I.; Vázquez, A.; Tenorio, A.; Rebreanu, R.; Niedrig, M.; Nicolescu, G.; Pistol, A. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Eurosurveillance* **2011**, *16*, 19762. [CrossRef]

47. Papa, A. Emerging arboviruses of medical importance in the Mediterranean region. *J. Clin. Virol.* **2019**, *115*, 5–10. [CrossRef]
48. Aberle, S.W.; Kolodziejek, J.; Jungbauer, C.; Stiasny, K.; Aberle, J.H.; Zoufaly, A.; Hourfar, M.K.; Weidner, L.; Nowotny, N. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 1800545. [CrossRef]
49. Semenza, J.C.; Tran, A.; Espinosa, L.; Sudre, B.; Domanovic, D.; Paz, S. Climate change projections of West Nile virus infections in Europe: Implications for blood safety practices. *Environ. Health A Glob. Access Sci. Source* **2016**, *15*, 125–136. [CrossRef]
50. Haussig, J.M.; Young, J.J.; Gossner, C.M.; Mezei, E.; Bella, A.; Sirbu, A.; Pervanidou, D.; Drakulovic, M.B.; Sudre, B. Early start of the west nile fever transmission season 2018 in Europe. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 1800428. [CrossRef]
51. Manarolla, G.; Bakonyi, T.; Gallazzi, D.; Crosta, L.; Weissenböck, H.; Dorrestein, G.M.M.; Nowotny, N. Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet. Microbiol.* **2010**, *141*, 159–163. [CrossRef]
52. Lanciotti, R.S.; Roehrig, J.T.; Deubel, V.; Smith, J.; Parker, M.; Steele, K.; Crise, B.; Volpe, K.E.; Crabtree, M.B.; Scherret, J.H.; et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. *Science* **1999**, *286*, 2333–2337. [CrossRef]
53. Eiden, M.; Gil, P.; Ziegler, U.; Rakotoarivony, I.; Marie, A.; Frances, B.; L'Ambert, G.; Simonin, Y.; Foulongne, V.; Groschup, M.H.; et al. Emergence of two Usutu virus lineages in Culex pipiens mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *61*, 151–154. [CrossRef] [PubMed]
54. Vittecoq, M.; Lecollinet, S.; Jourdain, E.; Dé, F.; Thomas, R.; Blanchon, T.; Arnal, A.; Lowenski, S.; Gauthier-Clerc, M. Recent Circulation of West Nile Virus and Potentially Other Closely Related Flaviviruses in Southern France. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2013**, *13*, 610–613. [CrossRef] [PubMed]
55. Simonin, Y.; Sillam, O.; Carles, M.J.; Gutierrez, S.; Gil, P.; Constant, O.; Martin, M.F.; Girard, G.; Van de Perre, P.; Salinas, S.; et al. Human Usutu Virus Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 875. [CrossRef]
56. Durand, B.; Chevalier, V.; Pouillot, R.; Labie, J.; Marendat, I.; Murgue, B.; Zeller, H.; Zientara, S. West Nile virus outbreak in horses, Southern France, 2000: Results of a serosurvey. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 777–782. [CrossRef]
57. Bahuon, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Bournez, L.; Leblond, A.; Beck, C.; Hars, J.; Leparc-Goffart, I.; L'ambert, G.; Paty, M.-C.C.; Cavalerie, L.; et al. West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. *Rev. Sci. Tech. L'OIE* **2016**, *35*, 811–824. [CrossRef]
58. Pradier, S.; Sandoz, A.; Paul, M.C.; Lefebvre, G.; Tran, A.; Maingault, J.; Lecollinet, S.; Leblond, A. Importance of wetlands management for west nile virus circulation risk, camargue, Southern France. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 7740–7754. [CrossRef]
59. Calistri, P.; Giovannini, A.; Hubalek, Z.; Ionescu, A.; Monaco, F.; Savini, G.; Lelli, R. Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin~!2009-11-17~!2009-12-11~!2010-04-22~! *Open Virol. J.* **2010**, *4*, 29–37. [CrossRef]
60. Young, J.J.; Coulombier, D.; Domanović, D.; Zeller, H.; Gossner, C.M.; Aberle, S.; Schmoll, F.; Christova, I.; Chakarova, S.; Novosel, I.P.; et al. One health approach for West Nile virus surveillance in the European Union: Relevance of equine data for blood safety. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1800349. [CrossRef] [PubMed]
61. Barbic, L.; Vilibic-Cavlek, T.; Listes, E.; Stevanovic, V.; Gjenero-Margan, I.; Ljubin-Sternak, S.; Pem-Novosel, I.; Listes, I.; Mlinaric-Galinovic, G.; Di Gennaro, A.; et al. Demonstration of Usutu Virus Antibodies in Horses, Croatia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2013**, *13*, 772–774. [CrossRef]
62. Csank, T.; Drzewnioková, P.; Korytár, L.; Major, P.; Gyuranecz, M.; Pistl, J.; Bakonyi, T. A Serosurvey of Flavivirus Infection in Horses and Birds in Slovakia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2018**, *18*, 206–213. [CrossRef]
63. Guerrero-Carvajal, F.; Bravo-Barriga, D.; Martín-Cuervo, M.; Aguilera-Sepúlveda, P.; Ferraguti, M.; Jiménez-Clavero, M.Á.; Llorente, F.; Alonso, J.M.; Frontera, E. Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**. [CrossRef]
64. Maquart, M.; Dahmani, M.; Marié, J.L.; Gravier, P.; Leparc-Goffart, I.; Davoust, B. First Serological Evidence of West Nile Virus in Horses and Dogs from Corsica Island, France. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 275–277. [CrossRef]

65. Chevalier, V.; Marsot, M.; Molia, S.; Rasamoelina, H.; Rakotondravao, R.; Pedrono, M.; Lowenski, S.; Durand, B.; Lecollinet, S.; Beck, C. Serological evidence of west nile and usutu viruses circulation in domestic and wild birds in wetlands of mali and madagascar in 2008. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 1998. [CrossRef]
66. Beck, C.; Leparc-Goffart, I.; Desoutter, D.; Debergé, E.; Bichet, H.; Lowenski, S.; Dumarest, M.; Gonzalez, G.; Migné, C.; Vanhomwegen, J.; et al. Serological evidence of infection with dengue and zika viruses in horses on French pacific Islands. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007162. [CrossRef]
67. Arnal, A.; Gómez-Díaz, E.; Cerdà-Cuéllar, M.; Lecollinet, S.; Pearce-Duvet, J.; Busquets, N.; García-Bocanegra, I.; Pagès, N.; Vittecoq, M.; Hammouda, A.; et al. Circulation of a Meaban-like virus in yellow-legged gulls and seabird ticks in the Western Mediterranean Basin. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e89601. [CrossRef] [PubMed]
68. Nikolay, B.; Weidmann, M.; Dupressoir, A.; Faye, O.; Boye, C.S.; Diallo, M.; Sall, A.A. Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *J. Virol. Methods* **2014**, *197*, 51–54. [CrossRef]
69. Garcia, M.; Alout, H.; Diop, F.; Damour, A.; Bengue, M.; Weill, M.; Missé, D.; Lévêque, N.; Bodet, C. Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 387. [CrossRef]

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

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

3.2 Approche « One Health » pour évaluer le risque arboviral

Dans une démarche dite « One Health », l'étude de la circulation de virus émergents permet d'avoir un aperçu de l'exposition de plusieurs espèces à ces virus et permet aussi de connaitre la situation épidémiologique dans une région donnée. En effet, depuis quelques années, USUV et WNV circulent parfois silencieusement ou en étant à l'origine d'épidémies en Europe, il est donc important d'évaluer précisément la circulation de ces virus dans notre environnement afin de pouvoir déterminer leur statut épidémiologique et leur possible endémicité. Pour se faire, nous avons travaillé sur la séroprévalence chez des moustiques, des échantillons d'oiseaux issus de la Ligue de Protection des Oiseaux, et chez des chevaux, dans la région camarguaise. Sur la métropole de Montpellier, nous avons aussi pu étudier le statut sérologique d'animaux domestiques comme les chiens, et d'humain via une collection d'échantillons du CHU de Montpellier.

Ce travail a été réalisé grâce à de nombreuses collaborations qui ont permis de rassembler sur plusieurs années les échantillons. Une analyse par le test Elisa pan-flavivirus a d'abord été menée. Puis, comme précédemment, les échantillons positifs ont été testés avec des séroneutralisations contre USUV et WNV. Par ailleurs, chez les moustiques et les oiseaux, des analyses génomiques ont pu être réalisées. Les résultats de ce projet montrent une plus grande proportion d'échantillons positifs pour USUV exceptée chez les chevaux où la prévalence de WNV est plus importante suggérant une plus grande sensibilité et/ou exposition de ces animaux.

Nos résultats montrent une endémisation de ces deux virus dans le sud de la France. Mais ce projet permet aussi de mettre en évidence l'importance des collaborations dans le cadre de la surveillance des virus émergents, comme la collaboration avec les vétérinaires permettant d'avoir une idée de la circulation dans les populations d'animaux domestiques, qui sont aussi en contact étroits avec l'humain. Les liens entre les unités de recherche, les structures publiques de surveillance ou de contrôle et les cliniques vétérinaires sont donc importants pour la mise en place de réseaux adaptés, notamment dans le cadre de programme de santé publique.

SURVEILLANCE

One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020

Orianne Constant[1,*], Patricia Gil[2,*], Jonathan Barthelemy[1], Karine Bolloré[1], Vincent Foulongne[1], Caroline Desmetz[3], Agnès Leblond[4], Isabelle Desjardins[5], Sophie Pradier[6], Aurélien Joulié[7], Alain Sandoz[8], Rayane Amaral[9], Michel Boisseau[2], Ignace Rakotoarivony[2], Thierry Baldet[2], Albane Marie[10], Benoît Frances[10], Florence Reboul Salze[11], Bachirou Tinto[1], Philippe Van de Perre[1], Sara Salinas[1], Cécile Beck[9], Sylvie Lecollinet[9,12], Serafin Gutierrez[2,], Yannick Simonin[1,2,**]**

1. Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, Montpellier University, INSERM, EFS (etablissement français du sang), Montpellier, France
2. ASTRE research unit, CIRAD, INRAe, Montpellier University, Montpellier, France
3. BioCommunication en CardioMétabolique (BC2M), Montpellier University, Montpellier, France
4. EPIA, UMR 0346, Epidemiologie des maladies animales et zoonotiques, INRAE, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France
5. University of Lyon, VetAgro Sup, GREMERES-ICE Lyon Equine Research Center, Marcy l'Etoile, France
6. Jolimont veterinary clinics, Toulouse, France
7. National veterinary school of Toulouse, Université de Toulouse, Toulouse, France
8. Aix Marseille Université – CNRS, UMR 7376, Laboratoire Chimie de l'Environnement, Marseille, France
9. UMR 1161 Virology, ANSES, INRAE, ENVA, ANSES Animal Health Laboratory, EURL for equine diseases, Maisons-Alfort, France
10. EID Méditérranée, Montpellier, France
11. Veterinary Clinic des étangs, Perols, France
12. CIRAD, UMR ASTRE, CRVC, Petit Bourg, France

* These authors contributed equally to this manuscript and share first authorship.
** These authors contributed equally to this manuscript and share last authorship.

Correspondence: Yannick Simonin (yannick.simonin@umontpellier.fr) and Serafin Gutierrez (serafin.gutierrez@cirad.fr)

Citation style for this article:
Constant Orianne, Gil Patricia, Barthelemy Jonathan, Bolloré Karine, Foulongne Vincent, Desmetz Caroline, Leblond Agnès, Desjardins Isabelle, Pradier Sophie, Joulié Aurélien, Sandoz Alain, Amaral Rayane, Boisseau Michel, Rakotoarivony Ignace, Baldet Thierry, Marie Albane, Frances Benoît, Reboul Salze Florence, Tinto Bachirou, Van de Perre Philippe, Salinas Sara, Beck Cécile, Lecolinet Sylvie, Gutierrez Serafin, Simonin Yannick. One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020. Euro Surveill. 2022;27(25):pii=2200068. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.25.2200068

Article submitted on 19 Jan 2022 / accepted on 22 Apr 2022 / published on 23 Jun 2022

Background: West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV), two closely related flaviviruses, mainly follow an enzootic cycle involving mosquitoes and birds, but also infect humans and other mammals. Since 2010, their epidemiological situation may have shifted from irregular epidemics to endemicity in several European regions; this requires confirmation, as it could have implications for risk assessment and surveillance strategies. **Aim:** To explore the seroprevalence in animals and humans and potential endemicity of WNV and USUV in Southern France, given a long history of WNV outbreaks and the only severe human USUV case in France in this region. **Methods:** We evaluated the prevalence of WNV and USUV in a repeated cross-sectional study by serological and molecular analyses of human, dog, horse, bird and mosquito samples in the Camargue area, including the city of Montpellier, between 2016 and 2020. **Results:** We observed the active transmission of both viruses and higher USUV prevalence in humans, dogs, birds and mosquitoes, while WNV prevalence was higher in horses. In 500 human samples, 15 were positive for USUV and 6 for WNV. Genetic data showed that the same lineages, WNV lineage 1a and USUV lineage Africa 3, were found in mosquitoes in 2015, 2018 and 2020. **Conclusion:** These findings support existing literature suggesting endemisation in the study region and contribute to a better understanding of USUV and WNV circulation in Southern France. Our study underlines the importance of a One Health approach for the surveillance of these viruses.

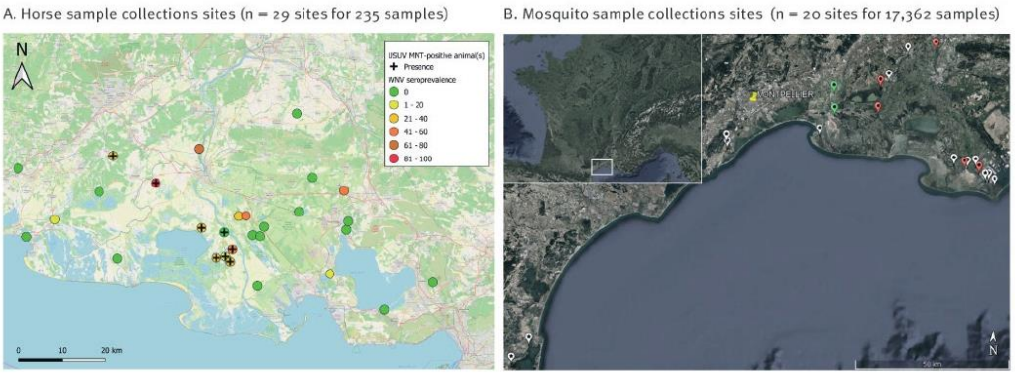
Introduction

West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV) are neurotropic mosquito-borne flaviviruses belonging to the Japanese encephalitis serocomplex [1]. Circulation of these viruses is maintained in similar transmission cycles involving ornithophilic mosquitoes, such as *Culex pipiens*, and different bird species. Both viruses can also spread to several mammalian species, including humans, although most mammals are considered to be dead-end hosts [2]. WNV can represent a serious burden to human and animal health [3]. The clinical spectrum of WNV infection in humans

Check for updates

FIGURE 1

Collection sites of horse (May–June 2016; n = 29) and mosquito samples (2018–2020; n = 20 sites), Southern France



MNT: microneutralisation test; WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus.

A. Horse sample collections sites in the Camargue area in 2016. Stables with at least one USUV MNT-positive horse are represented by a cross and WNV seroprevalence in sampled stables is represented by a colour gradient from green (no WNV MNT-positive animal in the corresponding stable) to dark red (81–100% seroprevalence rate) (Map source: https://www.openstreetmap.org).

B. Mosquito collection (*Culex pipiens*) sites in the Camargue area from 2018 to 2020. Red pins indicate USUV-positive pools and green pins both WNV-positive and USUV-positive pools. White pins negative trapping sites. USUV-positive sites in our previous study in 2015 are shown for the sake of completeness. The location of the city of Montpellier is provided to facilitate site positioning.

The locations of sample collection for dogs and humans are not available because of the anonymisation of the data. We do not have information on the exact site where the dying wild birds were collected.

can range from influenza-like febrile illness to acute flaccid paralysis, meningitis or encephalitis [4]. USUV has been shown to affect primarily specific species of wild birds (mainly blackbirds and owls in Europe) [5,6]. Although less numerous than human cases of WNV infections, USUV infections in humans can manifest as encephalitis, meningitis and meningoencephalitis in both immunocompetent and immunocompromised patients [5].

Despite their potential impact on human and animal health, the available measures to control these viruses are limited. Although inactivated and recombinant WNV vaccines exist for horses [7], there are currently no specific treatments or vaccines for WNV or USUV available for humans. The management of virus circulation is thus largely based on integrated surveillance activities. These activities provide guidance to implement mainly preventive measures in case of detection. For example, blood for donation is tested for WNV and donors are deferred in regions in which outbreaks are detected because WNV can be transmitted through blood transfusion [8].

Since the 1960's, different lineages of WNV and USUV have been periodically detected in Europe. These viruses were mainly associated with sporadic cases in humans, horses and birds and limited to certain European regions, until recently [9]. Occasional outbreaks of WNV have mainly taken place in Southern Europe during the last two decades [10-12]. Nevertheless, the outbreaks of both viruses have recently increased in numbers and geographical distribution. In 2018, a concurrent WNV and USUV epidemic occurred for the first time in several parts of Europe, including countries in different latitudes and a record number of outbreaks [2,5,13-18]. Currently, epidemiological patterns in several European regions suggest endemicity of these viruses instead of periodic introductions from endemic regions. For example, repeated detection of the same strains in the same region over a consistent number of years has been proven in Northern Italy, Hungary and Austria [19-21]. These patterns, together with the potential health risks associated with WNV and USUV, support the need for continuous rigorous analysis of the epidemiological situation in Europe [3], which will serve as a key piece of information in the design of surveillance strategies for WNV and USUV.

This study explores the seroprevalence and potential endemicity of WNV and USUV in a European region with a high risk of endemisation. This region in the south of France includes the Rhône River delta, the French region with the longest record of WNV outbreaks and

Check for updates

TABLE 1

Screening for Usutu and West Nile viruses in flavivirus-positive human samples using a microneutralisation test, Southern France, 2019–2020 (n = 53)

Samples (n)	USUV MNT titre	WNV MNT titre	Infection
33	ND	ND	UD
2	10	ND	USUV
9	20	ND	USUV
3	40	ND	USUV
3	ND	20	WNV
1	ND	40	WNV
1	10	160	WVN
1	20	20	WNV and USUV
Positive samples (n)	15	6	14 USUV, 5 WNV, 1 USUV/WNV

MNT: microneutralisation test; ND: not detected; UD: undetermined; WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus.

A titre was determined for each sample from the reciprocal of each dilution. If the results indicate a titre for both viruses, the neutralising immune response was considered specific for WNV or USUV if the MNT titre was at least fourfold higher than the titre obtained against the other virus.

included in the French surveillance programme for WNV [9,22].

Methods

Study setting

The study area encompasses part of the Camargue area including the city of Montpellier, located within the Mediterranean basin in the eastern part of the Occitania region in Southern France. It has a climate catalogued as a warm-summer Mediterranean climate according to the Köppen-Geiger climate classification [23]. The Camargue area is a natural wetland located south of Arles city and within a triangle defined by the two arms of the Rhône River and the Mediterranean Sea. This area harbours diversified environments in which dry areas are continuously irrigated by canals, ditches and wetlands favourable to a large and diverse bird population as well as a large mosquito population [24].

Sample collection

Sample collection was a joint effort by INSERM (French Institute of Health and Medical Research), ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety), and CIRAD (French Agricultural Research Centre for International Development). The analyses on humans, dogs and birds were carried out by the Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections unit, INSERM, the studies on horses by the Animal Health Laboratory, ANSES and on mosquitoes by the Astre unit, CIRAD.

Human samples

Five hundred human serum samples randomly collected in 2019 and 2020 from outpatients attending Montpellier University hospitals (mainly for occupational medicine (n = 133) or consultations in haematology (n = 84), nephrology (n = 78), hepato-gastroenterology (n = 56), cardiology (n = 41), dermatology (n = 28)) as part of a seroepidemiological investigation. Serum samples were stored at –80°C until further serological analysis. Patients less than 1 year of age and patients under care for any other viral infection were excluded from this study. An additional 34 serum samples from inpatients diagnosed in the same hospitals with non-bacterial meningitis or meningoencephalitis without an identified aetiology were also screened for WNV and USUV infection.

Dog samples

Serum samples were collected from 184 dogs (mainly indoor pets) in 2019–20 from animals undergoing health evaluations or surgical interventions at two veterinary clinics which serve animals from across the Montpellier area. These animals did not have any recent recorded infectious episodes. Serum samples were stored at –20 °C until processed. No animals were sampled solely for the purpose of this study.

Horse samples

Serum samples from 235 horses included for the study were collected from 29 stables located in the Camargue area in May and June 2016 (Figure 1). The horse stables were chosen according to the criteria presented in Desjardins et al [25]. Samples were stored at –20°C before serological analysis. All horses were asymptomatic at the time of sampling and unvaccinated against WNV. The surveyed stables were in part randomly selected from stables located in a large area affected by WNV outbreaks in 2015. Stables that had previously reported horses with chronic fever during the sampling period or the previous year were included when possible.

In addition to sample collection, the owner completed a questionnaire on the individual characteristics of each horse (age, sex, activity), its health status (clinical signs, infection history and treatments) and stable management (contact with other animals, tick and flea control).

Bird samples

From February 2019 to December 2020, sick or dying resident wild birds were passively collected around Montpellier by the Regional Centre for the Safeguarding of Wild Fauna, the League for the Protection of Birds (LPO) and Montpellier Zoological Garden for first aid care. In agreement with the competent Official Veterinary Service, samples (liver and brain) were collected from dead birds (n = 191) and were stored at –20°C for laboratory molecular investigations.

Mosquito samples

Adult mosquitoes were collected from 20 sites in the Camargue area from 2018 to 2020 (Figure 1; detailed

Check for updates

TABLE 2

Screening for Usutu and West Nile viruses in flavivirus-positive dog samples using a microneutralisation test, Southern France, 2019–2020 (n = 3)

Breed	USUV MNT titre	WNV MNT titre	Infection
German wirehaired pointer	10	ND	USUV
Jack Russell terrier	40	ND	USUV
German shepherd	ND	160	WNV
Positive samples (n)	2	1	2 USUV, 1 WNV

MNT: microneutralisation test; ND: not detected; WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus.

A titre was determined for each sample from the reciprocal of each dilution.

information on mosquito numbers and sites can be found in Supplementary Table S1). Overnight trapping using CO2-baited type traps was performed once per week between April to October (28 trappings per year), as previously described [26]. Mosquitoes were identified based on morphological features on a chill table at 4°C [26]. Once identified, non-blood-engorged *C. pipiens* females were grouped in pools of between one and 44 individuals per site and collection date and stored at –80°C until further analyses.

Serological testing in human, dog and horse samples

A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA, ID Screen West Nile Competition Multi species ELISA kit, IDvet, France) was used for the detection of flavivirus antibodies (IgG and IgM) in sera [27] from humans, dogs and horses, according to the manufacturer's instructions.

To confirm WNV or USUV infection, viral microneutralisation tests (MNT) were performed on cELISA-positive sera. For human and canine samples, methods to identify USUV (France2018, MT863562) and WNV (lineage 2, MT863560) were performed according to Constant et al. [9]. For horse samples, tests using USUV (France2018, MT863562) and WNV (lineage 1IS-98-ST1, AF481864.1) were performed according to Beck et al. [28]. Different WNV strains have been used based upon their availability in the screening laboratories. WNV MNT performed on horse samples at ANSES in the frame of interlaboratory proficiency testing generated comparable results (data not shown). Briefly, serial dilutions of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 2% foetal bovine serum were mixed with USUV and WNV suspension at 100 tissue culture infectious dose 50 (TCID50). After incubation for 90 min at 37°C allowing for viral neutralisation, 100 µL containing 2,000 Vero cells (human samples) or 2x104 Vero cells (horse samples) were mixed in each well and plates were incubated for 3 to 5 days at 37°C. The presence or absence of a cytopathic effect was determined and compared with controls. A titre was determined for each sample from the reciprocal of each dilution. The tests were performed twice in two independent experiments. For a neutralisation dilution≥1:10, sera were confirmed positive for WNV or USUV antibodies after duplication of results. If the results indicate a titre for both viruses, the neutralising immune response was considered specific for WNV or USUV if the MNT titre was at least four-fold higher than the titre obtained against the other virus.

Viral RNA detection in bird, human and mosquito samples and sequencing in mosquitoes

Viral RNA was extracted from 20–30 mg of homogenised bird brain or liver samples using the QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen). Viral RNA was extracted from 50 µL of human serum using the EZ1 BioRobot workstation in combination with the EZ1 DSP Virus Kit (Qiagen). The LightCycler 480 real-time PCR machine was then used for one-step reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) analysis. Mosquito pools were homogenised in PBS buffer and total RNA was extracted with the NucleoMagVet kit (Macherey Nagel) using a Kingfisher Flex (Thermo Scientific).

USUV and WNV detection was performed with a TaqMan-based RT-qPCR and a SYBR-Green-based RT-qPCR respectively, as previously described [29,30]. PCR amplification for Sanger sequencing (Eurofins Genomics, Germany) was performed using cDNA from all virus-positive pools. For USUV sequencing, we performed a PCR with the primers 4723fwd (5'-GTCATGTATGAAGGRGTT-3') and 5672rev (5'-GTGTAYTCTGTTATCCACTC-3'). The primers target a region of the NS3 gene (their 5' position is indicated in the name). Sequences of WNV were obtained using a PCR which targets a part of the NS5 gene as previously described to discriminate WNV lineages [31]. The GenBank accession numbers of the USUV sequences are ON125263, ON099437, ON099438, ON099439, and ON099436 for WNV sequence.

Virus isolation

Confluent monolayers of Vero E6 (African green monkey) cells were inoculated with organ homogenates from RT-qPCR-positive birds in order to attempt virus isolation. Cells were incubated at 37°C with 5% CO2 for 7 days and observed daily to assess cytopathic effects.

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were performed in Geneious (Dotmatics). Multiple alignments were generated with the default Geneious algorithm. All positions containing gaps and missing data were not included. The alignment for USUV included 33 partial sequences from mosquitoes of the NS3 gene (682 bp, positions 4,736–5,614). The alignment for WNV included 51 partial sequences (all from mosquitoes, except one from a horse) of the NS5 gene (1,000 bp, positions 9,039–10,039). Trees were generated with the Tree Builder

Check for updates

Table 3

Screening for Usutu and West Nile viruses in flavivirus-positive horse samples using microneutralisation tests, Southern France, May–June 2016 (n = 40)

Samples (n)	USUV MNT titre	WNV MNT titre	Infection
5	ND	ND	UD
2	10	ND	USUV
2	20	ND	USUV
6	ND	20	WNV
3	ND	40	WNV
1	10	80	WNV
5	ND	80	WNV
2	10	160	WNV
3	ND	160	WNV
1	10	320	WNV
2	20	320	WNV
3	ND	320	WNV
1	10	20	WNV and USUV
1	80	80	WNV and USUV
3	80	40	WNV and USUV
Positive samples (n)	9	31	4 USUV, 26 WNV, 5 USUV/WNV

MNT: microneutralisation test; ND: not detected; UD: undetermined; WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus. A titre was determined for each sample from the reciprocal of each dilution. If the results indicate a titre for both viruses, the neutralising immune response was considered specific for WNV or USUV if the MNT titre was at least fourfold higher than the titre obtained against the other virus.

function using the maximum likelihood approach and the Jukes-Cantor model.

Statistical analyses

Seroprevalence for USUV and WNV was estimated by dividing the number of positive subjects by the total number of subjects tested with two-sided exact binomial 95% confidence intervals (CI). Maximum likelihood estimates of infection rates in *C. pipiens* populations and their 95% CI were obtained with the R package binGroup.

Results

WNV and USUV seroprevalence and infections in humans

The human cohort included 272 (54.4%) females (median age: 43 years; interquartile range (IQR): 29–58 years) and 228 (45.6%) males (median age: 49 years; IQR: 33–68 years). We identified antibodies (IgG and IgM) against flaviviruses in 53 of the 500 samples (10.3%; 95% CI: 7.9–13.3).

All cELISA-positive human samples were then tested using MNT against WNV and USUV (Table 1). Among these 53 samples, 15 tested positive for USUV-specific antibodies (3%; 95% CI: 1.5–4.5) and six for WNV-specific antibodies (1.2%; 95% CI: 0.25–2.15). Although antibody cross-reactions could not be ruled out, samples with equal neutralising activity for WNV and USUV (‹ fourfold difference in MNT titre) were considered as potential co-infections. One sample demonstrated neutralising activity for both WNV and USUV. We did not detect WNV or USUV RNA in the set of 500 human samples.

We also analysed 34 serum samples from patients diagnosed with meningitis or meningoencephalitis (of unidentified aetiology). WNV or USUV were not detected in any of these samples by serological screening or RT-qPCR.

WNV and USUV infections in dogs

We confirmed the presence of flavivirus antibodies (IgG and IgM) by cELISA in three of the 184 dog samples analysed (1.63%; 95% CI: 0.00–3.46): two USUV antibody-positive samples were detected by MNT (1.08%; 95% CI: 0.00–2.58). One dog was positive for WNV antibodies (0.54%; 95% CI: 0.00–1.60) (Table 2). We found that USUV seroprevalence in dogs appears higher than that of WNV, although the number of positive samples was too low to infer a statistically significant pattern.

WNV and USUV infections in horses

All horses that were sampled were asymptomatic on the date of sampling as well as during the previous WNV transmission season. Two horses that belonged to two different stables had developed a WNV infection in 2015. The sampling was performed in spring 2016, outside of the WNV transmission period in France. Most of the surveyed horses had no history of clinical signs indicative of higher risks of infection by WNV and/or USUV. We identified antibodies against flaviviruses

Check for updates

Table 4

Wild bird species positive for Usutu virus by RT-qPCR, Southern France, 2019–2020 (n = 5)

Species	Collection date	Neurological symptoms	USUV Cq values
Domestic pigeon	23 Aug 2019	No	35.95
Eurasian collared dove	29 Oct 2019	Yes	34.59
Eurasian sparrowhawk	16 Nov 2019	No	33.65
Song thrush	7 Oct 2019	Yes	32.89
Tawny owl	10 Jul 2019	Yes	37.94

Cq: cycle quantification; USUV: Usutu virus.

Samples (brains or livers) of dying wild birds with and without neurological symptoms were analysed by RT-qPCR. No samples positive for WNV were detected.

(IgM and IgG) in 40 out of 235 sera analysed (17.02%; 95% CI: 12.21–21.82) (Figure 1) (Table 3). Among these 40 samples, nine were positive for USUV-specific antibodies (3.83%; 95% CI: 1.37–6.28) and 31 for WNV-specific antibodies (13.19%; 95% CI: 8.86–17.51) which suggests that, based on the confidence intervals, WNV seroprevalence appears to be higher than USUV seroprevalence in horses. Among these positive samples, we identified five potentially co-infected samples demonstrating neutralising activity for both WNV and USUV. Moreover, a specific flavivirus species could not be determined in five horse sera.

WNV and USUV infections in birds

Brain or liver samples from diseased, euthanised or dead-found wild birds, with or without neurological signs, were analysed for the detection of WNV and USUV RNA by RT-qPCR. We did not detect WNV RNA in any of the samples, whereas five wild birds were positive for USUV RNA (Table 4). In 2019, USUV-infected birds found included one Columba livia domestica (Domestic pigeon), one Streptopelia decaocto (Eurasian collared dove), one Accipiter nisus (Eurasian sparrowhawk) and one Turdus philomelos (Song thrush). In 2020, we identified one Strix aluco (Tawny owl), a species considered as highly sedentary. USUV isolation from avian samples was not successful.

WNV and USUV infections in mosquitoes

A total of 17,362 non-engorged *C. pipiens* females were collected in the south of France between 2018 and 2020 and separated in 1,771 pools (Figure 1; detailed information on mosquito pool number and screening results can be found in Supplementary Table S1). All pools were analysed for the presence of WNV and USUV RNA. Two WNV-positive pools were identified in 2018, each in a different site. USUV-positive pools were detected in 2018 (one pool) and 2020 (six pools from four sites). No WNV- or USUV-positive pools were detected in 2019. The number of positive pools implied low infection rates in *C. pipiens* populations across all years, i.e.<0.5% (infection rates available in Supplementary Figure S1).

We obtained one sequence from a WNV-positive pool in 2018 and three sequences from USUV-positive pools, one in 2018 and two in 2020 (Figure 2). The WNV sequence belonged to Lineage 1 and clustered with WNV sequences previously identified in the Camargue area isolated from horses and one bird, which were obtained in 2000, 2004 and 2015. All USUV sequences clustered together within USUV Africa 3 Lineage.

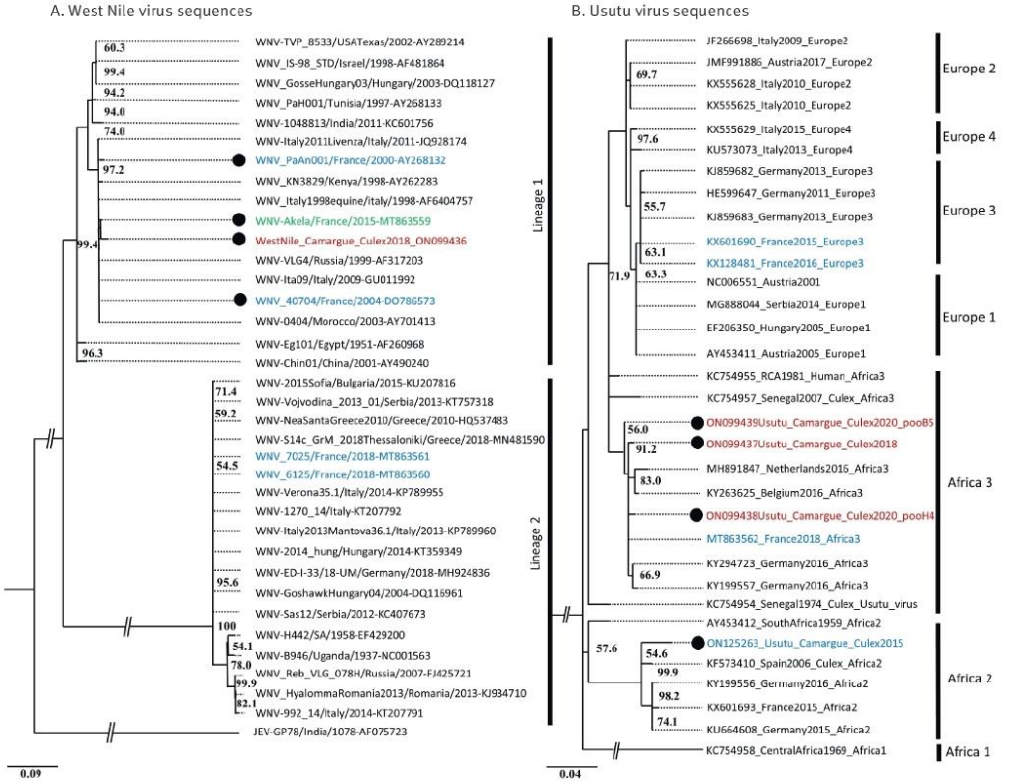
Discussion

Here, we analysed the epidemiological situation of WNV and USUV in the Camargue area in France, a European region in which endemicity of both viruses is suspected. This seroprevalence study targeted several epidemiologically relevant hosts: humans, horses, wild birds and mosquitoes. Very low WNV seroprevalence in horses was evident in the Camargue region between 2005 and 2010 when important sampling efforts in wild birds were employed; no spillover outside the enzootic bird–mosquito transmission cycle was evident during the same period [32]. Furthermore, there is no molecular study showing the circulation of the virus over this period. WNV re-emerged in the Camargue during the summer of 2015 [32]. This arbovirus has been repeatedly reported in birds [33], horses [10,32,34,35] and humans [36-38] in this area since that time. Similarly, USUV infections have been previously reported in mosquitoes [26] and birds [33], and we previously described a human case of idiopathic facial paralysis in a person infected with USUV in the same area [39]. Although dogs do not commonly develop clinical signs, especially neurological disorders, with USUV or WNV infections, they were included in the study because they are considered relevant candidates for surveillance because of their proximity to humans and high WNV exposure rates, as previously documented [40]. Importantly, prevalence was estimated for 3 consecutive years in mosquito populations to provide a time window large enough to assess long-term virus presence. Thus, our approach aimed to obtain an estimation of virus prevalence in the study area, as well as genomic sequences over several years. Our results show that infections of USUV and WNV among humans, dogs, horses, birds and mosquitoes repeatedly occurred in the study area in recent years.

Check for updates

FIGURE 2

Maximum likelihood phylogenetic trees of A. the West Nile virus sequence from 2018 in Southern France (n = 1) and B. Usutu virus sequences from 2018 and 2020 in Southern France (n = 3), compared with selected sequences from GenBank (n = 65)



WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus.

The phylogenies were inferred based on a partial sequence of the NS5 or the NS3 genes for WNV and USUV, respectively. The tree was rooted with a sequence of Japanese encephalitis virus (AF075723) for WNV sequences. The tree was rooted with a sequence of lineage Africa 1 for USUV. One hundred bootstrap datasets with random sequence addition were computed to generate a consensus tree drawn. Numbers along branches are bootstrap values. Scale bar indicates substitutions per site.

Sequences in blue come from France. French sequences identified in this study (red) are all from mosquito samples and are available in GenBank. The WNV sequence from a horse from the Camargue region in 2015 and obtained by other authors appears in green to facilitate comparison [32]. Sequences from the Camargue area are marked with a black circumference. The year of collection is stated on the sequence name, generally after the country name.

In comparison with our mosquito surveillance data from 2015 [26], we identified two sites with WNV and USUV detection in different years, suggesting a high suitability of those sites for future surveillance studies (Supplementary Table S1: mosquito collection sites). Moreover, the combination of genetic data from other studies and ours show the presence of the same lineages for both WNV and USUV in the same region in 2015, 2018 and 2020. More precisely, the cluster of WNV Lineage 1 found in mosquitoes in 2018 has also been detected in Camargue in a horse in 2015 (Figure 2A) and in mosquito excreta in 2020 (a different genomic region than that used in our analysis, GenBank accession OK489805.1 [41]). The same cluster had been detected in equines in the region in 2000 and 2004 (Figure 2A). Thus, after an 11-year period without detection, viruses belonging to the same cluster within WNV Lineage 1 have been repeatedly detected since 2015 in both vertebrates and mosquitoes. Similarly, the same USUV lineage was detected in mosquitoes from Camargue in 2015 (a sequence from a different genomic region than that used in our analysis was obtained) [26]. Thus, similarly to WNV, USUV Africa 3

Check for updates

Lineage has been detected in *C. pipiens* populations in Camargue in 2015, 2018 and 2020.

The repeated detection of the same lineages over several years is notable, given the usual low prevalence of these viruses, the detection of other lineages in the study area [26] and the lack of mosquito surveillance data in 2016 and 2017. Thus, the genetic data support a scenario of endemisation for both viruses in the study area. Our data also suggest that human exposure to WNV and USUV has been non-negligible in the study area (3% (95% CI: 1.5–4.5) for USUV and 1.2% (95% CI: 0.25–2.15) for WNV). Although the human cohort analysed was relatively limited in size, the seroprevalence data from domestic dogs also support active transmission of both viruses near humans. Overall, the potential continuous presence of WNV and USUV and the exposure levels observed suggest that the infection risk in the region deserves thorough characterisation. In particular, potential endemisation requires further validation through long-term studies because WNV epidemiological patterns have been shown to be complex. For example, lineage 1 of WNV was detected in the study region in 2000 and 2004 but later remained undetected until 2015. This pattern could be explained by two contrasting scenarios: extinction after introductions or, alternatively, circulation below detection thresholds for 11 years.

Our study reports the extent of USUV prevalence in the region in humans, dogs, horses, birds and mosquitoes. USUV remains largely unstudied worldwide, although the recent avian outbreaks, together with the detection of more than 100 human cases in Europe since 2008, have triggered studies on different aspects of USUV biology [5]. Our results show that the prevalence of USUV in humans may be at least as high as that of WNV, if not higher, in the study area. This observation concurs with a previous report showing a higher prevalence of USUV than WNV in zoo animals in the same area [9]. Similarly, USUV exposure in humans has been shown to be higher than that of WNV in some Italian regions [5,42-44]. Moreover, our passive surveillance in wild birds found USUV-positive birds in sedentary species, which favours long-term virus circulation locally. Mosquito surveillance data suggest that USUV can reach relatively notable prevalence levels in the region, i.e. the infection rate in mosquitoes was above 1% in late 2015. Although USUV has not been found responsible for a large number of detected human clinical cases in the study area, our results suggest that this situation could change, should a more pathogenic strain emerge, especially because USUV is described as having lineage-dependent virulence [45].

Our study provides data on the seroprevalence of WNV and USUV in different vertebrates that can be used to assess their possible interest for inclusion in surveillance schemes. Horses are considered as valuable sentinels of the risk of WNV epizootic transmission in Europe [46,47]. Based on the high seroprevalence in horses obtained in our study (13.19% for WNV and 3.83% for USUV), their suitability for USUV surveillance warrants an experimental design allowing a robust comparison of USUV seroprevalence in domestic animals. However, we did not collect horse samples from the same years as the human and dog samples, hampering such a robust comparison. Nevertheless, WNV prevalence was almost 10-fold higher in horses than in humans and dogs, and USUV prevalence in horses was at least as high as in the other hosts.

This study also highlights the need for reinforcement of monitoring and surveillance programmes for USUV and WNV infection over several years, including monitoring of geographic spread and the dynamics of USUV and WNV transmission in both primary and incidental hosts. Such programs exist in various European countries, particularly in southern Europe, but they are mostly focused on seasonal surveillance of WNV [48-50]. However, some countries, such as Italy, have more recently expanded their programs for both viruses planned annually under the National Integrated Surveillance Plan (NISP), based on entomological, veterinary and human surveillance activities. These programmes should also involve different support actions, such as raising awareness as well as encouraging and training clinical veterinarians to better prevent, detect and alert on these infections. Nevertheless, such analysis is challenging because of several aspects of the epidemiology of WNV and USUV. First, their epidemics are not homogeneous over Europe, with certain regions experiencing concentrated outbreaks. Secondly, a robust assessment of their prevalence requires One Health, i.e. integrated surveillance in their different hosts and, thus, sampling approaches adapted to humans, equines, wild birds or mosquitoes. In addition, virus dispersal through bird movement hinders the ability to distinguish between a continuous virus presence in a given region, i.e. endemicity, and repeated virus introductions followed by extinctions. Disentangling between the two scenarios requires long-term studies showing virus prevalence in the same region over several years.

Our study had several limitations. A larger study with more samples per host species over several years would be needed to more accurately assess the infection rates of these two viruses in the different species studied. Furthermore, compared with active surveillance (entomological or on animal sentinels), passive surveillance systems (on dead birds or on diseased humans) are simpler and cheaper to implement, but the drawback lies in the inability to detect the virus early before human cases occur. A limitation of passive surveillance in birds is that not all species die from infection. In our study, only birds that died from infection or another cause were collected for study.

Check for updates

Conclusions

Our results show an active spread of USUV and WNV in a particularly exposed area of France in humans, dogs, horses, birds, and mosquitoes. Overall, improving surveillance programmes for USUV and WNV as part of a One Health approach would help to anticipate the veterinary and public health risks associated with these viruses.

Author's correction

On publication, the name of author Sylvie Lecollinet was spelled incorrectly. This was corrected on 5 July 2022 at the request of the authors.

Statements

Ethical statement: The study of human samples was approved by Montpellier University Hospital Review Board (2019-IRB-MPT-05-06) and was performed in line with the regulations outlined in the Declaration of Helsinki. Data was anonymised for publication purposes. Animal sampling were performed according to national and institutional guidelines (the sampling protocols were validated by the ethics committee of VetagroSup, agreement number 1534), informed written consent from animal owners was obtained and sample collection was performed by veterinarians.

Funding statement: This study was funded by the ANR (French National Research Agency; reference ANR-16-IDEX-0006), the KIM RIVE initiative, the Labex EpiGenMed "Investissements d'avenir" programme (reference ANR-10-LABX-12-01), and Montpellier University of Excellence (MUSE; ArboSud project). Moreover, SG was recipient of funding from the Direction Générale de l'Alimentation from the French Ministry of Agriculture and Food. Horse serosurveys were funded by the French Horse and Riding Institute, IFCE, and the EPERON fund (Encouragement aux Projets Equestres Régionaux Ou Nationaux) (OpIUM project).

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

OC, PG, JB, KB, CD, CB, AL, ID, SP, AJ, AS, MB, IR, AM, BF, BT, RA, VF collected the samples and performed the experiments. PG isolated viral strains. YS, SG designed the work and drafted the manuscript with SL, CB, TB, FRS, SS, PVD substantively revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Calisher CH, Gould EA. Taxonomy of the virus family Flaviviridae. Adv Virus Res. 2003;59:1-19. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59001-7 PMID: 14696325
2. Zannoli S, Sambri V. West Nile virus and Usutu virus co-circulation in Europe: Epidemiology and implications. Microorganisms. 2019;7(7):E184. https://doi.org/10.3390/microorganisms7070184 PMID: 31248051
3. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Expert consultation on risk assessment and outbreak mapping tools for West Nile virus infection in Europe. Stockholm: ECDC; 29 May 2012. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/expert-consultation-risk-assessment-and-outbreak-mapping-tools-west-nile-virus
4. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. Lancet Neurol. 2007;6(2):171-81. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70030-3 PMID: 17239804
5. Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, et al. Usutu virus: A new threat? Epidemiol Infect. 2019;147:e232. https://doi.org/10.1017/S0950268819001213 PMID: 31364580
6. Weissenböck H, Kolodziejek J, Fragner K, Kuhn R, Pfeffer M, Nowotny N. Usutu virus activity in Austria, 2001-2002. Microbes Infect. 2003;5(12):1132-6. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00204-1 PMID: 14554255
7. Seino KK, Long MT, Gibbs EPJ, Bowen RA, Beachboard SE, Humphrey PP, et al. Comparative efficacies of three commercially available vaccines against West Nile Virus (WNV) in a short-duration challenge trial involving an equine WNV encephalitis model. Clin Vaccine Immunol. 2007;14(11):1465-71. https://doi.org/10.1128/CVI.00249-07 PMID: 17687109
8. Zeller H, Marrama L, Sudre B, Van Bortel W, Warns-Petit E. Mosquito-borne disease surveillance by the European Centre for Disease Prevention and Control. Clin Microbiol Infect. 2013;19(8):693-8. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12230 PMID: 23607415
9. Constant O, Bollore K, Clé M, Barthelemy J, Foulongne V, Chenet B, et al. Evidence of exposure to USUV and WNV in zoo animals in France. Pathogens. 2020;9(12):100-5. https://doi.org/10.3390/pathogens9121005 PMID: 33266071
10. Beck C, Leparc Goffart I, Franke F, Gonzalez G, Dumarest M, Lowenski S, et al. Contrasted epidemiological patterns of West Nile virus lineages 1 and 2 infections in France from 2015 to 2019. Pathogens. 2020;9(11):908. https://doi.org/10.3390/pathogens9110908 PMID: 33143300
11. García San Miguel Rodríguez-Alarcón L, Fernández-Martínez B, Sierra Moros MJ, Vázquez A, Julián Pachés P, García Villacieros E, et al. Unprecedented increase of West Nile virus neuroinvasive disease, Spain, summer 2020. Euro Surveill. 2021;26(19). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.19.2002010 PMID: 33988123
12. Pervanidou D, Vakali A, Georgakopoulou T, Panagiotopoulos T, Patsoula E, Koliopoulos G, et al. West Nile virus in humans, Greece, 2018: the largest seasonal number of cases, 9 years after its emergence in the country. Euro Surveill. 2020;25(32). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.1900543 PMID: 32794446
13. Carletti F, Colavita F, Rovida F, Percivalle E, Baldanti F, Ricci I, et al. Expanding Usutu virus circulation in Italy: detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. Euro Surveill. 2019;24(3). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649 PMID: 30670139
14. Nagy A, Mezei E, Nagy O, Bakonyi T, Csonka N, Kaposi M, et al. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. Euro Surveill. 2019;24(28). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.28.1900038 PMID: 31311619
15. Čabanová V, Šikutová S, Straková P, Šebesta O, Vichová B, Zubríková D, et al. Co-Circulation of West Nile and Usutu Flaviviruses in Mosquitoes in Slovakia, 2018. Viruses. 2019;11(7):639. https://doi.org/10.3390/v11070639 PMID: 31336825
16. Martin MF, Simonin Y. Progression historique du virus du Nil occidental en Europe. [West Nile virus historical progression in Europe]. Virologie (Montrouge). 2019;23(5):265-70. French. https://doi.org/10.1684/vir.2019.0787 PMID: 31826847
17. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). West Nile fever in Europe in 2018 - human cases compared to previous seasons, updated 23 November. Stockholm: ECDC; 2019. Available from: https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-fever-europe-2018-human-cases-compared-previous-seasons-updated-23
18. Michel F, Sieg M, Fischer D, Keller M, Eiden M, Reuschel M, et al. Evidence for West Nile virus and Usutu Virus infections in wild and resident birds in Germany, 2017 and 2018. Viruses. 2019;11(7):674. https://doi.org/10.3390/v11070674 PMID: 31340516
19. Veo C, Della Ventura C, Moreno A, Rovida F, Percivalle E, Canziani S, et al. Evolutionary Dynamics of the Lineage 2 West Nile Virus That Caused the Largest European Epidemic: Italy 2011-2018. Viruses. 2019;11(9):814. https://doi.org/10.3390/v11090814 PMID: 31484295
20. Chaintoutis SC, Papa A, Pervanidou D, Dovas CI. Evolutionary dynamics of lineage 2 West Nile virus in Europe, 2004-2018: Phylogeny, selection pressure and phylogeography. Mol Phylogenet Evol. 2019;141:106617. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106617 PMID: 31521822

Check for updates

21. Srihi H, Chatti N, Ben Mhadheb M, Gharbi J, Abid N. Phylodynamic and phylogeographic analysis of the complete genome of the West Nile virus lineage 2 (WNV-2) in the Mediterranean basin. BMC Ecol Evol. 2021;21(1):183. https://doi.org/10.1186/s12862-021-01902-w PMID: 34579648
22. Johnson N, Fernández de Marco M, Giovannini A, Ippoliti C, Danzetta ML, Svartz G, et al. Emerging mosquito-borne threats and the response from European and Eastern Mediterranean countries. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(12):2775. https://doi.org/10.3390/ijerph15122775 PMID: 30544521
23. Beck HE, Zimmermann NE, McVicar TR, Vergopolan N, Berg A, Wood EF. Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. Sci Data. 2018;5(1):180214. https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214 PMID: 30375988
24. Pradier S, Sandoz A, Paul MC, Lefebvre G, Tran A, Maingault J, et al. Importance of wetlands management for West Nile Virus circulation risk, Camargue, Southern France. Int J Environ Res Public Health. 2014;11(8):7740-54. https://doi.org/10.3390/ijerph110807740 PMID: 25093652
25. Desjardins I, Joulié A, Pradier S, Lecollinet S, Beck C, Vial L, et al. Seroprevalence of horses to Coxiella burnetii in an Q fever endemic area. Vet Microbiol. 2018;215:49-56. PMID: 29426406
26. Eiden M, Gil P, Ziegler U, Rakotoarivony I, Marie A, Frances B, et al. Emergence of two Usutu virus lineages in Culex pipiens mosquitoes in the Camargue, France, 2015. Infect Genet Evol. 2018;61:151-4. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.020 PMID: 29592838
27. Chevalier V, Marsot M, Molia S, Rasamoelina H, Rakotondravao R, Pedrono M, et al. Serological evidence of west nile and usutu viruses circulation in domestic and wild birds in wetlands of mali and madagascar in 2008. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(6):1998. https://doi.org/10.3390/ijerph17061998 PMID: 32197367
28. Beck C, Desprès P, Paulous S, Vanhomwegen J, Lowenski S, Nowotny N, et al. A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. Biomed Res Int. 2015;2015:678084. https://doi.org/10.1155/2015/678084 PMID: 26457301
29. Nikolay B, Weidmann M, Dupressoir A, Faye O, Boye CS, Diallo M, et al. Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. J Virol Methods. 2014;197:51-4. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.039 PMID: 24036076
30. Garcia M, Alout H, Diop F, Damour A, Bengue M, Weill M, et al. Innate Immune response of primary human keratinocytes to West Nile Virus infection and its modulation by mosquito saliva. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:387. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00387 PMID: 30450338
31. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. Emerg Infect Dis. 2002;8(7):652-6. https://doi.org/10.3201/eid0807.020094 PMID: 12095429
32. Bahuon C, Marcillaud-Pitel C, Bournez L, Leblond A, Beck C, Hars J, et al. West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. Rev Sci Tech. 2016;35(3):811-24. https://doi.org/10.20506/rst.35.3.2571 PMID: 28332648
33. Vittecoq M, Lecollinet S, Jourdain E, Thomas F, Blanchon T, Arnal A, et al. Recent circulation of West Nile virus and potentially other closely related flaviviruses in Southern France. Vector Borne Zoonotic Dis. 2013;13(8):610-3. https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1166 PMID: 23930977
34. Durand B, Chevalier V, Pouillot R, Labie J, Marendat I, Murgue B, et al. West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. Emerg Infect Dis. 2002;8(8):777-82. https://doi.org/10.3201/eid0808.010486 PMID: 12141961
35. Pradier S, Sandoz A, Paul MC, Lefebvre G, Tran A, Maingault J, et al. Importance of wetlands management for West Nile Virus circulation risk, Camargue, Southern France. Int J Environ Res Public Health. 2014;11(8):7740-54. https://doi.org/10.3390/ijerph110807740 PMID: 25093652
36. Bahuon C, Marcillaud-Pitel C, Bournez L, Leblond A, Beck C, Hars J, et al. West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. Rev Sci Tech. 2016;35(3):811-24. https://doi.org/10.20506/rst.35.3.2571 PMID: 28332648
37. Young JJ, Coulombier D, Domanović D, Zeller H, Gossner CM, European Union West Nile Fever Working Group. One Health approach for West Nile virus surveillance in the European Union: relevance of equine data for blood safety. Euro Surveill. 2019;24(16):1. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.16.1800349 PMID: 31014416
38. Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, et al. Epidemiology of west nile in europe and in the mediterranean basin. Open Virol J. 2010;4(1):29-37. https://doi.org/10.2174/1874357901004010029 PMID: 20517490
39. Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, Gutierrez S, Gil P, Constant O, et al. Human Usutu virus infection with atypical neurologic presentation, Montpellier, France, 2016. Emerg Infect Dis. 2018;24(5):875-8. https://doi.org/10.3201/eid2405.171122 PMID: 29664365
40. Durand B, Haskouri H, Lowenski S, Vachiery N, Beck C, Lecollinet S. Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? Epidemiol Infect. 2016;144(9):1857-64. https://doi.org/10.1017/S095026881600011X PMID: 26838515
41. L'Ambert G, Gendrot M, Briolant S, Nguyen A, Pages S, Bosio L, et al. Mosquito excreta reveals circulation of West Nile virus and its underlying ecosystem. bioRxiv2021, 2021.12.05.471258, doi:. https://doi.org/10.1101/2021.12.05.471258
42. Lustig Y, Sofer D, Bucris ED, Mendelson E. Surveillance and diagnosis of west nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. Front Microbiol. 2018;9:2421. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02421 PMID: 30369916
43. Percivalle E, Cassaniti I, Sarasini A, Rovida F, Adzasehoun KMG, Colombini I, et al. West nile or usutu virus? A three-year follow-up of humoral and cellular response in a group of asymptomatic blood donors. Viruses. 2020;12(2):157. https://doi.org/10.3390/v12020157 PMID: 32013152
44. Grottola A, Marcacci M, Tagliazucchi S, Gennari W, Di Gennaro A, Orsini M, et al. Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. Clin Microbiol Infect. 2017;23(1):33-7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.019 PMID: 27677699
45. Clé M, Constant O, Barthelemy J, Desmetz C, Martin MF, Lapeyre L, et al. Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells. J Neuroinflammation. 2021;18(1):11. https://doi.org/10.1186/s12974-020-02060-4 PMID: 33407600
46. Angelini P, Tamba M, Finarelli AC, Bellini R, Albieri A, Bonilauri P, et al. West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. Euro Surveill. 2010;15(16):11-5. https://doi.org/10.2807/ese.15.16.19547-en PMID: 20430000
47. Paternoster G, Babo Martins S, Mattivi A, Cagarelli R, Angelini P, Bellini R, et al. Economics of One Health: Costs and benefits of integrated West Nile virus surveillance in Emilia-Romagna. PLoS One. 2017;12(11):e0188156. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188156 PMID: 29176851
48. Scaramozzino P, Carvelli A, Bruni G, Cappiello G, Censi F, Magliano A, et al. West Nile and Usutu viruses co-circulation in central Italy: outcomes of the 2018 integrated surveillance. Parasit Vectors. 2021;14(1):243. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04736-z PMID: 33962673
49. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Maioli G, et al. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. PLoS One. 2010;5(12):e14324. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014324 PMID: 21179462
50. Lauriano A, Rossi A, Galletti G, Casadei G, Santi A, Rubini S, et al. West nile and usutu viruses' surveillance in birds of the Province of Ferrara, Italy, from 2015 to 2019. Viruses. 2021;13(7):13. https://doi.org/10.3390/v13071367 PMID: 34372573

License, supplementary material and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence and indicate if changes were made.

Any supplementary material referenced in the article can be found in the online version.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2022.

Check for updates

Chapitre 4 : Discussion et conclusion

1 Discussion

Les virus émergents se répandent rapidement dans une population où ils peuvent causer de graves maladies à l'origine de problèmes majeures de santé publique (prise en charge des patients, surveillance et prévention dans les populations, impact économique sur la société). Parmi ceux-ci, certains peuvent atteindre le SNC et engendrer des troubles neuronaux, or la prise en charge de ces pathologies est un challenge auquel nous devons nous préparer. Dans ce contexte, ce travail tente de définir les mécanismes d'infection de la BHE et de décrire les caractéristiques de la neuroinflammation induite par certains de ces virus. De plus, nous avons apporté des données sur la circulation de deux arbovirus émergents illustrant la nécessité d'étudier leurs interactions avec les hôtes afin de prévenir les complications liées à l'infection.

1.1 Infection du système nerveux central

1.1.1 Passage et perturbation de la BHE

L'un des objectifs principaux de cette thèse est de caractériser l'infection de la BHE par différents virus émergents. Nos résultats ont montré des différences dans la pathogénèse et les conséquences de ces infections selon les virus. Un résumé de nos résultats et des évidences trouvées dans la littérature concernant l'accès au SNC par les virus étudiés est proposé (Figure 24).

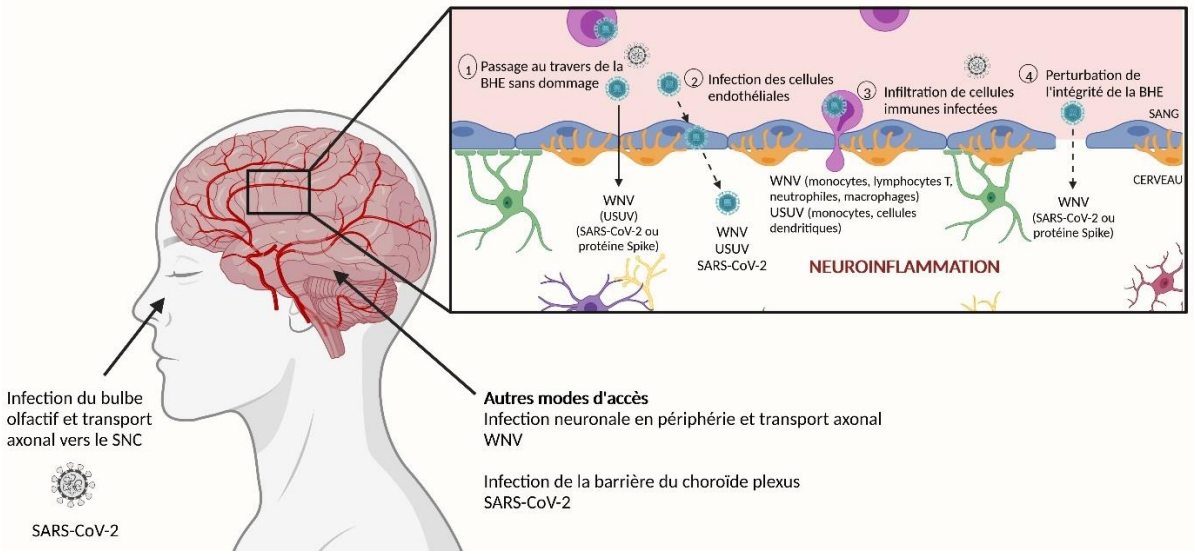


Figure 24 Résumé des voies d'accès au SNC des virus SARS-CoV-2, Usutu et West-Nile
D'après nos données et celles de la littérature, le virus SARS-CoV-2 semble pouvoir infecter certaines cellules du SNC et s'y introduire par infection du bulbe olfactif, du choroïde plexus ou par perturbation de l'intégrité de la BHE après inflammation, il pourrait aussi traverser la BHE sans dommage ou infecter les cellules endothéliales de manière transitoire. WNV peut accéder au SNC par transport axonal après infection de neurones, ou au travers de la BHE selon plusieurs mécanismes (passage de la barrière, infection des cellules endothéliales, mécanismes de cheval de Troie ou déstabilisation de la perméabilité). USUV peut infecter le SNC via la BHE par infection des cellules endothéliales, ou via le mécanisme de cheval de Troie, cependant il n'existe encore pas de données sur son transport axonal ; réalisation BioRender.

1.1.1.1 Le SARS-CoV-2

Pour le SARS-CoV-2, nos modèles ont clairement montré qu'ils étaient peu susceptibles à l'infection et n'entrainaient qu'une faible inflammation sans perturber la BHE. Ces observations corrèlent avec la faible expression du récepteur ACE-2 par nos modèles cellulaires, et les résultats obtenus par d'autres sur des cellules endothéliales cardiaques ou pulmonaires[538]. Actuellement, encore peu de preuves concluantes sur l'expression du récepteur ACE-2 dans le SNC et son implication dans la neuroinvasion ont été recueilles[499,539].

L'effet sur l'intégrité de la BHE est aussi très faible, voire absent, dans notre étude, ce qui est en accord avec des travaux réalisés *in vivo* où après infection par voie intra-nasale, les auteurs ont retrouvé le virus dans le SNC mais pas au niveau des vaisseaux[503]. Plus généralement, concernant le neurotropisme du virus, il semblerait que celui-ci puisse infecter les cellules nerveuses du bulbe olfactif, et accéder au SNC via un transport axonal. En effet *in vivo* sur des modèles de hamster et *in vitro*, certains variants du SARS-CoV-2 ont montré une neuroinvasion via ce bulbe olfactif[540]. Cependant ces observations n'ont pas été reproduites avec des variants plus récents comme omicron[541]. Chez des patients et sur ces modèles de hamster, d'autres ont montré que le virus avait un fort tropisme pour le bulbe olfactif, infectant les cellules épithéliales, nerveuses et immunes s'y trouvant[542]. Une autre étude sur ce même type de modèle *in vivo* n'a pas montré d'invasion virale du SNC après infection intranasale, cependant ils ont mis en évidence une forte neuroinflammation associée à des perturbations de la BHE et une activation microgliale vraisemblablement dû aux conséquences du choc cytokinique[543]. Par ailleurs, concernant l'inflammation systémique et le choc cytokinique associés à la Covid-19, nous n'avons pu explorer les effets des sérums de patients sur nos modèles de BHE que sur une très courte durée. Mais, au plus long terme, à l'aide d'autres modèles, une analyse de la contribution de cette inflammation dans le dérèglement de la BHE, la neuroinflammation et l'infiltration de cellules immunes serait essentielle. D'autres ont montré que des protéines virales pouvaient pénétrer dans le SNC entrainant des effets délétères sur ces cellules, cependant l'infection directe de la BHE par le virus semble peu probable[516,517,544]. Notre étude suggère donc que le virus n'atteint pas ou peu le SNC par un passage au travers de la BHE.

Cependant plusieurs aspects devraient être pris en considération :

- Notre étude s'est limitée à l'utilisation d'une souche virale apparut en France au début de l'épidémie, or le SARS-CoV-2 a connu un grand nombre de mutations et certains variants pourraient être plus neurovirulent[530].
- Dans nos travaux, nous avons analysés l'infection d'un seul type de cellules primaires de la BHE et les effets sur un seul modèle de BHE. Pour compléter ces données, nous pourrions utiliser d'autres types de cellules primaires ou de lignées cellulaires, ainsi que d'autres types de modèles de

barrière. Aussi, l'analyse *in vivo*, en utilisant des modèles murins ou de hamsters par exemple, serait un élément important pour la caractérisation de ces mécanismes.

- Parmi les autres travaux réalisés sur l'infection de la BHE par le SARS-CoV-2, une étude montre dans un modèle murin, l'expression d'ACE-2 par les péricytes (donnée que nous n'avons pas obtenue lorsque nous avons regardé cette expression dans notre modèle cellulaire de péricytes). Il est ainsi suggéré un rôle de ces cellules dans l'inflammation neuro-vasculaire et les troubles de la BHE liés à la Covid-19. Les analyses effectuées montrent notamment des concentrations faibles de PDGFRβ dans le LCR de leurs modèles suggérant une défaillance fonctionnelle des péricytes[539].
- Enfin une très récente publication a montré l'infection d'astrocytes primaires ou issus d'organoïdes par le variant original et qui pourrait avoir lieu en l'absence d'expression d'ACE-2 via une interaction avec les récepteurs CD147 et DPP4[545].
- D'autres parts, les perturbations de la BHE et la neuroinflammation observées pourraient être en majeure partie dues à la protéine spike. En effet celle-ci a été retrouvée dans le sang, le SNC, et peut être à l'origine d'une forte réponse inflammatoire[546]. Des analyses plus approfondies de son effet sur la BHE pourraient être envisagées.

1.1.1.2 Les *Flavivirus* Usutu et West-Nile

Concernant USUV, la co-circulation de différentes lignées sur un territoire donné est possible, tout comme la circulation séquentielle de ces lignées, notamment en Europe où des introductions répétées ont pu avoir lieu de l'Afrique vers l'Europe par le réservoir ou le vecteur[98]. Ce travail de thèse a permis d'apporter des informations supplémentaires sur le neurotropisme des différentes lignées d'USUV. *In vivo*, des charges virales importantes dans le SNC de souris ont pu être trouvées plus de 6 jours après l'infection, et de manière générale, toutes les lignées étaient capables d'accéder au SNC et d'induire des manifestations neurologiques. Nous avons tout de même pu noter des différences dans les caractéristiques de l'infection du SNC par les différentes lignées d'USUV comme cela fut aussi montré pour WNV[547]. Parmi elles, la lignée Europe 2 s'est révélée être la plus virulente avec l'induction de symptômes plus précocement et une mortalité plus élevée. Sur nos modèles cellulaires neuronaux des différences ont pu être observées dans l'infection, la réplication et la réponse antivirale entre les lignées avec une plus forte virulence d'Europe 2, cependant aucune d'entre elles n'a induit de modifications importantes des caractéristiques ou de la perméabilité de la BHE. D'autre part, nous avons pu constater une mutation dans le domaine RdRp de la protéine NS5 pour la lignée Europe 2. Cette mutation pourrait être associée à une plus forte capacité réplicative comme cela a été montré pour les virus JEV et TBEV[548,549].

Dans notre modèle de BHE, nous avons aussi démontré que les lignées Europe 2 d'USUV et 2 de WNV pouvaient se répliquer. Cette réplication est plus importante pour USUV mais l'intégrité de la barrière est plus fortement perturbée par WNV. De plus, les deux arbovirus induisent une forte réponse antivirale associée à de l'inflammation (de manière un peu plus importante pour WNV). L'infection du SNC par USUV et WNV est aussi étudiée par d'autres équipes de recherche, récemment une étude a exploré la susceptibilité de progéniteurs neuronaux à ces deux *Flavivirus* en comparant au ZIKV qui est connu pour avoir un fort tropisme pour ces cellules. Les résultats montrent une réplication, une réponse innée antivirale et un effet cytopathique plus important pour USUV que pour ZIKV, et des différences encore plus importantes pour WNV[496]. Différents travaux ont aussi montré la susceptibilité de cellules du SNC à ces deux arbovirus[93,242,495,550–552]. Certains aspects de l'entrée de WNV dans le SNC ont déjà été décrits et ont montré que le virus pouvait infecter des nerfs en périphérie et utiliser le transport axonal[375,471], utiliser la voie sanguine et traverser la BHE[475], induire une perte d'intégrité de celle-ci[489,553], ou utiliser le mécanisme de cheval de Troie[486,487]. Afin d'en apprendre plus sur USUV, très proche de WNV, nous avons donc voulu comparer les interactions de ces deux *Flavivirus* avec la BHE. Au vu des résultats obtenus sur notre modèle de barrière, plusieurs points peuvent être discutés:

- L'infection des cellules endothéliales seules dans notre modèle, après retrait des péricytes par exemple une fois que ces cellules ont été différenciées, compléterait nos données. En effet, cela permettrait de distinguer les effets de l'infection sur les cellules endothéliales seules des effets généraux induits sur la BHE dont les péricytes qui contribuent certainement à la réponse antivirale, la neuroinflammation et les perturbations d'intégrité de la barrière. Ainsi, nous pourrions aussi distinguer la réplication virale dans le compartiment basolatéral qui serait dû uniquement à la réplication dans les cellules endothéliales, de celle dû à la réplication dans les cellules endothéliales et les péricytes.
- D'ailleurs, les péricytes sont aussi susceptibles à l'infection par USUV et WNV et entrainent une réponse antivirale inflammatoire ; il pourrait être intéressant de connaitre les effets de cet environnement inflammatoire sur la BHE. En effet, un virus infectant le SNC par une autre voie pourrait arriver à infecter les autres cellules de l'unité neuro-vasculaire avant la BHE ce qui pourrai induire des modifications de ses propriétés. Pour cela, on pourrait utiliser le surnageant cellulaire des péricytes après infection et le mettre en contact avec les cellules endothéliales dans notre modèle de BHE. Cette méthode a été réalisée après infection d'astrocytes par WNV[491].
- Les mécanismes régissant la perturbation de la BHE et plus spécifiquement des jonctions de la barrière doivent être caractérisés afin de comprendre les différences entre USUV et WNV. A ce propos, les interactions de la protéine NS1 avec la BHE devraient être étudiées ; en effet dans le cadre de travaux sur DENV, ZIKV et WNV, la glycosylation sur un site de NS1 a montré une capacité

d'interaction avec des cellules endothéliales à l'origine d'hyperperméabilité[554]. Cette protéine peut avoir un nombre important de différences entre les lignées de WNV, ce qui ne semble pas être le cas chez USUV. Notre équipe, en collaboration avec un autre groupe de recherche, explore d'ailleurs ces caractéristiques. En effet, après avoir produit et caractérisé une protéine recombinante de NS1, celle-ci a été injecté à des modèles murins. Les effets de cette protéine seule pourront ainsi être décrit et notamment dans le SNC par analyses moléculaires et histologiques.

- Les effets directs du passage de la BHE pourraient aussi être étudiés, puisque nous le verrons par la suite, ce passage peut avoir de nombreuses conséquences sur notre SNC. Par exemple, la perturbation de la BHE et de l'homéostasie du SNC suite à une neuroinflammation pourrait participer au développement de certaines pathologies du spectre autistique[555].
- Une autre observation de nos travaux est la présence d'une apoptose dans le SNC des souris infectées par les différentes lignées d'USUV. Il serait intéressant de comparer ces mécanismes apoptotiques avec WNV, pour lequel une induction de l'apoptose a été montrée dans d'autres modèles cellulaires de neurones[556], et d'analyser leurs rôles dans le développement des troubles neuronaux associés à ces deux virus. En outre, les miARN produites lors de l'infection par les *Flavivirus* ont été suggérés comme ayant un rôle primordial dans l'activation de l'apoptose neuronal et pourraient être étudié dans un contexte thérapeutique[557].
- Les effets des infections sur la perméabilité de la BHE nous ont révélé que 10 jours après, WNV pouvait modifier significativement l'intégrité de la barrière alors que les modifications engendrées par USUV sont plus modestes et ne témoignent pas d'un véritable trouble. Cependant, nous pouvons noter que nos analyses ont été faites en utilisant une technique de mesures du passage du jaune de Lucifer, une petite molécule de 400 Da, permettant d'identifier des variations fines de l'intégrité de la BHE[558]. Il existe d'autres techniques, par exemple la mesure du TEER, qui sont plus sujettes au biais dus au manipulateur ou qui ne pourront détecter des variations que lorsque celles-ci sont très importantes. D'autres travaux ont montré qu'à l'inverse de nos résultats, USUV était capable d'induire une forte perturbation de la BHE alors que WNV ne modifiait pas la perméabilité[559]. Plusieurs aspects sur ces résultats peuvent être discutés, les travaux ont été réalisés sur un autre type de modèle utilisant des cellules endothéliales issues de lignées de cellules pluripotentes souches et des astrocytes, et les mesures ont été faites entre 1 et 3 jours après l'infection à l'aide du TEER. Afin de conclure sur cet effet il faudrait donc analyser nos modèles à des temps plus court ou analyser d'autres modèles avec la technique du jaune de Lucifer.
- L'intégrité de la BHE repose sur plusieurs facteurs dont l'expression des jonctions. Or il a été montré que WNV pouvait activer certaines enzymes GTPases comme RhoA suite à l'induction d'IFN de type I engendrant une perte des jonctions serrées[560]. Il serait intéressant de connaitre les

interactions entre USUV et ces protéines, ce qui pourrait apporter de plus amples connaissances sur les mécanismes de dérégulation de la BHE induit par WNV[561].

- La délétion de l'intégrine αVβ3 dans un modèle de souris a entrainé une diminution de l'internalisation et surtout de la réplication de USUV et WNV[562]. Or dans nos études, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression de αV et β3 suite aux infections de la BHE par USUV et WNV. Les interactions de ces virus avec ces intégrines au niveau de la BHE pourraient être mieux caractérisées.
- Au niveau de la réponse antivirale initiée par les cellules de la BHE, nous avons pu constater une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IFN de type I (à 4 et 7 jours après infection). Cependant, cela ne semble pas interférer avec la réplication du virus puisque jusqu'à 10 jours après l'infection on retrouve d'importants titres viraux, notamment dans le compartiment basolatéral du modèle de BHE. Cet aspect de la résistance des virus aux réponses antivirales de l'hôte a déjà été décrit, cependant les mécanismes exactes ne sont pas encore ou peu connus[260].

1.1.2 Rôle des cellules immunes

Lors du passage de la BHE, les virus peuvent être à l'origine d'une augmentation de l'inflammation qui donne lieu à un recrutement de cellules immunes participant à la clairance virale mais parfois aussi à la neuroinflammation et aux symptômes de type encéphalite ou méningo-encéphalite. Au travers des travaux de cette thèse, nous avons pu constater une forte inflammation suite à l'infection de la BHE par USUV et WNV. Nous nous sommes donc ensuite intéressés aux effets de cette inflammation sur les cellules immunes, et nous avons pu constater un recrutement accru de monocytes, de lymphocytes T et de DC par la barrière infectée. Aussi, les monocytes en contact avec l'environnement inflammatoire, fournit par le surnageant de la BHE après infection, présentent des signes d'activation. Ces données mériteraient d'être approfondies, nous pourrions par exemple étudier l'effet des cytokines seules sur la BHE et les cellules immunes afin de mieux comprendre les mécanismes de recrutement par ces cytokines. Aussi, les macrophages sont des cellules importantes dans la surveillance continue du sang et notamment au niveau des méninges[563], il pourrait donc être intéressant d'analyser leur rôle dans l'infection de la BHE par USUV et WNV.

Les facteurs permettant ce recrutement cellulaire sont nombreux, on peut notamment évoquer le rôle des chimiokines comme CXCL10 dans l'attraction des lymphocytes T $CD8^{+}$[564]. Or dans nos travaux, nous avons pu mettre en évidence une surexpression et sécrétion de chimiokines, dont CXCL10, par les cellules de la BHE après infection. Le rôle de ces chimiokines dans la pathogénèse d'USUV et WNV pourrait être plus détaillé afin d'analyser l'effet de leur inhibition par exemple sur l'infection du SNC et la mortalité associée[484]. Nous avons aussi constaté une augmentation

d'expression de CAM. Ceci suggère que l'utilisation d'anticorps ciblant ces CAM pourrait permettre une diminution de l'adhésion des leucocytes, une diminution de la perte d'intégrité de la BHE, et donc une diminution de la neuroinflammation. Cela a notamment déjà été suggéré pour ZIKV ou WNV[390,486]. L'infection de la BHE par USUV et WNV entraine donc une augmentation des CAM exprimées par les cellules endothéliales, mais aussi des sélectines et des intégrines, or cela est associé à une augmentation du stress et des perturbations dans le cytosquelette de ces cellules. Et ces modifications auront finalement comme effet d'accentuer l'adhésion et la migration des cellules immunes, la perméabilité vasculaire, et l'infection par les virus[551,565]. Dans ce processus, les autres cellules de la BHE ne doivent pas être négligées, en effet nous avons vu dans le sérum de patients WNND la présence de la chimiokine neuroinflammatoire MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), or celle-ci peut être sécrétée par des péricytes infectés. De la même façon les astrocytes ont la capacité de sécréter des chimiokines ou des CAM participant au recrutement leucocytaire[407].

Le mécanisme de cheval de Troie est un important paramètre dans l'infection du SNC et la neuroinflammation. WNV a montré une capacité à infecter des cellules NK, des monocytes et des lymphocytes T afin de traverser la BHE[483,486,487]. Nous avons pu montrer de façon inédite un recrutement par la BHE augmenté pour les monocytes et DC infectés par USUV. Nous avons aussi mis en évidence que l'infection des DC par USUV induisait une augmentation d'expression de CAM, de chimiokines et de jonctions intercellulaires leur permettant des capacités accrues d'interaction avec la barrière. Ces résultats pourraient être affinés en étudiant la transmigration des DC et monocytes infectés au travers de modèles de BHE ou en approfondissant le rôle des intégrines et des CAM dans ce processus par l'utilisation d'anticorps ou de technique de génétique. Ces données devraient aussi être étudiées dans le cas d'infections par d'autres lignées d'USUV. Enfin il serait intéressant d'étudier les autres modes d'accès au SNC pouvant être employé par USUV comme l'infection des neurones en périphérie, et d'étudier les effets des étapes précoces d'infection *in vivo* au niveau de la peau sur le neurotropisme des différentes lignées des virus USUV et WNV.

Dans le cas de la Covid-19, l'infection de cellules immunes par le SARS-CoV-2 a été montrée mais ne semble pas donner lieu à de fortes réplications et être rapidement endiguée. Cependant ces cellules immunes infectées peuvent accentuer l'inflammation systémique endommageant ainsi potentiellement les barrières dont la BHE[167,528].

1.1.3 Biomarqueurs et neuroinflammation

Comme évoqué en introduction et dans cette discussion, l'infection virale du SNC peut être accompagnée d'une forte réponse antivirale elle-même conduisant à une neuroinflammation par la libération de cytokines, d'autres molécules pro-inflammatoires, de chimiokines à l'origine du recrutement de leucocytes et finalement à des lésions et des atteintes neuronales[566,567]. Ces atteintes neuronales peuvent donner lieu à des séquelles parfois irréversibles et au développement de maladies neurodégénératives[365,568]. La présence de molécules dans le sang qui seraient signatures de ces atteintes ou de tels troubles au long terme permettrait donc de développer des tests pour le suivi des patients, une meilleure prise en charge de leur maladie et d'anticiper le développement des séquelles. Mesuré plus précocement, les biomarqueurs sanguins permettraient d'aider au diagnostic, d'anticiper l'évolution des symptômes ainsi que la gravité de l'infection.

1.1.3.1 Le SARS-CoV-2

Nos travaux sur le SARS-CoV-2 n'ont pas révélé de fortes réponses antivirales après infection des cellules de la BHE. Cependant, nous avons pu observer de très fortes concentrations de cytokines, chimiokines et CAM dans le sérum de patients Covid-19, qui sont significativement plus importantes que pour des contrôles sains. Ces molécules pourraient être des candidats envisagés comme biomarqueurs, donnant la possibilité de suivre l'évolution de la maladie et l'inflammation associée qui est un facteur important lors des complications liées à l'infection par le SARS-CoV-2. Des travaux ont d'ailleurs été réalisés à ce propos, par exemple il a été proposé un diagnostic relativement rapide par la détection du marqueur CD169 sur les monocytes qui serait associé aux prémices de l'infection par le SARS-CoV-2 et plus largement aux infections virales aigues[569]. Cet outil serait efficace lors d'émergences virales pour lesquelles d'autres tests diagnostiques seraient indisponibles à un temps donné, bien que plus précis et spécifiques. Concernant la neuroinflammation, la protéine NFL, évoquée pour le suivi des patients atteints de symptômes neurologiques suite à une infection par le SARS-CoV-2, a aussi démontré un fort potentiel comme marqueur prédictif de maladies neurodégénératives. Notamment, dans des modèles murins, des concentrations plus élevées que la norme dans le LCR et dans le sérum ont pu être relevées parfois plusieurs mois avant le développement des symptômes[570]. Et chez des patients ayant eu des complications neurologiques la concentration de ce marqueur a été retrouvée élevée avant leur hospitalisation et jusqu'à 3 mois après[571]. A propos des atteintes neurovasculaires rencontrées par certains patients, des analyses de la neuroinflammation et des marqueurs sanguins sur des échantillons de patients suggèrent que les effets de l'infection sur les vaisseaux sanguins cérébraux seraient dus à l'activation du système du complément en réponse à l'infection. Le système du complément activerait ensuite lui-même les cellules endothéliales[521].

L'infection est accompagnée d'une inflammation persistante avec par exemple l'activation de cellules immunes comme les lymphocytes T et B jusqu'à 8 mois après l'infection. Aussi des marqueurs de l'inflammation comme l'IL-6, l'IFN-β , l'IFN-γ et l'IFN-λ ont été définis comme biomarqueurs pour la prédiction et le suivi des effets au long terme de l'infection par ce *Coronavirus*[572]. Des études montrent clairement des conséquences sur le système neuronale suite aux infections par le SARS-CoV-2 qui sont peut-être encore peu connues et peu caractérisées mais qui appuient l'importance du suivi des patients pour limiter leurs apparitions[573].

1.1.3.2 Les *Flavivirus* Usutu et West-Nile

Concernant les effets neurologiques induits par WNV, nous avons pu analyser le sérum de patients infectés et comparer l'état inflammatoire et la présence de marqueurs d'atteintes neurologiques entre les groupes de patients selon la nature de leurs symptômes ou avec des patients non infectés. Nous avons révélé des concentrations de molécules inflammatoires plus importantes dans le sérum des patients ayant développé une forme neurologique de la maladie (WNND), en comparaison avec ceux qui ont eu une fièvre aigüe passagère et les contrôles sains révélant ainsi une quantité de marqueurs inflammatoires qui apparaissent relativement tôt et peuvent donc être révélateurs du développement de formes neuroinvasives. D'autre part, ces concentrations de molécules inflammatoires peuvent rester élevées plus de 20 jours après l'apparition des symptômes pour ces patients WNND. Or les conséquences d'une inflammation systémique sur le long terme peuvent être associées au développement de troubles comme de la fatigue chronique, des troubles neurocognitifs ou une morbidité plus élevée par exemple[366,574]. Concernant ces atteintes neurologiques, nous avons aussi mis en évidence la présence de marqueurs neuroinflammatoires dans le sérum des patients WNND. En effet, nous avons pu détecter des molécules associées au développement de maladies neurodégénératives, neuroinflammatoires ou de lésions neuronales, et pouvant être des candidats biomarqueurs. Des études sur de plus grandes cohortes de patients avec un suivi dans le temps plus séquencé seraient souhaitables afin de discriminer l'efficacité et la significativité de l'utilisation de ces biomarqueurs dans la prise en charge des patients WNV dès leur diagnostic. Par exemple, il faudrait établir des analyses dès les trois premiers jours d'infection, entre 5 à 10 jours, entre 15 à 30 jours, et plus de 45 jours après. Cela nous apporterait plus de connaissances sur l'évolution du statut inflammatoire des patients et le suivi des biomarqueurs dans le temps selon le type de symptômes développés. Des études de marqueurs cellulaires ou génomiques concernant d'autres modèles de pathogènes semblent prometteuses pour l'amélioration des prises en charge des patients[462,575]. Il serait donc intéressant d'analyser aussi les marqueurs cellulaires ou génomiques liés aux infections par WNV et USUV afin de compléter ces données.

Les molécules inflammatoires retrouvées dans notre étude ont aussi été mises en lien avec le développement d'atteintes neuronales. Il est notamment suggéré d'analyser les concentrations d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-8 ou de TNF-α pour prévenir les troubles neuronaux que pourraient développer les nouveau-nés afin de prendre en charge les encéphalopathies néonatales[576]. En s'intéressant aux marqueurs des atteintes neurologiques, nous avons pu mettre en évidence la présence de certaines molécules dans le sérum des patients WNND comme le facteur neurotrophique issu du cerveau (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), le facteur de survie neuronale GDNF (pour *glial dependant neurotrophic factor*), GFAP, la protéine kallicréine-6, la chimiokine MIF, la molécule d'adhésion cellulaire neuronale NCAM-1 ou la protéine TDP-43 (pour *TAR DNA-binding protein 43*). Comme pour la DENV, dans les infections neuroinvasives par TBEV la présence de certains de ces marqueurs neuronaux, par exemple MIF, et l'association à certains autres marqueurs génétiques permettraient d'appréhender les risques[577]. A propos de MIF, cette protéine favorise la neuroinvasion, en augmentant la perméabilité de la BHE via l'induction de cytokines pro-inflammatoires. De plus, MIF semble induire l'expression de MMP. Ces métalloprotéases, notamment MMP-1 et MMP-9, facilitent l'entrée de WNV dans le cerveau[488,489]. Chez l'humain et le modèle murin, l'infection par WNV provoque l'augmentation de MIF, avec une concentration importante détectée dans le plasma et le LCR[578]. Au niveau de la BHE, la protéine MIF libérée pendant la neuroinflammation peut participer au dérèglement des jonctions intercellulaires tout comme MMP-9, ceci a notamment été montré dans le cas d'une induction de ces deux protéines par la protéine virale NS1 de DENV et ZIKV[579]. Le rôle de MIF dans les cas d'infection par WNV ou USUV devrait aussi être exploré. MIF et NCAM-1 sont des chimiokines et des CAM dont le rôle dans la neuroinflammation est particulièrement important et qui sont des candidats comme biomarqueurs. En effet certaines CAM peuvent être sécrétées dans le sérum ce qui les rend candidates comme marqueur de suivi des infections comme cela a été suggéré pour un autre *Flavivirus*, DENV[580].

La protéine GFAP a déjà été révélé comme étant surexprimée dans d'autres études sur WNV ce qui corrobore nos résultats[47] ; de plus elle a été associé à des problèmes dans la neurovascularisation. En effet, des concentrations importantes de GFAP dans le sérum ont été corrélées à des risques accrues de séquelles après des épisodes d'épilepsies, d'arrêts cardiaques ou de traumatismes crâniens, et la protéine semble être un indicateur pour prévenir la mortalité chez des nouveau-nés qui ont recours à des techniques d'oxygénation par membrane extracorporelle[576]. De la même façon sur une cohorte pédiatrique, la protéine BDNF mesurée dans le sérum ou le LCR a été associée aux infections du SNC de type méningite bactérienne ou encéphalopathie aigue, aidant ainsi au diagnostic différentiel[581]. Le facteur neurotrophe GDNF est aussi étudié pour ses caractéristiques

de biomarqueurs, par exemple, il est retrouvé dans des vésicules inflammatoires extracellulaires associées à une mortalité plus élevée chez les patients d'environ 60 ans[582].

De manière générale, pour les tests réalisés sur des sérums le nombre d'échantillons et la répétabilité des résultats obtenus sont à prendre en compte pour l'analyse de ces données et la robustesse des informations qui en découlent[583]. Dans le cadre de l'analyse de la neuroinflammation sur la cohorte de patients infectés par WNV et provenant de Hongrie, nous pourrions par exemple analyser des cohortes d'autres origines afin de compléter ces données. La lignée à l'origine de l'infection est aussi un paramètre important dans l'étude de la pathogénèse virale, malheureusement cette donnée n'était pas disponible pour tous les échantillons testés. Cependant, la lignée 2 a été retrouvée chez tous les patients pour lesquels l'analyse a pu être faite ce qui concorde avec les données sur la circulation de WNV dans cette région de l'Europe à cette période[584,585]. Une autre limite expérimentale lors de la réalisation de tests ELISA en multiplex est la limite de détection des molécules, puisque par défaut lorsque la concentration est trop faible pour établir une valeur exacte, une valeur minimum est donnée par le fabricant, cela peut parfois masquer des différences de concentrations faibles mais significatives entre les groupes d'échantillons analysés. Cependant, l'utilisation de tel type de test permet de réduire le volume d'échantillons nécessaires en apportant des données sur un grand nombre d'éléments.

Les encéphalites virales peuvent donc être associées au développement de maladies neurodégénératives ou de troubles neuronaux[586], or ces maladies neuronales ont aussi de lourdes conséquences sur la santé publique. La découverte puis l'utilisation de biomarqueurs permettrait d'appréhender les maladies causées par les virus émergents, de prendre en charge et suivre les patients, et de prévenir les risques sur le long terme.

1.1.4 Conséquences au long terme

Les infections directes du SNC, l'inflammation et la neuroinflammation sont des facteurs de maladies neurodégénératives, neuroinflammatoires ou neurocognitives[587]. En effet, de plus en plus de lien sont faits entre l'infection virale du SNC, la réponse antivirale associée à de la neuroinflammation et les risques accrues de développer une maladie neurodégénérative[588]. Par exemple les infections par le virus de la grippe ont été associées à une forte réponse inflammatoire systémique avec la sécrétion de TGF-α, IFN-γ ou IL-6 capable d'activer la microglie et d'induire de la neuroinflammation qui peut elle-même être un facteur de risque du développement de la maladie de Parkinson[589]. Plus généralement, il semblerait que les réponses immunes aberrantes ou dérégulées, et la neuroinflammation, initiée par des infections virales, soient des facteurs importants dans le développement de maladies neurodégénératives[590].

1.1.4.1 Le SARS-CoV-2

Lors d'une infection par le SARS-CoV-2, environ 80% des patients vont développer des symptômes persistants pouvant être de type neuronaux comme des malaises et des céphalées, ou des pertes ou une défaillance de la mémoire[524]. Une étude a notamment montré que sur 60 patients ayant eu des symptômes neuronaux pendant la phase aigüe d'infection, 51% présentent encore des troubles (légers à sévères) 1 an et demi après l'infection[591]. D'après l'OMS, 25% des infections par le SARS-CoV-2 seraient à l'origine d'un syndrome de séquelles post-Covid, avec parmi les complications les plus préoccupantes des troubles de la santé mentale impactant économiquement le patient, son entourage et la société[592]. En effet, une étude montre un risque accru significatif de développer une maladie mentale suite à l'infection et plus particulièrement lors d'une hospitalisation, avec une augmentation des troubles anxieux, dépressifs, du sommeils, ou même une augmentation des consommations d'opioïdes[593]. D'autres travaux ont suggéré que le développement du Covid-long pourrait être lié à une dysfonction ou une perte de fonction dans la présentation des antigènes du virus par le système CMH, avec une persistance de ces antigènes dans l'organisme. Dans ce contexte, les traitements utilisant des anticorps contre ces antigènes seraient préconisés[523]. Concernant la persistance virale, il semblerait que 65% des patients Covid-long possèdent dans leur sérum des antigènes viraux, principalement la protéine spike pour une majorité d'entre eux. En effet cette protéine virale a été retrouvée dans ces sérums à plusieurs temps d'intervalle sur des périodes de 2 à 12 mois après l'infection. Cette étude suggère la persistance du virus sous forme de réservoirs viraux, et l'utilisation de spike comme biomarqueur de Covid-long[594]. Par ailleurs, la persistance du virus a aussi été montré lors de la mise en évidence d'ARN viraux dans les fèces de patients jusqu'à 210 jours après l'infection. En effet, ces patients présentaient des troubles gastro-intestinaux, parfois plusieurs semaines ou mois après la disparition de troubles respiratoires. Et il semblerait que ces troubles soient corrélés avec la présence d'ARN viral dans les matières fécales, suggérant la persistance du virus au niveau des tissus gastro-intestinaux[595]. Dans le SNC, le virus ainsi que la protéine spike ont pu être retrouvés, parfois plusieurs mois après l'infection, sur des autopsies de patients et différents modèles d'études[505,542,596,597].

1.1.4.2 Les *Flavivirus* Usutu et West-Nile

Les arbovirus peuvent aussi avoir de lourdes conséquences neurologiques comme JEV qui peut engendrer des pertes de mémoire, des défauts de langage, des troubles comportementaux, jusqu'à 2 ans après l'infection ou le virus Zika à l'origine d'anomalies de formations neuronales et de microcéphalies[586]. Pour USUV, encore trop peu de cas d'infections et d'études ont été effectuées pour connaître les troubles neuronaux au long terme, cependant sa similarité avec WNV peut laisser penser

qu'il sera aussi à l'origine de certains troubles neurologiques. Pour WNV il existe de nombreux rapports sur les conséquences neurologiques de l'infection, certains montrent que plus de 8 ans après l'infection, des patients présentent des troubles neuronaux comme des pertes d'audition, des troubles de la démarche, des réflexes anormaux ou des faiblesses musculaires[92,598]. Une étude canadienne a aussi montré que les patients ayant souffert de WNND ont plus de risques de présenter des troubles mentaux et sociaux jusqu'à 2 ans après l'infection[599]. Au niveau des mécanismes, des liens entre l'inflammation des patients WNND, et particulièrement des patients obèses ayant subi des encéphalites suite à l'infection par WNV, les concentrations sériques élevées de CCL2 et de TNF-α, et la dépression ont été suggérés même si la corrélation n'a pu être mise en évidence[600]. A ce propos, la protéine BDNF est souvent discutée comme marqueur de dépression, dans ce cas elle serait en concentration plus faible chez les patients, de plus elle aurait un rôle important dans la plasticité neuronale et les communications synaptiques. La concentration élevée que l'on a retrouvée chez nos patients WNND traduirait une activation des systèmes de protection (potentiellement afin de protéger contre le développement de troubles neuronaux) et de réparation du SNC[601]. La protéine NCAM-1 a été proposé comme biomarqueur des troubles du spectre de la neuromyélite optique, il s'agit d'une pathologie auto-immune inflammatoire et chronique du SNC pouvant entrainer des pertes de myéline au niveau des nerfs optiques et de la moelle épinière[602]. Or cette pathologie pourrait être une conséquence au long terme des infections par les *Flavivirus,* comme cela a été suggérer pour le virus Zika[603]. Ainsi la présence de NCAM-1 à des concentrations anormales dans le sérum pourrait permettre d'explorer cette voie et d'anticiper le développement de cette pathologie. Nos études sur la neuroinflammation ont montré des augmentations de concentrations sériques de marqueurs neuronaux généralement associé à des maladies neurodégénératives comme MIF ou TDP-43, ce qui peut suggérer un lien direct entre l'infection par WNV, la neuroinflammation et les risques au long terme[568,583]. Nous avons aussi vu une augmentation des concentrations de kallicréine-6 chez les patients WNND, or cette molécule est associée au développement de maladie neurodégénératives comme la SEP. Il a d'ailleurs été suggérer l'utilisation d'inhibiteur de cette protéase pour aider à la prise en charge des patients souffrant de SEP[604]. L'impact d'une telle inhibition durant l'infection par un *Flavivirus* neurotrope pourrait être étudié.

1.1.5 Limites expérimentales

Les données de ce travail concernant l'accès au SNC et la neuroinflammation induite lors de l'infection par des virus émergents, ont été obtenues grâce à l'utilisation de modèles cellulaires (lignées cellulaires, cellules primaires, modèles cellulaires en bi-culture) et de modèles murins. Bien que physiologiquement représentatifs des mécanismes pouvant se dérouler lors de l'infection humaine, certaines limites dans leur utilisation peuvent être soulignées[605]. Concernant les expérimentations réalisées sur des cellules primaires, même si ces cellules sont beaucoup plus proches physiologiquement du *in vivo* en comparaison à des lignées cellulaires, on peut évoquer certaines limites dans leur étude puisqu'il s'agit de modèle en monoculture donc très éloigné de ce qui peut se produire dans un organisme où les cellules interagissent avec un grand nombre d'éléments comme d'autres cellules, les matrices extracellulaires, ou même d'autres organes. Elles permettent cependant de caractériser de nombreux éléments de la pathogénèse et de ses mécanismes. L'utilisation du modèle de BHE humaine permet de reproduire les caractéristiques et le phénotype de cette barrière avec notamment une expression physiologique des jonctions. Mais, la présence de péricytes bovins dans le compartiment basolatéral du modèle apportent quelques limites : par exemple, lors de leur infection ils peuvent produire des cytokines ou d'autres molécules qui n'auront pas les effets retrouvés dans l'organisme puisqu'elles n'auront pas de récepteurs adaptés sur les cellules endothéliales, ainsi une partie des informations sur la réponse à l'infection de la BHE serait manquante. Cependant, nous avons pu réaliser quelques expérimentations en utilisant un modèle avec des péricytes humains (issus de biopsies de patient) qui montrent pour l'instant le même type de résultats et de données, malheureusement le modèle n'a pu être complétement mis en place et caractérisé pour ce travail. Aussi, nous avons pu réaliser quelques essais avec un modèle en triculture utilisant des astrocytes dans le compartiment basolatéral, des péricytes sur la face basolatérale du filtre, et les cellules endothéliales sur la face apicale. Ce modèle, bien que plus complexe, ne comportent pas d'avantages identifiés dans nos études puisqu'il n'y a pas de différence en terme de caractéristiques de la barrière comme l'expression des jonctions. D'autre part, *in vivo*, la BHE est une structure entre le sang et le SNC et se trouve donc confronté à un mouvement fluidique constant du sang. Cette propriété de la barrière n'a pas été exploré avec ce modèle, pour cela il faudrait utiliser des modèles de BHE en plusieurs dimensions et soumis à une force fluidique[606]. Par exemple, une étude très récente a utilisé un modèle microfluidique composé de neurones dérivés de cellules souches pluripotentes, de microglie, d'astrocytes, de péricytes et de cellules endothéliales cérébrales dérivées de cellules souches pluripotentes. Ce modèle beaucoup plus complexe permet l'étude des interactions entre toutes les cellules de l'unité neuro-vasculaire, les auteurs ont notamment montré l'importance du rôle de la microglie dans la régulation de la neuroinflammation. Plus généralement, l'utilisation de ce modèle

appui l'importance de la communication entre les cellules de l'unité neuro-vasculaire pour maintenir les propriétés de la BHE[607]. Le développement de modèles plus complexes appelés organoïdes laisse aussi la possibilité d'étudier de nouveaux types de modèles de BHE[561]. Pour étudier l'hypoxie et la neurotoxicité, un modèle d'organoïde a par exemple été développé utilisant des cellules endothéliales cérébrales, des astrocytes, la microglie, des neurones mais aussi des oligodendrocytes. Malgré des tests de caractérisation et de validation supplémentaires nécessaires, ce modèle semble prometteur pour l'étude des neuropathologies[608].

Pour certains de nos travaux, notamment pour avoir un modèle susceptible à l'infection par USUV, nous avons utilisé des souris *Ifnar*$^{-/-}$, celles-ci permettent de retrouver des symptômes et une présence virale avec des atteintes neurologiques du SNC par USUV et WNV[609]. Cependant ce modèle murin, de par sa nature, présente une réponse antivirale amoindrie puisque les souris ont été délétées des récepteurs aux IFN de type I. Ceci pose des limites en termes d'analyse de la réponse inflammatoire et antivirale suite à l'infection pouvant aussi influencer les mécanismes d'atteintes neurologiques. En outre, concernant les études *in vivo,* la voie d'inoculation du virus est un paramètre important à prendre en compte puisque l'infection par USUV et WNV se déroule lors de la piqûre d'un moustique au niveau du derme ou de l'épiderme qui joue un rôle important dans l'infection notamment par les composants de la salive du moustique sécrétée en même temps que le virus[610]. En effet, la composition salivaire de la piqûre influence l'infection, par exemple la réponse immune contre la salive va activer des mécanismes comme des infiltrations vasculaires qui vont faciliter la dissémination virale. Afin de reproduire au plus près l'infection naturelle par les arbovirus, des injections en sous-cutané ou utilisant directement des moustiques seraient préférables[611].

Concernant l'utilisation de ces modèles, et afin de compléter nos données, il serait intéressant de comparer les effets de l'infection sur des modèles différents, par exemple comparer l'infection de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux issues de lignées ou primaires. Comme nous l'avons fait sur différentes études, la comparaison de la pathogénèse sur différents modèles *in vitro* et *in vivo*, a notamment permis d'avoir des données robustes concernant l'infection du SNC par USUV par exemple. Enfin, la répétabilité des résultats obtenus et la taille des échantillons sont des critères importants afin de rendre les données obtenues robustes[612].

1.2 Autres commentaires sur la virulence

Evoqué en introduction, les taux de mutations des virus à ARN sont très importants, en partie dû aux nombreuses erreurs introduites par leur enzyme RdRp, environ une erreur pour chaque 10^{-3} à 10^{-6} nucléotides[613]. Ces mutations peuvent être intégrées sur le long terme lorsqu'elles permettent une adaptation[614], et donner naissance à de nouveaux variants viraux. En conséquence, les populations virales peuvent vite être très hétérogènes pour un même virus et comporter de nombreuses souches issues de différentes lignées. Or, pour un même virus, ces différences vont parfois donner lieu à des modifications de virulence et dans la pathogénèse. Par exemple, il existe deux lignées importantes de ZIKV, la lignée africaine et la lignée asiatique qui a émergé plus récemment et à plusieurs reprises, entrainant à chaque fois des épidémies. Il se trouve que cette dernière est capable d'induire un nombre important de microcéphalies lors de l'infection des femmes enceintes et d'autres symptômes neuronaux; des travaux suggèrent ainsi que la lignée africaine serait plus virulente, entrainant des manifestations plus aigües et létales[615,616]. Initialement pour USUV, un premier séquençage fût effectué sur un virus isolé chez un patient atteint de troubles neurologiques (il s'agissait d'une infection par la lignée Europe 2, en 2009). La comparaison de cette séquence avec celles retrouvées chez des vecteurs et des réservoirs a montré des mutations au niveau de la protéine d'enveloppe E et de la protéine NS5. Ces mutations ont alors été associées à la virulence neuronale humaine[549]. Dans nos travaux comparants les lignées USUV et leur neurovirulence, nous avons aussi pu mettre en évidence une mutation dans le domaine RdRp de la protéine NS5 pour la lignée Europe 2 qui est retrouvée chez d'autres *Flavivirus* neurotropes comme JEV ou WNV[549]. Cette mutation pourrait être liée à une meilleure capacité de réplication de ces virus. Cette caractéristique de la lignée Europe 2 semble expliquer les différences de virulence observées dans notre étude. Par exemple, lors de l'étude de comparaison des lignées USUV, la lignée Europe 2 est la seule qui a induit un effet cytopathogène persistent et particulier (formant des clusters de cellules mortes) sur les cellules endothéliales, les astrocytes, la microglie et les cellules neuronales. Cette caractéristique peut être due à cette mutation de NS5 permettant une meilleure réplication et induisant cet effet cellulaire. Cette lignée a aussi montré une plus forte virulence dans d'autres modèles comme sur des embryons de poulets où l'antigène viral a été retrouvé dans leur cerveau et une plus forte mortalité a été associé à l'infection par USUV Europe 2[142].

1.3 Surveillance de la circulation virale

Enfin pour appuyer l'importance de ces travaux nous avons travaillé sur la circulation d'USUV et WNV dans notre région du sud de la France, et l'importance de leur surveillance. En effet, les deux virus partagent de nombreux caractères communs dont : leur distribution géographique dans certaines régions, les mêmes types d'hôtes et de vecteurs, de fortes similitudes antigéniques et des atteintes neurologiques proches. Nous avons donc pu mettre en évidence la séroprévalence pour les deux virus dans différentes espèces aviaires et mammifères du zoo de Montpellier, et leur présence dans des vecteurs, des réservoirs et des hôtes accidentels dans la région camarguaise. En outre, au zoo de Montpellier, dans une zone urbaine et au sein d'un espace clos, nous avons pu constater une séroprévalence plus élevée pour USUV chez les oiseaux, et nous avons dévoilé la susceptibilité de nouvelles espèces à l'infection comme les canidés (*Canidae*) en général et notamment les *Lycaon*. De manière plus générale sur les régions de Montpellier et en Camargue, nous avons pu montrer la présence des virus dans leur vecteur depuis plusieurs années suggérant l'endémisation, et appuyé par les résultats chez les réservoirs sédentaires. Enfin, l'humain n'est pas épargné par la circulation de ces deux arbovirus, puisqu'on retrouve une séroprévalence comprise entre 1.2 et 3% sur une population courante provenant du CHU de Montpellier.

Au cours de nos deux études de séroprévalence, au zoo de Montpellier et dans la région de Montpellier et en Camargue, nous avons analysés des échantillons collectés à différents temps. Il est important de discriminer ces temps et les séroprévalences pour chaque année analysée puisque nous savons que la circulation de ces *Flavivirus* est saisonnière en Europe (elle accompagne la circulation des vecteurs), qu'elle est soumise aux réémergences ou introductions répétées par le réservoir, et que la lignée virale prédominante peut varier. Aussi dans notre étude « One health », nous avons pu évaluer la séroprévalence dans la population équine seulement pour la période de 2016, alors que dans les populations aviaire, canine et humaine nous avons réalisé les analyses sur des échantillons de 2019-2020. Comme évoqué précédemment, le nombre d'échantillons analysé est aussi une limite à prendre en compte dans nos analyses pour avoir des taux de prévalence plus précis, et ce pour toutes les populations analysées. Ces analyses de séroprévalence apportent de solides informations à la compréhension des virus et de leur circulation, ainsi qu'à l'exposition des hôtes, et permettent de mettre en évidence des espèces potentiellement susceptible à l'infection et de mettre en lumière l'importance de la surveillance de ces virus. Cependant, il s'agit d'études rétrospectives et passives qui peuvent être plus simple et moins couteuses à mettre en place mais qui ne permettent pas l'anticipation. Une autre limite expérimentale à ces études est la nature des hôtes réservoirs. S'agissant d'oiseaux migrateurs, lors de la découverte d'une infection (présente ou antérieure) on ne peut

discerner l'origine de celle-ci, ce qui limite aussi les données sur l'origine des émergences de ces *Flavivirus*.

Lors de l'émergence d'un virus ou durant une épidémie, il est importance de connaitre le type de virus circulant et la virulence de celui-ci afin d'appréhender les potentiels problématiques de santé publique. Par exemple, la Martinique a connu des épidémies plus virulentes avec plus de cas sévères de DENV par rapport à la Guadeloupe ou à la Guyane car le sérotype circulant sur l'île n'était pas le même que celui circulants dans les deux autres territoires à cette période (communication du Dr. André Cabié). Ainsi, les variants du SARS-CoV-2 ont changé la donne pendant la crise sanitaire. Les études sur le variant omicron, qui a émergé après le variant delta très virulent, ont pu montrer qu'il était moins susceptible d'infecter les voies respiratoires basses, vraisemblablement en ayant développé un mécanisme d'entrée dans les cellules indépendant du cofacteur TMPRSS2. Ainsi, même si ce variant est beaucoup plus contagieux il va infecter préférentiellement les cellules respiratoires du tractus supérieur et donc diminuer l'apparition de complications respiratoires sévères[617]. Concernant les troubles neuronaux associés à l'infection, il a été montré sur une large cohorte que l'émergence du variant delta a augmenté les risques d'AVC, d'épilepsies, les troubles anxieux et cognitifs ainsi que l'incidence des décès. Ensuite l'apparition d'omicron a permis de réduire cette dernière mais les risques neurologiques et psychologiques sont restés importants[618].

Pour les arbovirus, les épisodes épidémiques ont entrainé une augmentation de la circulation de WNV lignée 2 en Europe qui a conduit à l'épidémie de 2018. En effet, rétrospectivement, des analyses sur les animaux d'un zoo en Slovénie ont révélé que 16 et 14 des 261 animaux testés étaient respectivement porteurs d'anticorps contre WNV et USUV. Ils auraient été infectés entre 2016 et 2017 suggérant une circulation de ces arbovirus avant les épidémies qui ont eu lieues en 2018. Cette étude révèle aussi l'importance de la mise en place de programme de surveillance et d'alerte[619]. En 2020, WNV a entrainé le décès de certaines espèces d'oiseaux dans un zoo allemand, suite à cela des pièges pour moustiques ont été déposé dans la région et ont permis la capture de centaines de moustiques femelles dont 99% de *C. pipiens*. Parmi ceux-ci, 8 ont été testés positifs pour WNV[620]. Ce travail essaie d'appuyer aussi sur l'importance des programmes de surveillance au niveau des vecteurs qui peuvent permettre d'anticiper l'infection humaine. Pour USUV, la co-circulation de plusieurs lignées est observée fréquemment : en Allemagne ont été retrouvé les lignées Europe 2, 3 et 5 et Afrique 2 et 3[114,621–623], en Italie les lignées Europe 2 et 4 circulent[624], et en France les lignées Afrique 2 et 3 ont été retrouvées[120]. Les enjeux de ces co-circulations peuvent être les mécanismes de recombinaisons génomiques peuvent avoir lieu lors de la co-infection d'une seule cellule hôte avec deux virus du même sérogroupe ou deux variants par exemple. Or ces mécanismes peuvent donner lieu à l'apparition de nouveaux pathogènes avec des virulences différentes. Ceci a pu être observé pour JEV[625]. Se pose alors

la question des compétences vectorielles qui pourraient faciliter la propagation d'un des deux *Flavivirus,* J. Fors, *et al.*, suggèrent à ce propos une meilleure compétence des *C. pipiens* pour USUV que WNV[626], cependant lors de la co-infection du vecteur il semble que la transmission de USUV soit réduite mais pas celle de WNV, alors qu'une préexposition à USUV réduit les taux de transmission de WNV[627]. Chez les hôtes aussi les co-circulations et/ou les co-infections peuvent avoir des conséquences encore mal définies. On peut citer la découverte chez des patients suspectés d'atteintes neuronales par WNV, d'anticorps neutralisants contre USUV, interrogeant alors sur la capacité de ces virus d'induire des anticorps facilitants à l'origine d'ADE[101,628]. Il semblerait aussi que lors de la co-infection par WNV et USUV de cellules C6/36 et Vero, WNV se révèle plus virulent (communication du Dr. G. Pijlman en séminaire).

Pour les tests ELISA pan-*Flavivirus* réalisés sur les sérums, les seuils de détection peuvent être une limite dans les études de séroprévalence arbovirale mais une autre limite aussi très importante est l'existence des réactions croisées. En effet les anticorps dirigés contre un virus peuvent réagir contre un autre de la même famille à cause des homologies protéiques, notamment au niveau des épitopes reconnus par ces anticorps. C'est pourquoi lors de nos études tous les échantillons positifs lors du test *pan-Flavivirus* étaient ensuite analysés en séroneutralisation spécifique contre USUV ou WNV. Cependant, là encore certains anticorps sont capables de neutraliser les 2 virus limitant alors la discrimination entre eux, ou la mise en évidence d'infections antérieures par les deux *Flavivirus*. Il pourrait être aussi souhaitable d'avoir des échantillons de contrôles positifs pour lesquels on connait les dates d'infection et la symptomatologie qui était associée.

Enfin un autre aspect à aborder concernant la circulation des arbovirus USUV et WNV concerne les transmissions non-vectorielles. ZIKV a par exemple révélé des cas sévères de microcéphalie suite à l'apparition de cette caractéristique. Peu d'études ont été faites à ce sujet pour WNV et USUV, cependant pour ce dernier des travaux montrent une transmission verticale possible chez le moustique[130], et plus récemment notre équipe a mis en évidence la susceptibilité de cellules placentaires de souris au virus suggérant une voie de transmission verticale[629]. En Italie très récemment aussi, une étude a révélé l'infection d'un oiseau par WNV dans une région jusqu'alors indemne du virus et à une période durant laquelle le vecteur *C. pipiens* est absent[630]. Les auteurs suggèrent une transmission par un autre type de moustique ou une transmission directe entre hôtes.

1.4 Perspectives

Une des pistes de recherche sur ces travaux est la caractérisation des mécanismes à l'origine des différences de virulence des différentes lignées d'USUV et WNV. Ces différences peuvent être dues à des évènements différents au cours de la réplication virale (entrée cellulaire des virus, traduction et réplication, interactions avec les protéines de l'hôte et la réponse antivirale). Pour comprendre cela des études moléculaires et génétiques peuvent être appliquées ainsi que des analyses de la réponse antivirale et des mécanismes de restriction. Des travaux supplémentaires seraient nécessaires afin d'approfondir les données sur le mécanisme de cheval de Troie employé par USUV et WNV, et notamment le rôle des DC dans l'infection du SNC par USUV. D'autres parts, il serait intéressant de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la déstabilisation de la BHE par WNV que l'on ne retrouve pas lors d'infection par USUV. Ceci pourrait mettre en lumière une voie thérapeutique permettant de préserver la vascularisation neuronale.

Les perspectives thérapeutiques contre les *Flavivirus* sont multiples. Concernant les vaccins, beaucoup ont été développés pour cibler la protéine E, or cette stratégie entraine des problèmes d'ADE comme décrit pour la DENV, la stratégie à adoptée serait donc de trouver des anticorps avec un fort potentiel neutralisant[16]. A ce propos, la première description de ce phénomène fut réalisée avec WNV et JEV[631]. D'autres stratégies proposent donc de viser la protéine NS1[632]. En effet il s'agit d'un facteur de réplication important pour le virus et qui peut être exprimé sous forme dimérique à la membrane des cellules hôtes ou peut être sécrété sous forme d'hexamère soluble[256]. En terme de molécules antivirales, des peptides antimicrobiens ont été proposés pour promouvoir la réponse immune aux sites d'infection et pour inactiver directement les particules virales[633]. Sur la BHE, l'utilisation de traitement à base d'IFN-β pourrait permettre de diminuer la perméabilité de la barrière, la production de MMP, l'afflux des lymphocytes T et d'augmenter la production d'IFN-γ qui régulerai la sécrétion de TNF-α et donc impacterai potentiellement la neuroinflammation. Ce traitement est notamment proposé dans la prise en charge de la SEP[634]. Après une crise épileptique, les cellules de l'unité neuro-vasculaire ont été extraites d'une souris et ont montré une augmentation d'expression d'ostéopontine. Cette molécule est une chimiokine qui est aussi surexprimée après une infection par WNV. Or, *in vivo*, l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette chimiokine après une crise épileptique a montré des effets protecteurs sur la BHE, une diminution de l'activation gliale et du risque hémorragique[635]. Cette piste pourrait aussi être étudiée dans le cas des complications WNND.

La surveillance des émergences est un processus en pleine croissance et des études et la mise en place de collaboration sont nécessaires pour améliorer la préparation et la prise en charge des épidémies. Par exemple, en aout 2021 il y avait plus de 600 essais cliniques contre la Covid-19 mais seulement une dizaine s'intéressait au comportement, à l'environnement ou aux impacts sociétaux

des interventions et des mesures de santé publique[636]. Dans nos océans, il y aurait à chaque moment donné, environ 10^{31} virus, et actuellement un peu plus de 9 000 virus sont classifiés et nommés. Ces chiffres illustrent l'étendue des connaissances que nous n'avons pas encore sur le monde virologique, et l'importance de l'étude des virus pour comprendre les interactions avec leurs hôtes et anticiper les conséquences de celles-ci sur la santé publique mais aussi plus largement sur l'environnement[637].

2 Conclusion générale

Les virus émergents peuvent infecter notre SNC, causant des dommages parfois sévères, pouvant perdurer, et possiblement à l'origine du développement de maladies neurologiques plus graves. Cette thèse a mis en évidence plusieurs points à ce sujet. L'infection de la BHE par le SARS-CoV-2 est transitoire, n'entraine pas de forte réponse inflammatoire ni de perturbation de l'intégrité de la barrière. Le SNC peut réagir différemment à l'infection par les différentes lignées USUV *in vitro* et *in vivo*, mais globalement ce virus est capable de se répliquer dans les cellules du SNC et il entraîne une forte réponse inflammatoire. La lignée Europe 2 semble être la plus virulente, et lors de la comparaison de cette virulence sur la BHE avec le WNV, il semble qu'elle puisse se répliquer plus rapidement, induisant une aussi forte réponse inflammatoire. Cependant quelques différences ont pu être découvertes : WNV est capable de perturber la perméabilité de la barrière, et l'infection de DC par USUV peut entrainer un recrutement accru par la BHE. Suite à l'infection par ces deux arbovirus, la forte réponse inflammatoire et la capacité de recrutement des cellules immunes peuvent assurer une neuroinflammation. Cette thèse a aussi pu explorer les biomarqueurs de l'inflammation et des atteintes neurologiques suite à l'infection par WNV sur une cohorte de patient, révélant ainsi une forte inflammation systémique pouvant perdurer plus de 20 jours après l'infection, et la présence de marqueurs d'atteintes neuronales dans le sérum des patients avec des encéphalites, méningites ou méningo-encéphalites. Cette étude éclaire un peu plus l'utilisation des biomarqueurs pour le suivi des patients subissant des infections du SNC. Et finalement, l'importance de tous ces travaux a été mise en lumière grâce à l'étude de la circulation de USUV et WNV dans le sud de la France, montrant leur présence active depuis au moins 2015, et une séroprévalence humaine qui soulève l'intérêt et l'importance de leurs études et de leur surveillance.

Références

1. Küry, P. *et al.* Human Endogenous Retroviruses in Neurological Diseases. *Trends Mol. Med.* **24**, 379–394 (2018).
2. Forterre, P. Defining Life: The Virus Viewpoint. *Orig. Life Evol. Biosph.* **40**, 151–160 (2010).
3. LWOFF, A. The concept of virus. *J. Gen. Microbiol.* **17**, 239–253 (1957).
4. Morse, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* **1**, 7–15 (1995).
5. Mandl, J. N. *et al.* Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell* **160**, 20–35 (2015).
6. Morens, D. M. & Fauci, A. S. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell* **182**, 1077–1092 (2020).
7. Douam, F. & Ploss, A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol.* **26**, 913–928 (2018).
8. Garzon Jimenez, R. C., Lieshout-Krikke, R. W. & Janssen, M. P. West Nile virus and blood transfusion safety: A European perspective. *Vox Sang.* **116**, 1094–1101 (2021).
9. Sherley, M. & Ong, C. W. Sexual transmission of Zika virus: A literature review. *Sex. Health* **15**, 183–199 (2018).
10. Gubler, D. J. Human Arbovirus Infections Worldwide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **951**, 13–24 (2001).
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **48**, 845–9 (1999).
12. Campos, G. S., Bandeira, A. C. & Sardi, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1885–1886 (2015).
13. van den Hurk, A. F., Skinner, E., Ritchie, S. A. & Mackenzie, J. S. The Emergence of Japanese Encephalitis Virus in Australia in 2022: Existing Knowledge of Mosquito Vectors. *Viruses* **14**, 1208 (2022).
14. Kraemer, M. U. G. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. Albopictus. *Elife* **4**, 1–18 (2015).
15. Bellone, R. & Failloux, A.-B. The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission. *Front. Microbiol.* **11**, (2020).
16. Pierson, T. C. & Diamond, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat. Microbiol.* **5**, 796–812 (2020).
17. Puntasecca, C. J., King, C. H. & Labeaud, A. D. Measuring the global burden of Chikungunya and Zika viruses: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **15**, 1–18 (2021).
18. Sigfrid, L. *et al.* Preparing clinicians for (re-)emerging arbovirus infectious diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 229–239 (2018).
19. Metz, S. W. & Pijlman, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. *J. Invertebr. Pathol.* **107**, S16–S30 (2011).
20. Saul, S., Huang, P. T., Einav, S. & Asquith, C. R. M. Identification and evaluation of 4-anilinoquin(az)olines as potent inhibitors of both dengue virus (DENV) and Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **52**, 128407 (2021).
21. David, S. & Abraham, A. M. Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect. Dis. (Auckl).* **48**, 571–586 (2016).
22. Duarte, J. L. *et al.* Nanotechnology as a tool for detection and treatment of arbovirus infections. *Acta Trop.* **216**, (2021).
23. Gesto, J. S. M. *et al.* Reduced competence to arboviruses following the sustainable invasion of Wolbachia into native Aedes aegypti from Southeastern Brazil. *Sci. Rep.* **11**, 1–14 (2021).
24. Alphey, L. *et al.* Sterile-Insect Methods for Control of Mosquito-Borne Diseases: An Analysis.

Vector-Borne Zoonotic Dis. **10**, 295–311 (2010).

25. Rodhain, F. Yellow fever: A brief history of a tropical Virosis. *Presse Med.* **51**, 104132 (2022).
26. Cadar, D. *et al.* Blood donor screening for west nile virus (WNV) revealed acute usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Eurosurveillance* **22**, 1–5 (2017).
27. Bakonyi, T. *et al.* Usutu virus infections among blood donors, Austria, july and august 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges. *Eurosurveillance* **22**, 1–6 (2017).
28. Kuhn, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**, 717–725 (2002).
29. Lindenbach, B., Murray, C. L., Thiel, H. J. & Rice, C. M. Flaviviridae. *Fields Virol.* 712–746 (2013).
30. Laureti, M., Narayanan, D., Rodriguez-Andres, J., Fazakerley, J. K. & Kedzierski, L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front. Immunol.* **9**, 1–11 (2018).
31. Mendes, Y. S. *et al.* The Structural Dynamics of the Flavivirus Fusion Peptide–Membrane Interaction. *PLoS One* **7**, e47596 (2012).
32. Klema, V. J., Padmanabhan, R. & Choi, K. H. Flaviviral replication complex: Coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping. *Viruses* **7**, 4640–4656 (2015).
33. Schuessler, A. *et al.* West Nile Virus Noncoding Subgenomic RNA Contributes to Viral Evasion of the Type I Interferon-Mediated Antiviral Response. *J. Virol.* **86**, 5708–5718 (2012).
34. Slonchak, A. & Khromykh, A. A. Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research. *Antiviral Res.* **159**, 13–25 (2018).
35. Pierson, T. C. & Diamond, M. S. Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 168–175 (2012).
36. Apte-Sengupta, S., Sirohi, D. & Kuhn, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.* **9**, 134–142 (2014).
37. Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W. & Paul, J. H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **s1**-**20**, 471–492 (1940).
38. Melnick, J. L. *et al.* Isolation from Human Sera in Egypt of a Virus Apparently Identical to West Nile Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **77**, 661–665 (1951).
39. Taylor, R. M., Rizk, F., Work, T. H. & Hurlbut, H. S. A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **5**, 579–620 (1956).
40. BARDOS, V. *et al.* Neutralizing antibodies against some neurotropic viruses determined in human sera in Albania. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **3**, 277–282 (1959).
41. Murgue, B. *et al.* West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: The return after 35 years. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 692–696 (2001).
42. Tsai, T., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G. & Nedelcu, N. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* **352**, 767–771 (1998).
43. Lvov, D. K. *et al.* Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in southern Russia, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 373–376 (2000).
44. Lanciotti, R. S. *et al.* Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science (80-.).* **286**, 2333–2337 (1999).
45. Gubler, D. J. The continuing spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 1039–1046 (2007).
46. Zeller, H. G. & Schuffenecker, I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 147–156 (2004).
47. Habarugira, G., Suen, W. W., Hobson-Peters, J., Hall, R. A. & Bielefeldt-Ohmann, H. West nile virus: An update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and "One health" implications. *Pathogens* **9**, 1–51 (2020).
48. Wijayasri, S. *et al.* West Nile virus illness in Ontario, Canada: 2017. *Canada Commun. Dis. Rep.*

45, 32–37 (2019).

49. Martin, M. F. & Simonin, Y. West Nile virus historical progression in Europe. *Virologie* **23**, 265–270 (2019).
50. Bakonyi, T. *et al.* Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 618–623 (2006).
51. Bakonyi, T. *et al.* Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet. Microbiol.* **165**, 61–70 (2013).
52. Danis, K. *et al.* Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1868–1872 (2011).
53. Nagy, A. *et al.* Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Eurosurveillance* **24**, (2019).
54. Velasco, M. *et al.* Imported Human West Nile Virus Lineage 2 Infection in Spain: Neurological and Gastrointestinal Complications. *Viruses* **12**, 156 (2020).
55. Pietsch, C. *et al.* Autochthonous west nile virus infection outbreak in humans, Leipzig, Germany, August to September 2020. *Eurosurveillance* **25**, 1–6 (2020).
56. Simpson, J. E. *et al.* Avian host-selection by Culex pipiens in experimental trials. *PLoS One* **4**, 1–5 (2009).
57. Mencattelli, G. *et al. Epidemiology of West Nile virus in Africa: An underestimated threat*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **16**, (2022).
58. Komar, N. *et al.* Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 311–322 (2003).
59. Potter, P. North American Birds and West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1518–1519 (2004).
60. Brault, A. C. *et al.* A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat. Genet.* **39**, 1162–1166 (2007).
61. Sotelo, E. *et al.* Characterization of West Nile virus isolates from Spain: New insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology* **395**, 289–297 (2009).
62. Hayes, E. B. *et al.* Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases* **11**, 1174–1179 (2005).
63. Rochlin, I., Faraji, A., Healy, K. & Andreadis, T. G. West Nile Virus Mosquito Vectors in North America. *J. Med. Entomol.* **56**, 1475–1490 (2019).
64. Hubálek, Z. & Halouzka, J. West Nile Fever–a Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 643–650 (1999).
65. Vogels, C. B. F. *et al.* Latitudinal Diversity of Culex pipiens Biotypes and Hybrids in Farm, Peri-Urban, and Wetland Habitats in Europe. *PLoS One* **11**, e0166959 (2016).
66. Patsoula, E. *et al.* West Nile Virus Circulation in Mosquitoes in Greece (2010–2013). *Biomed Res. Int.* **2016**, 1–13 (2016).
67. FORTUNA, C. *et al.* Evaluation of vector competence for West Nile virus in Italian Stegomyia albopicta (= Aedes albopictus) mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.* **29**, 430–433 (2015).
68. Girard, Y. A., Klingler, K. A. & Higgs, S. West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected Culex pipiens quinquefasciatus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **4**, 109–122 (2004).
69. Weaver, S. C. Electron Microscopic Analysis of Infection Patterns for Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus in the Vector Mosquito, Culex (Melanoconion) Taeniopus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 624–631 (1986).
70. Styer, L. M. *et al.* Mosquitoes Inoculate High Doses of West Nile Virus as They Probe and Feed on Live Hosts. *PLoS Pathog.* **3**, e132 (2007).
71. Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E. & Rios, M. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–20 (2015).

72. Joubert, L. *et al.* [Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse]. *Ann. Inst. Pasteur (Paris).* **118**, 239–247 (1970).
73. Ain-Najwa, M. Y. *et al.* Exposure to Zoonotic West Nile Virus in Long-Tailed Macaques and Bats in Peninsular Malaysia. *Animals* **10**, 2367 (2020).
74. BUSANI, L. *et al.* West Nile virus circulation in Veneto region in 2008–2009. *Epidemiol. Infect.* **139**, 818–825 (2011).
75. Root, J. J. & Bosco-Lauth, A. M. West Nile Virus Associations in Wild Mammals: An Update. *Viruses* **11**, 459 (2019).
76. Farfán-Ale, J. A. *et al.* Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**, 908–914 (2006).
77. Kostiukov, M. A., Gordeeva, Z. E., Bulychev, V. P., Nemova, N. V & Daniiarov, O. A. [The lake frog (Rana ridibunda)--one of the food hosts of blood-sucking mosquitoes in Tadzhikistan--a reservoir of the West Nile fever virus]. *Med. Parazitol. (Mosk).* 49–50 (1985).
78. Venter, M. *et al.* Cytokine Induction after Laboratory-Acquired West Nile Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1260–1262 (2009).
79. Venter, M. *et al.* Transmission of West Nile virus during horse autopsy. *Emerging infectious diseases* **16**, 573–575 (2010).
80. Blázquez, A. B. & Sáiz, J. C. West Nile virus (WNV) transmission routes in the murine model: Intrauterine, by breastfeeding and after cannibal ingestion. *Virus Res.* **151**, 240–243 (2010).
81. Hinckley, A. F., O'Leary, D. R. & Hayes, E. B. Transmission of West Nile Virus Through Human Breast Milk Seems to Be Rare. *Pediatrics* **119**, e666–e671 (2007).
82. O'Leary, D. R. *et al.* Birth outcomes following West Nile Virus infection of pregnant women in the United States: 2003-2004. *Pediatrics* **117**, e537-45 (2006).
83. Kelley, R. E., Berger, J. R. & Kelley, B. P. WEST NILE VIRUS MENINGO-ENCEPHALITIS: POSSIBLE SEXUAL TRANSMISSION. *J. La. State Med. Soc.* **168**, 21–2 (2016).
84. Cushing, M. M. *et al.* Fatal West Nile virus encephalitis in a renal transplant recipient. *Am. J. Clin. Pathol.* **121**, 26–31 (2004).
85. Montgomery, S. P. *et al.* Transfusion-associated transmission of West Nile virus, United States 2003 through 2005. *Transfusion* **46**, 2038–2046 (2006).
86. Petersen, L. R. & Hayes, E. B. Westward Ho? — The Spread of West Nile Virus. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2257–2259 (2004).
87. Gallian, P. *et al.* Prevention of West Nile virus transmission by blood transfusion: a comparison of nucleic acid test screening assays. *Transfusion* **45**, 1540–1541 (2005).
88. Pisani, G., Cristiano, K., Pupella, S. & Liumbruno, G. M. West Nile Virus in Europe and Safety of Blood Transfusion. *Transfus. Med. Hemotherapy* **43**, 158–167 (2016).
89. Percivalle, E. *et al.* West nile or usutu virus? A three-year follow-up of humoral and cellular response in a group of asymptomatic blood donors. *Viruses* **12**, 1–11 (2020).
90. Samuel, M. A. & Diamond, M. S. Pathogenesis of West Nile Virus Infection: a Balance between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion. *J. Virol.* **80**, 9349–9360 (2006).
91. Bode, A. V., Sejvar, J. J., Pape, W. J., Campbell, G. L. & Marfin, A. A. West Nile Virus disease: A descriptive study of 228 patients hospitalized in a 4-county region of Colorado in 2003. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 1234–1240 (2006).
92. Sejvar, J. J. The long-term outcomes of human West Nile virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 1617–24 (2007).
93. Luo, H. & Wang, T. Recent advances in understanding West Nile virus host immunity and viral pathogenesis. *F1000Research* **7**, 338 (2018).
94. Lecollinet, S. *et al.* Viral Equine Encephalitis, a Growing Threat to the Horse Population in Europe? *Viruses* **12**, 23 (2019).

95. WOODALL, J. P., WILLIAMS, M. C., CORBET, P. S. & HADDOW, A. J. THE ISOLATION OF SINDBIS VIRUS FROM THE MOSQUITO MANSONIA (COQUILLETTIDIA) FUSCOPENNATA (THEOBALD) IN UGANDA. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **58**, 383–389 (1964).
96. Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S. B. & Sall, A. A. Usutu virus in Africa. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **11**, 1417–1423 (2011).
97. Weissenböck, H., Bakonyi, T., Rossi, G., Mani, P. & Nowotny, N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 274–277 (2013).
98. Engel, D. *et al.* Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. *MBio* **7**, 1–12 (2016).
99. Weissenböck, H. *et al.* Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 652–656 (2002).
100. Gaibani, P. & Rossini, G. An overview of Usutu virus. *Microbes Infect.* **19**, 382–387 (2017).
101. Ashraf, U. *et al.* Usutu virus: An emerging flavivirus in Europe. *Viruses* **7**, 219–238 (2015).
102. Mannasse, B. *et al.* Usutu virus RNA in mosquitoes, Israel, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1699–1702 (2017).
103. Cavrini, F. *et al.* Usutu virus infection in a patient who underwent orthotropic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* **14**, (2009).
104. Pecorari, M. *et al.* First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Eurosurveillance* **14**, 9–10 (2009).
105. Clé, M. *et al.* Le virus Usutu : la menace fantôme. *Médecine/Sciences* **34**, 709–716 (2018).
106. Simonin, Y. *et al.* Human Usutu virus infection with atypical neurologic presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 875–878 (2018).
107. Graninger, M. *et al.* The First Case of Usutu Virus Neuroinvasive Disease in Austria, 2021. *Open Forum Infect. Dis.* **9**, 4–7 (2022).
108. Vilibic-Cavlek, T. *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the 'One health' context, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* **66**, 1946–1957 (2019).
109. Santini, M. *et al.* First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August–September 2013: clinical and laboratory features. *J. Neurovirol.* **21**, 92–97 (2015).
110. Pacenti, M. *et al.* Clinical and virological findings in patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018. *Eurosurveillance* **24**, 1–10 (2019).
111. Vilibic-Cavlek, T. *et al.* Epidemiology of usutu virus: The european scenario. *Pathogens* **9**, 1–19 (2020).
112. Gill, C. M. *et al.* Usutu virus disease: a potential problem for North America? *J. Neurovirol.* **26**, 149–154 (2020).
113. Paniz-Mondolfi, A. E., Villamil-Gómez, W. E. & Rodríguez-Morales, A. J. Usutu virus infection in Latin America: A new emerging threat. *Travel Med. Infect. Dis.* **14**, 641–643 (2016).
114. Michel, F. *et al.* Evidence for west nile virus and usutu virus infections in wild and resident birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses* **11**, (2019).
115. Meister, T. *et al.* Serological evidence of continuing high Usutu virus (Flaviviridae) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. *Vet. Microbiol.* **127**, 237–248 (2008).
116. Weissenböck, H. *et al.* Usutu virus activity in Austria, 2001-2002. *Microbes Infect.* **5**, 1132–1136 (2003).
117. Bakonyi, T. *et al.* Emergence of usutu virus in Hungary. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3870–3874 (2007).
118. Rijks, J. M. *et al.* Widespread Usutu virus outbreak in birds in The Netherlands, 2016. *Eurosurveillance* **21**, (2016).
119. Lecollinet, S. *et al.* Dual emergence of Usutu virus in common blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 2225–2227 (2016).

120. Eiden, M. *et al.* Emergence of two Usutu virus lineages in Culex pipiens mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infect. Genet. Evol.* **61**, 151–154 (2018).
121. Cook, C. L. *et al.* North American Culex pipiens and Culex quinquefasciatus are competent vectors for Usutu virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, 1–8 (2018).
122. Mancini, G. *et al.* Specie di zanzare coinvolte nella circolazione dei virus della West Nile e Usutu in Italia. *Vet. Ital.* **53**, 97–110 (2017).
123. Bates, T. A. *et al.* American Aedes japonicus japonicus, Culex pipiens pipiens, and Culex restuans mosquitoes have limited transmission capacity for a recent isolate of Usutu virus. *Virology* **555**, 64–70 (2021).
124. Bażanów, B. *et al.* A survey on West Nile and Usutu viruses in horses and birds in Poland. *Viruses* **10**, 12–14 (2018).
125. Durand, B. *et al.* Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: Dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiol. Infect.* **144**, 1857–1864 (2016).
126. Montagnaro, S. *et al.* Serological Evidence of Mosquito-Borne Flaviviruses Circulation in Hunting Dogs in Campania Region, Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **19**, 142–147 (2019).
127. Escribano-Romero, E. *et al.* Previous Usutu Virus Exposure Partially Protects Magpies (Pica pica) against West Nile Virus Disease But Does Not Prevent Horizontal Transmission. *Viruses* **13**, 1409 (2021).
128. García-Bocanegra, I. *et al.* Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC Vet. Res.* **12**, 1–9 (2016).
129. Diagne, M. M. *et al.* Usutu virus isolated from rodents in Senegal. *Viruses* **11**, 1–13 (2019).
130. Vazquez, A. *et al.* Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Eurosurveillance* **16**, (2011).
131. Domanović, D. *et al.* West nile and usutu virus infections and challenges to blood safety in the European Union. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 1050–1057 (2019).
132. Cavrini, F. *et al.* A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Virol.* **50**, 221–223 (2011).
133. Grottola, A. *et al.* Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**, 33–37 (2017).
134. Clé, M. *et al.* Usutu virus: A new threat? *Epidemiol. Infect.* **147**, e232 (2019).
135. Calzolari, M. *et al.* Mosquito, Bird and Human Surveillance of West Nile and Usutu Viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. *PLoS One* **7**, e38058 (2012).
136. Allering, L. *et al.* Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from South-West Germany, 2012. *Eurosurveillance* **17**, 5–7 (2012).
137. Pierro, A. *et al.* Detection of specific antibodies against West Nile and Usutu viruses in healthy blood donors in northern Italy, 2010-2011. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, E451–E453 (2013).
138. Hrnjaković Cvjetković, I. *et al.* SEROPREVALENCE OF MOSQUITO-BORN AND TICK-BORN MICROORGANISMS IN HUMAN POPULATION OF SOUTH BACKA DISTRICT. *Arch. Vet. Med.* **9**, 23–30 (2016).
139. Percivalle, E. *et al.* Usutu Virus Antibodies in Blood Donors and Healthy Forestry Workers in the Lombardy Region, Northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **17**, 658–661 (2017).
140. Roesch, F., Fajardo, A., Moratorio, G. & Vignuzzi, M. Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise. *Viruses* **11**, 640 (2019).
141. Benzarti, E. *et al.* New Insights into the Susceptibility of Immunocompetent Mice to Usutu Virus. *Viruses* **12**, (2020).
142. Benzarti, E. *et al.* Usutu virus infection of embryonated chicken eggs and a chicken embryo-derived primary cell line. *Viruses* **12**, 531 (2020).

143. Martin, M. F. *et al.* Usutu Virus escapes langerin-induced restriction to productively infect human Langerhans cells, unlike West Nile virus. *Emerg. Microbes Infect.* **11**, 761–774 (2022).
144. Taubenberger, J. K. & Kash, J. C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* **7**, 440–451 (2010).
145. Choi, Y. K. Emerging and re-emerging fatal viral diseases. *Exp. Mol. Med.* **53**, 711–712 (2021).
146. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020).
147. Ministry of Health. COVID-19 Weekly Epidemiological Update. *World Heal. Organ.* 1–33 (2022).
148. Weiss, S. R. Forty years with coronaviruses. *J. Exp. Med.* **217**, 2–5 (2020).
149. Singh, H., Dahiya, N., Yadav, M. & Sehrawat, N. Emergence of SARS-CoV-2 New Variants and Their Clinical Significance. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2022**, 1–8 (2022).
150. Kim, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* **181**, 914-921.e10 (2020).
151. Juckel, D., Dubuisson, J. & Belouzard, S. Les coronavirus, ennemis incertains. *Médecine/Sciences* **36**, 633–641 (2020).
152. Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273 (2020).
153. Shang, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, (2020).
154. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280.e8 (2020).
155. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H. & Thiel, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 155–170 (2021).
156. Ghosh, S. *et al.* β-Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. *Cell* **183**, 1520-1535.e14 (2020).
157. Mäkelä, M. J. *et al.* Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 539–542 (1998).
158. Lina, B. *et al.* Surveillance of community-acquired viral infections due to respiratory viruses in Rhone-Alpes (France) during winter 1994 to 1995. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 3007–3011 (1996).
159. Lu, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* **395**, 565–574 (2020).
160. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497–506 (2020).
161. Guo, H. *et al.* Identification of a novel lineage bat SARS-related coronaviruses that use bat ACE2 receptor. *Emerg. Microbes Infect.* **10**, 1507–1514 (2021).
162. Wang, C. C. *et al.* Airborne transmission of respiratory viruses. *Science (80-.).* **373**, (2021).
163. Khan, M. *et al.* Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell* **184**, 5932-5949.e15 (2021).
164. Ahn, J. H. *et al.* Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. *J. Clin. Invest.* **131**, (2021).
165. Yang, L. *et al.* A Human Pluripotent Stem Cell-based Platform to Study SARS-CoV-2 Tropism and Model Virus Infection in Human Cells and Organoids. *Cell Stem Cell* **27**, 125-136.e7 (2020).
166. Hou, Y. J. *et al.* SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell* **182**, 429-446.e14 (2020).
167. Lamers, M. M. & Haagmans, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 270–284 (2022).
168. Six, I. *et al.* The Endothelium and COVID-19: An Increasingly Clear Link Brief Title: Endotheliopathy in COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 6196 (2022).
169. Blanco-Melo, D. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-

19. *Cell* **181**, 1036-1045.e9 (2020).
170. Salinas, S. & Simonin, Y. Les atteintes neurologiques liées au SARS-CoV-2 et autres coronavirus humains. *médecine/sciences* **36**, 775–782 (2020).
171. Wan, D. *et al.* Neurological complications and infection mechanism of SARS-COV-2. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, (2021).
172. Noujaim, P.-J., Jolly, D., Coutureau, C. & Kanagaratnam, L. Fatigue and quality-of-life in the year following SARS-Cov2 infection. *BMC Infect. Dis.* **22**, 541 (2022).
173. Callaway, E. How months-long COVID infections could seed dangerous new variants. *Nature* **606**, 452–455 (2022).
174. Shapira, T. *et al.* A TMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic. *Nature* **605**, (2022).
175. Gruell, H. *et al.* Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2. *Immunity* **55**, 925–944 (2022).
176. Taylor, P. C. *et al.* Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 382–393 (2021).
177. Kuzmina, A. *et al.* SARS-CoV-2 spike variants exhibit differential infectivity and neutralization resistance to convalescent or post-vaccination sera. *Cell Host Microbe* **29**, 522-528.e2 (2021).
178. WHO. Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL / PQ evaluation process. *Who* **26**, 2020–2022 (2021).
179. Haydon, D. T., Cleaveland, S., Taylor, L. H. & Laurenson, M. K. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1468–1473 (2002).
180. Salvetti, A. & Baize, S. Zoonoses virales et émergence: La recherche ne fait que commencer. *Medecine/Sciences* **31**, 1055–1056 (2015).
181. Blancou, J. & Meslin, F. X. Brefs rappels sur l'histoire des zoonoses. *OIE Rev. Sci. Tech.* **12**, 15–22 (2000).
182. Kennedy, B. *et al.* App-based COVID-19 syndromic surveillance and prediction of hospital admissions in COVID Symptom Study Sweden. *Nat. Commun.* **13**, 1–12 (2022).
183. Sofonea, M. T. & Alizon, S. Anticipating COVID-19 intensive care unit capacity strain: A look back at epidemiological projections in France. *Anaesthesia, Crit. care pain Med.* **40**, 100943 (2021).
184. Tan, C. C. S. *et al.* Transmission of SARS-CoV-2 from humans to animals and potential host adaptation. *Nat. Commun.* **13**, 1–13 (2022).
185. Holmes, E. C. COVID-19—lessons for zoonotic disease. *Science (80-.).* **375**, 1114–1115 (2022).
186. Vilibic-Cavlek, T. *et al.* Emerging Trends in the Epidemiology of West Nile and Usutu Virus Infections in Southern Europe. *Front. Vet. Sci.* **6**, (2019).
187. Oude Munnink, B. B. *et al.* Genomic monitoring to understand the emergence and spread of Usutu virus in the Netherlands, 2016-2018. *Sci. Rep.* **10**, 2798 (2020).
188. Kilpatrick, A. M. *et al.* Predicting pathogen introduction: West nile virus spread to Galápagos. *Conserv. Biol.* **20**, 1224–1231 (2006).
189. Laperriere, V., Brugger, K. & Rubel, F. Simulation of the seasonal cycles of bird, equine and human West Nile virus cases. *Prev. Vet. Med.* **98**, 99–110 (2011).
190. Fritzell, C. *et al.* Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, 1–29 (2018).
191. Mackenzie, J. S. & Jeggo, M. The one health approach-why is it so important? *Trop. Med. Infect. Dis.* **4**, 5–8 (2019).
192. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* **357**, 1777–1789 (2001).
193. McFadden, M. J., Gokhale, N. S. & Horner, S. M. Protect this house: cytosolic sensing of viruses. *Curr. Opin. Virol.* **22**, 36–43 (2017).
194. Mnich, M. E., van Dalen, R. & van Sorge, N. M. C-Type Lectin Receptors in Host Defense Against Bacterial Pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 1–15 (2020).

195. Loo, Y. M. & Gale, M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* **34**, 680–692 (2011).
196. Kawai, T. & Akira, S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem.* **141**, 137–145 (2007).
197. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* **13**, 816–825 (2006).
198. Lu, C. *et al.* Recognition by RIG-I C-terminal Domain. *Structure* **18**, 1032–1043 (2010).
199. Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K. & Chen, Z. J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-κB and IRF3. *Cell* **122**, 669–682 (2005).
200. Belgnaoui, S. M., Paz, S. & Hiscott, J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 564–572 (2011).
201. Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* **7**, 131–137 (2006).
202. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **5**, 1–8 (2014).
203. Cassady, K. A. Human Cytomegalovirus TRS1 and IRS1 Gene Products Block the Double-Stranded-RNA-Activated Host Protein Shutoff Response Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* **79**, 8707–8715 (2005).
204. Leib, D. A. *et al.* Interferons Regulate the Phenotype of Wild-type and Mutant Herpes Simplex Viruses In Vivo. *J. Exp. Med.* **189**, 663–672 (1999).
205. Johnson, K. E. & Knipe, D. M. Herpes simplex virus-1 infection causes the secretion of a type I interferon-antagonizing protein and inhibits signaling at or before Jak-1 activation. *Virology* **396**, 21–29 (2010).
206. NAGANO, Y. & KOJIMA, Y. [Immunizing property of vaccinia virus inactivated by ultraviolets rays]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **148**, 1700–2 (1954).
207. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J. Interferon Res.* **7**, 429–438 (1987).
208. Chow, K. T. & Gale, M. SnapShot: Interferon Signaling. *Cell* **163**, 1808-1808.e1 (2015).
209. Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* **202**, 8–32 (2004).
210. Stark, G. R. & Darnell, J. E. The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity* **36**, 503–514 (2012).
211. Ivashkiv, L. B. & Donlin, L. T. Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 36–49 (2014).
212. Crosse, K. M., Monson, E. A., Beard, M. R. & Helbig, K. J. Interferon-Stimulated Genes as Enhancers of Antiviral Innate Immune Signaling. *J. Innate Immun.* **10**, 85–93 (2018).
213. Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. G. & Silverman, R. H. Identification of genes differentially regulated by interferon α, β, or γ using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15623–15628 (1998).
214. Schoggins, J. W. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 519–525 (2011).
215. Rebouillat, D. & Hovanessian, A. G. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J. Interferon Cytokine Res.* **19**, 295–308 (1999).
216. Samuel, C. E. Antiviral Actions of Interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 778–809 (2001).
217. Deo, S. *et al.* Activation of 2' 5'-oligoadenylate synthetase by stem loops at the 5'-end of the west nile virus genome. *PLoS One* **9**, 1–11 (2014).
218. Meurs, E. *et al.* Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62**, 379–390 (1990).
219. Ank, N., West, H. & Paludan, S. R. IFN-λ: Novel antiviral cytokines. *J. Interf. Cytokine Res.* **26**, 373–379 (2006).

220. Taylor, S. S., Haste, N. M. & Ghosh, G. PKR and eIF2α: Integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* **122**, 823–825 (2005).
221. TROTTA, P. P. Cytokines: An Overview. *Am. J. Reprod. Immunol.* **25**, 137–141 (1991).
222. Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *J. Cult. Herit.* **1**, 121–127 (2000).
223. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β. *Mol. Cell* **10**, 417–426 (2002).
224. Kanneganti, T.-D. D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 688–698 (2010).
225. Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**, 509–513 (2009).
226. Kerur, N. *et al.* IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Cell Host Microbe* **9**, 363–375 (2011).
227. Walsh, J. G., Muruve, D. A. & Power, C. Inflammasomes in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 84–97 (2014).
228. Miao, E. A., Rajan, J. V. & Aderem, A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* **243**, 206–214 (2011).
229. Collin, M. & Bigley, V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* **154**, 3–20 (2018).
230. Jakubzick, C. V., Randolph, G. J. & Henson, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 349–362 (2017).
231. Daffis, S., Suthar, M. S., Szretter, K. J., Gale, M. & Diamond, M. S. Induction of IFN-β and the Innate Antiviral Response in Myeloid Cells Occurs through an IPS-1-Dependent Signal That Does Not Require IRF-3 and IRF-7. *PLoS Pathog.* **5**, e1000607 (2009).
232. Aarreberg, L. D. *et al.* Interleukin-1β Signaling in Dendritic Cells Induces Antiviral Interferon Responses. *MBio* **9**, 1659–1677 (2018).
233. Fang, H. *et al.* γδ T cells promote the maturation of dendritic cells during West Nile virus infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 71–80 (2010).
234. Fredericksen, B. L., Keller, B. C., Fornek, J., Katze, M. G. & Gale, M. Establishment and Maintenance of the Innate Antiviral Response to West Nile Virus Involves both RIG-I and MDA5 Signaling through IPS-1. *J. Virol.* **82**, 609–616 (2008).
235. Fredericksen, B. L. & Gale, M. West Nile Virus Evades Activation of Interferon Regulatory Factor 3 through RIG-I-Dependent and -Independent Pathways without Antagonizing Host Defense Signaling. *J. Virol.* **80**, 2913–2923 (2006).
236. Brien, J. D. *et al.* Interferon regulatory factor-1 (irf-1) shapes both innate and cd8 + t cell immune responses against west nile virus infection. *PLoS Pathog.* **7**, (2011).
237. Garcia, M. *et al.* Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 387 (2018).
238. Cacciotti, G. *et al.* Variation in interferon sensitivity and induction between Usutu and West Nile (lineages 1 and 2) viruses. *Virology* **485**, 189–198 (2015).
239. Rawle, D. J., Setoh, Y. X., Edmonds, J. H. & Khromykh, A. A. Comparison of attenuated and virulent West Nile virus strains in human monocyte-derived dendritic cells as a model of initial human infection. *Virol. J.* **12**, 4–8 (2015).
240. Kovats, S. *et al.* West Nile virus-infected human dendritic cells fail to fully activate invariant natural killer T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **186**, 214–226 (2016).
241. Wald, M. E. *et al.* The Interferon Response Dampens the Usutu Virus Infection-Associated Increase in Glycolysis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 1–12 (2022).
242. Clé, M. *et al.* Study of Usutu virus neuropathogenicity in mice and human cellular models. *PLoS*

Negl. Trop. Dis. **14**, e0008223 (2020).

243. Décembre, E. *et al.* Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog.* **10**, e1004434 (2014).
244. Briant, L., Desprès, P., Choumet, V. & Missé, D. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology* **464**–**465**, 26–32 (2014).
245. Ren, Y. *et al.* The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 881–883 (2020).
246. Li, S. *et al.* SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 235 (2020).
247. Venet, M. *et al.* Severe COVID-19 patients have impaired plasmacytoid dendritic cell-mediated control of SARS-CoV-2-infected cells. *medRxiv* **1**, 1–13 (2021).
248. Coperchini, F., Chiovato, L., Croce, L., Magri, F. & Rotondi, M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **53**, 25–32 (2020).
249. Zhang, J. *et al.* Pyroptotic macrophages stimulate the SARS-CoV-2-associated cytokine storm. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 1305–1307 (2021).
250. Fajgenbaum, D. C. & June, C. H. Cytokine Storm. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2255–2273 (2020).
251. Mangalmurti, N. & Hunter, C. A. Cytokine Storms: Understanding COVID-19. *Immunity* **53**, 19–25 (2020).
252. Thepmankorn, P. *et al.* Cytokine storm induced by SARS-CoV-2 infection: The spectrum of its neurological manifestations. *Cytokine* **138**, 155404 (2021).
253. Vora, S. M., Lieberman, J. & Wu, H. Inflammasome activation at the crux of severe COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 694–703 (2021).
254. Xu, J. *et al.* Soluble PD-L1 improved direct ARDS by reducing monocyte-derived macrophages. *Cell Death Dis.* **11**, 934 (2020).
255. Slon Campos, J. L., Mongkolsapaya, J. & Screaton, G. R. The immune response against flaviviruses. *Nat. Immunol.* **19**, 1189–1198 (2018).
256. Wessel, A. W. *et al.* Human Monoclonal Antibodies against NS1 Protein Protect against Lethal West Nile Virus Infection. *MBio* **12**, 1–17 (2021).
257. Maucourant, C. *et al.* Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci. Immunol.* **5**, 1–14 (2020).
258. Reusch, N. *et al.* Neutrophils in COVID-19. *Front. Immunol.* **12**, 1–9 (2021).
259. Schultze, J. L. & Aschenbrenner, A. C. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell* **184**, 1671–1692 (2021).
260. Ye, J., Zhu, B., Fu, Z. F., Chen, H. & Cao, S. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine* **31**, 461–471 (2013).
261. Gack, M. U. *et al.* Influenza A Virus NS1 Targets the Ubiquitin Ligase TRIM25 to Evade Recognition by the Host Viral RNA Sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* **5**, 439–449 (2009).
262. Wang, B. *et al.* Enterovirus 71 Protease 2Apro Targets MAVS to Inhibit Anti-Viral Type I Interferon Responses. *PLoS Pathog.* **9**, e1003231 (2013).
263. Keller, B. C. *et al.* Resistance to Alpha/Beta Interferon Is a Determinant of West Nile Virus Replication Fitness and Virulence. *J. Virol.* **80**, 9424–9434 (2006).
264. Kong, K.-F. *et al.* Dysregulation of TLR3 Impairs the Innate Immune Response to West Nile Virus in the Elderly. *J. Virol.* **82**, 7613–7623 (2008).
265. Suthar, M. S., Diamond, M. S. & Gale, M. West Nile virus infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 115–128 (2013).
266. Rios, J. J. *et al.* OAS1 polymorphisms are associated with susceptibility to West Nile encephalitis

in horses. *PLoS One* **5**, 1–9 (2010).

267. Miorin, L., Maestre, A. M., Fernandez-Sesma, A. & Garcia-Sastre, A. ANTAGONISM OF TYPE I INTERFERON BY FLAVIVIRUSES. *Biochem Biophys Res Commun.* **176**, 139–148 (2017).
268. Daffis, S. *et al.* 2′-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature* **468**, 452–456 (2010).
269. Michaela U Gack and Michael S Diamond. Innate immune escape by Dengue and West Nile viruses. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
270. Uchida, L. *et al.* The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. *Sci. Rep.* **4**, 7395 (2015).
271. Saito, A. *et al.* How do flaviviruses hijack host cell functions by phase separation? *Viruses* **13**, (2021).
272. Cai, W. *et al.* Regulatory Role of Host MicroRNAs in Flaviviruses Infection. *Front. Microbiol.* **13**, 1–13 (2022).
273. Jouvenet, N., Goujon, C. & Banerjee, A. Clash of the titans: interferons and SARS-CoV-2. *Trends Immunol.* **42**, 1069–1072 (2021).
274. Bouayad, A. Innate immune evasion by SARS-CoV-2: Comparison with SARS-CoV. *Rev. Med. Virol.* **30**, 1–9 (2020).
275. Thorne, L. G. *et al.* Evolution of enhanced innate immune evasion by SARS-CoV-2. *Nature* **602**, 487–495 (2022).
276. Wang, R., Chen, J. & Wei, G. W. Mechanisms of SARS-CoV-2 Evolution Revealing Vaccine-Resistant Mutations in Europe and America. *J. Phys. Chem. Lett.* **12**, 11850–11857 (2021).
277. Miller, A. D. & Zachary, J. F. Nervous System. in *Pathologic Basis of Veterinary Disease* 805-907.e1 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-323-35775-3.00014-X
278. Brodal, P. Structure of the Neuron and Organization of Nervous Tissue. in *The Central Nervous System* 3–19 (Oxford University Press, 2016). doi:10.1093/med/9780190228958.003.0001
279. Kwon, D. Guardians of the brain: how a special immune system protects our grey matter. *Nature* **606**, 22–24 (2022).
280. Marques, F. *et al.* The choroid plexus in health and in disease: dialogues into and out of the brain. *Neurobiol. Dis.* **107**, 32–40 (2017).
281. Ehrlich, P. Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie. *Hirschwald, Berlin* 167 (1885).
282. Goldmann, E. Vitalfärbungen am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus Chorioideus und der Hirnhäute. *Abh. Preuss. Akad. Wiss. Phys. -Math.* **1**, 1–60 (1913).
283. Lewandowsky, M. Zur lehre der cerebrospinalflussigkeit. *Z. klin. Med.* **40**, 480–494 (1909).
284. Reese, T. S. & Karnovsky, M. J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* **34**, 207–217 (1967).
285. McConnell, H. L., Kersch, C. N., Woltjer, R. L. & Neuwelt, E. A. The translational significance of the neurovascular unit. *J. Biol. Chem.* **292**, 762–770 (2017).
286. Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25 (2010).
287. Obermeier, B., Daneman, R. & Ransohoff, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine* **19**, 1584–1596 (2013).
288. Mazzetti, S., Frigerio, S., Gelati, M., Salmaggi, A. & Vitellaro-Zuccarello, L. Lycopersicon esculentum lectin: an effective and versatile endothelial marker of normal and tumoral blood vessels in the central nervous system. *Eur. J. Histochem.* **48**, 423–428 (2004).
289. Ruggeri, Z. M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1335–1342 (2003).
290. Seulberger, H., Unger, C. M. & Risau, W. HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47 - many

names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons. *Neurosci. Lett.* **140**, 93–97 (1992).

291. Candela, P. *et al.* In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res.* **1594**, 15–26 (2015).
292. Oldendorf, W. H., Cornford, M. E. & Brown, W. J. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.* **1**, 409–417 (1977).
293. Abbott, N. J., Rönnbäck, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41–53 (2006).
294. Ueno, M. Molecular Anatomy of the Brain Endothelial Barrier: An Overview of the Distributional Features. *Curr. Med. Chem.* **14**, 1199–1206 (2007).
295. Engelhardt, B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J. Neural Transm.* **113**, 477–485 (2006).
296. Henninger, D. D. *et al.* Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J. Immunol.* **158**, 1825–32 (1997).
297. Cardoso, F. L., Brites, D. & Brito, M. A. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res. Rev.* **64**, 328–363 (2010).
298. Tsukita, S. & Furuse, M. Overcoming barriers in the study of tight junction functions: From occludin to claudin. *Genes to Cells* **3**, 569–573 (1998).
299. Lippoldt, A. *et al.* Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Neuroreport* **11**, 1427–1431 (2000).
300. Wolburg, H. & Lippoldt, A. Tight junctions of the blood–brain barrier. *Vascul. Pharmacol.* **38**, 323–337 (2002).
301. Furuse, M. *et al.* Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.* **127**, 1617–1626 (1994).
302. Bazzoni, G. & Dejana, E. Endothelial cell-to-cell junctions: Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* **84**, 869–901 (2004).
303. Matter, K. & Balda, M. S. Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 225–237 (2003).
304. Butt, A. M., Jones, H. C. & Abbott, N. J. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J. Physiol.* **429**, 47–62 (1990).
305. Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J. & Kanmogne, G. D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* **1**, 223–236 (2006).
306. Huber, J. D. *et al.* Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H1241-8 (2001).
307. Förster, C. *et al.* Differential effects of hydrocortisone and TNFα on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J. Physiol.* **586**, 1937–1949 (2008).
308. Rochfort, K. D. & Cummins, P. M. Cytokine-mediated dysregulation of zonula occludens-1 properties in human brain microvascular endothelium. *Microvasc. Res.* **100**, 48–53 (2015).
309. Keaney, J. & Campbell, M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* **282**, 4067–4079 (2015).
310. Alvarez, J. I. *et al.* Focal disturbances in the blood–brain barrier are associated with formation of neuroinflammatory lesions. *Neurobiol. Dis.* **74**, 14–24 (2015).
311. Zhong, Z. *et al.* ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat. Neurosci.* **11**, 420–422 (2008).
312. Miyazaki, K. *et al.* Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in

amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Res.* **89**, 718–728 (2011).

313. Hartz, A. M. S. *et al.* Amyloid-β Contributes to Blood–Brain Barrier Leakage in Transgenic Human Amyloid Precursor Protein Mice and in Humans With Cerebral Amyloid Angiopathy. *Stroke* **43**, 514–523 (2012).
314. Knowland, D. *et al.* Stepwise Recruitment of Transcellular and Paracellular Pathways Underlies Blood-Brain Barrier Breakdown in Stroke. *Neuron* **82**, 603–617 (2014).
315. Nag, S., Venugopalan, R. & Stewart, D. J. Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol.* **114**, 459–469 (2007).
316. Hashimoto, Y. *et al.* Recurrent de novo mutations in CLDN5 induce an anion-selective blood–brain barrier and alternating hemiplegia. *Brain* (2022). doi:10.1093/brain/awac215
317. Hall, C. N. *et al.* Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508**, 55–60 (2014).
318. Zheng, Z., Chopp, M. & Chen, J. Multifaceted roles of pericytes in central nervous system homeostasis and disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **40**, 1381–1401 (2020).
319. Majesky, M. W. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1248–1258 (2007).
320. Armulik, A., Mäe, M. & Betsholtz, C. Pericytes and the blood-brain barrier: Recent advances and implications for the delivery of CNS therapy. *Ther. Deliv.* **2**, 419–422 (2011).
321. Sims, D. E. The pericyte—A review. *Tissue Cell* **18**, 153–174 (1986).
322. Rucker, H. K., Wynder, H. J. & Thomas, W. E. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res. Bull.* **51**, 363–369 (2000).
323. Shepro, D. & Morel, N. M. L. Pericyte physiology. *FASEB J.* **7**, 1031–1038 (1993).
324. Allt, G. & Lawrenson, J. G. Pericytes: Cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**, 1–11 (2001).
325. Gerhardt, H. & Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **314**, 15–23 (2003).
326. Cai, C. *et al.* Stimulation-induced increases in cerebral blood flow and local capillary vasoconstriction depend on conducted vascular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E5796–E5804 (2018).
327. Mishra, A. *et al.* Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat. Neurosci.* **19**, 1619–1627 (2016).
328. Ribatti, D., Nico, B. & Crivellato, E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 261–268 (2011).
329. Armulik, A. *et al.* Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* **468**, 557–561 (2010).
330. He, F. & Sun, Y. E. Glial cells more than support cells? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 661–665 (2007).
331. Volterra, A. & Meldolesi, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: The revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 626–640 (2005).
332. Chen, Y. & Swanson, R. A. Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 137–149 (2003).
333. Karve, I. P., Taylor, J. M. & Crack, P. J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 692–702 (2016).
334. Noell, S. *et al.* Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet. *Eur. J. Neurosci.* **33**, 2179–2186 (2011).
335. Nag, S. Morphology and Properties of Astrocytes. in *Methods in Molecular Biology* **686**, 69–100 (2011).
336. Hamby, M. E. & Sofroniew, M. V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders.

Neurotherapeutics **7**, 494–506 (2010).

337. Kimelberg, H. K. Functions of mature mammalian astrocytes: A current view. *Neuroscientist* **16**, 79–106 (2010).
338. Parpura, V., Grubišic, V. & Verkhratsky, A. Ca2+ sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813**, 984–991 (2011).
339. Kang, J., Jiang, L., Goldman, S. A. & Nedergaard, M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* **1**, 683–692 (1998).
340. Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S. A. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* **26**, 523–530 (2003).
341. Maragakis, N. J. & Rothstein, J. D. Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2**, 679–689 (2006).
342. Attwell, D. *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**, 232–243 (2010).
343. Gordon, G. R. J., Howarth, C. & Macvicar, B. A. Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Exp. Physiol.* **96**, 393–399 (2011).
344. Theis, M. & Giaume, C. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain Res.* **1487**, 88–98 (2012).
345. Alvarez, J. I., Katayama, T. & Prat, A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* **61**, 1939–1958 (2013).
346. Wong, A. D. *et al.* The blood-brain barrier: An engineering perspective. *Front. Neuroeng.* **6**, 1–22 (2013).
347. Wosik, K. *et al.* Angiotensin II controls occludin function and is required for blood-brain barrier maintenance: Relevance to multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **27**, 9032–9042 (2007).
348. Ma, Q. *et al.* Blood-brain barrier-associated pericytes internalize and clear aggregated amyloid-β42 by LRP1-dependent apolipoprotein E isoform-specific mechanism. *Mol. Neurodegener.* **13**, 57 (2018).
349. Schlageter, K. E., Molnar, P., Lapin, G. D. & Groothuis, D. R. Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: Microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvasc. Res.* **58**, 312–328 (1999).
350. Scremin, O. U., Rovere, A. A., Raynald, A. C. & Giardini, A. Cholinergic control of blood flow in the cerebral cortex of the rat. *Stroke* **4**, 233–239 (1973).
351. Biswas, S., Cottarelli, A. & Agalliu, D. Neuronal and glial regulation of CNS angiogenesis and barriergenesis. *Dev.* **147**, 1–13 (2020).
352. Klein, R. S. *et al.* Neuroinflammation During RNA Viral Infections. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 73–95 (2019).
353. Kalia, M., Khasa, R., Sharma, M., Nain, M. & Vrati, S. Japanese Encephalitis Virus Infects Neuronal Cells through a Clathrin-Independent Endocytic Mechanism. *J. Virol.* **87**, 148–162 (2013).
354. Kabba, J. A. *et al.* Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell. Mol. Neurobiol.* **38**, 53–71 (2018).
355. Ginhoux, F. & Prinz, M. Origin of microglia: Current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1–16 (2015).
356. Jurga, A. M., Paleczna, M. & Kuter, K. Z. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 1–18 (2020).
357. Bennett, M. L. *et al.* New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1738–E1746 (2016).
358. McFadden, G., Mohamed, M. R., Rahman, M. M. & Bartee, E. Cytokine determinants of viral tropism. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 645–655 (2009).
359. Tavčar, P. *et al.* Neurotropic Viruses, Astrocytes, and COVID-19. *Front. Cell. Neurosci.* **15**, 1–14

(2021).

360. Koyuncu, O. O., Hogue, I. B. & Enquist, L. W. Virus Infections in the Nervous System. *Cell Host Microbe* **13**, 379–393 (2013).
361. Scheld, M. W., Whitley, R. J. & Marra, C. M. *Infections of the central nervous system*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2014).
362. Bowers, K. M. & Mudrakola, V. V. Neuroinfections: Presentation, Diagnosis, and Treatment of Meningitis and Encephalitis. *EMJ Neurol.* 93–102 (2020). doi:10.33590/emjneurol/20-00063
363. Croteau, D. Neuroinfectious diseases. in *Best Practices in Neurological Care* 126–143 (Future Medicine Ltd, 2014). doi:10.2217/ebo.13.278
364. Gao, B. & Zee, C. S. Neuroinfection & neuroimmunology: New opportunities, new challenges. *Radiol. Infect. Dis.* **3**, 51–53 (2016).
365. Clé, M. *et al.* Neurocognitive impacts of arbovirus infections. *J. Neuroinflammation* **17**, 1–14 (2020).
366. Garcia, M. N. *et al.* Evaluation of prolonged fatigue post-west nile virus infection and association of fatigue with elevated antiviral and proinflammatory cytokines. *Viral Immunol.* **27**, 327–333 (2014).
367. Tran, V. T., Porcher, R., Pane, I. & Ravaud, P. Course of post COVID-19 disease symptoms over time in the ComPaRe long COVID prospective e-cohort. *Nat. Commun.* **13**, 2–7 (2022).
368. De Chiara, G. *et al.* Recurrent herpes simplex virus-1 infection induces hallmarks of neurodegeneration and cognitive deficits in mice. *PLoS Pathog.* **15**, 1–30 (2019).
369. Vanheusden, M. *et al.* Cytomegalovirus infection exacerbates autoimmune mediated neuroinflammation. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
370. Bjornevik, K. *et al.* Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science (80-.).* **375**, 296–301 (2022).
371. Salinas, S., Schiavo, G. & Kremer, E. J. A hitchhiker's guide to the nervous system: The complex journey of viruses and toxins. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 645–655 (2010).
372. Neal, J. W. Flaviviruses are neurotropic, but how do they invade the CNS? *Journal of Infection* **69**, 203–215 (2014).
373. Kristensson, K. Microbes' roadmap to neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 345–357 (2011).
374. Riel, D. Van, Verdijk, R. & Kuiken, T. The olfactory nerve: A shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J. Pathol.* **235**, 277–287 (2015).
375. Samuel, M. A., Wang, H., Siddharthan, V., Morrey, J. D. & Diamond, M. S. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17140–17145 (2007).
376. Monath, T. P., Cropp, C. B. & Harrison, A. K. Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab. Invest.* **48**, 399 (1983).
377. Meinhardt, J. *et al.* Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat. Neurosci.* **24**, 168–175 (2021).
378. Lamers, S. L. *et al.* The meningeal lymphatic system: a route for HIV brain migration? *J. Neurovirol.* **22**, 275–281 (2016).
379. Kim, J. *et al.* Zika virus infects pericytes in the choroid plexus and enters the central nervous system through the blood-cerebrospinal fluid barrier. *PLOS Pathog.* **16**, e1008204 (2020).
380. Couderc, T. *et al.* A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathog.* **4**, e29 (2008).
381. Chanthick, C., Suttitheptumrong, A., Rawarak, N. & Pattanakitsakul, S. N. Transcytosis involvement in transport system and endothelial permeability of vascular leakage during dengue virus infection. *Viruses* **10**, (2018).
382. Mustafá, Y. M., Meuren, L. M., Coelho, S. V. A. & De Arruda, L. B. Pathways exploited by

flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. *Front. Microbiol.* **10**, 525 (2019).

383. Afonso, P. V. *et al.* Alteration of Blood–Brain Barrier Integrity by Retroviral Infection. *PLoS Pathog.* **4**, e1000205 (2008).
384. Curis, C. *et al.* Human T-Lymphotropic Virus Type 1-Induced Overexpression of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) Facilitates Trafficking of Infected Lymphocytes through the Blood-Brain Barrier. *J. Virol.* **90**, 7303–7312 (2016).
385. Liu, Y., Tang, X. P., McArthur, J. C., Scott, J. & Gartner, S. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gp160 sequences from a patient with HIV dementia: evidence for monocyte trafficking into brain. *J. Neurovirol.* **6 Suppl 1**, S70-81 (2000).
386. Miller, F., Afonso, P. V., Gessain, A. & Ceccaldi, P. E. Blood-brain barrier and retroviral infections. *Virulence* **3**, 222–229 (2012).
387. Dittmar, S. *et al.* Measles Virus-Induced Block of Transendothelial Migration of T Lymphocytes and Infection-Mediated Virus Spread across Endothelial Cell Barriers. *J. Virol.* **82**, 11273–11282 (2008).
388. Young, V. A. & Rall, G. F. Making It to the Synapse: Measles Virus Spread in and Among Neurons. in *Measles* **330**, 3–30 (Springer Berlin Heidelberg, 2009).
389. Ayala-Nunez, N. V. *et al.* Zika virus enhances monocyte adhesion and transmigration favoring viral dissemination to neural cells. *Nat. Commun.* **10**, 4430 (2019).
390. Clé, M. *et al.* Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier. *MBio* **11**, (2020).
391. Cusi, M. G. *et al.* Toscana virus infects dendritic and endothelial cells opening the way for the central nervous system. *J. Neurovirol.* **22**, 307–315 (2016).
392. Tiong, V., Shu, M. H., Wong, W. F., Abubakar, S. & Chang, L. Y. Nipah virus infection of immature dendritic cells increases its transendothelial migration across human brain microvascular endothelial cells. *Front. Microbiol.* **9**, 1–12 (2018).
393. Sorokin, L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 712–723 (2010).
394. Chen, Z. & Li, G. Immune response and blood–brain barrier dysfunction during viral neuroinvasion. *Innate Immun.* **27**, 109–117 (2021).
395. Alfonso-Loeches, S., Ureña-Peralta, J., Morillo-Bargues, M. J., Gómez-Pinedo, U. & Guerri, C. Ethanol-induced TLR4/NLRP3 neuroinflammatory response in microglial cells promotes leukocyte infiltration across the BBB. *Neurochem. Res.* **41**, 193–209 (2016).
396. Tohidpour, A. *et al.* Neuroinflammation and infection: Molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 276 (2017).
397. Werner, C. & Engelhard, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br. J. Anaesth.* **99**, 4–9 (2007).
398. Thurgur, H. & Pinteaux, E. Microglia in the Neurovascular Unit: Blood–Brain Barrier–microglia Interactions After Central Nervous System Disorders. *Neuroscience* **405**, 55–67 (2019).
399. Rustenhoven, J. *et al.* TGF-beta1 regulates human brain pericyte inflammatory processes involved in neurovasculature function. *J. Neuroinflammation* **13**, 1–15 (2016).
400. Laredo, F., Plebanski, J. & Tedeschi, A. Pericytes: Problems and Promises for CNS Repair. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 1–15 (2019).
401. D'Agostino, P. M., Gottfried-Blackmore, A., Anandasabapathy, N. & Bulloch, K. Brain dendritic cells: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **124**, 599–614 (2012).
402. Jin, Q. *et al.* Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associated with enhanced alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke. *Brain. Behav. Immun.* **40**, 131–142 (2014).
403. Ransohoff, R. M. A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. *Nat. Neurosci.* **19**, 987–

991 (2016).

404. McKimmie, C. S. & Graham, G. J. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 1006–1011 (2010).
405. Vesce, S., Rossi, D., Brambilla, L. & Volterra, A. Glutamate Release from Astrocytes in Physiological Conditions and in Neurodegenerative Disorders Characterized by Neuroinflammation. *Int. Rev. Neurobiol.* **82**, 57–71 (2007).
406. Rossi, D. & Volterra, A. Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res. Bull.* **80**, 224–232 (2009).
407. Soung, A. & Klein, R. S. Viral Encephalitis and Neurologic Diseases: Focus on Astrocytes. *Trends Mol. Med.* **24**, 950–962 (2018).
408. Morganti-Kossmann, M. C., Kossmann, T. & Wahl, S. M. Cytokines and neuropathology. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 286–291 (1992).
409. De Vries, H. E. *et al.* The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J. Neuroimmunol.* **64**, 37–43 (1996).
410. Miner, J. J. *et al.* The TAM receptor Mertk protects against neuroinvasive viral infection by maintaining blood-brain barrier integrity. *Nat. Med.* **21**, 1464–1472 (2015).
411. Bergers, G. & Song, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro. Oncol.* **7**, 452–464 (2005).
412. Özen, I. *et al.* Brain pericytes acquire a microglial phenotype after stroke. *Acta Neuropathol.* **128**, 381–396 (2014).
413. Yamamoto, S. *et al.* A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. *Sci. Rep.* **7**, 1–16 (2017).
414. Medina-Flores, F., Hurtado-Alvarado, G., Deli, M. A. & Gómez-González, B. The Active Role of Pericytes During Neuroinflammation in the Adult Brain. *Cell. Mol. Neurobiol.* (2022). doi:10.1007/s10571-022-01208-5
415. Rustenhoven, J., Jansson, D., Smyth, L. C. & Dragunow, M. Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 291–304 (2017).
416. Persidsky, Y. *et al.* Dysfunction of brain pericytes in chronic neuroinflammation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 794–807 (2015).
417. Voirin, A., Perek, N. & Roche, F. Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF-α) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells in vitro BBB model. *Brain Res.* **1730**, 146647 (2020).
418. Liu, T. H., Liang, L. C., Wang, C. C., Liu, H. C. & Chen, W. J. The blood-brain barrier in the cerebrum is the initial site for the Japanese encephalitis virus entering the central nervous system. *J. Neurovirol.* **14**, 514–521 (2008).
419. Chen, C.-J. *et al.* Infection of Pericytes In Vitro by Japanese Encephalitis Virus Disrupts the Integrity of the Endothelial Barrier. *J. Virol.* **88**, 1150–1161 (2014).
420. Ransohoff, R. M. & Takeshita, Y. Inflammatory cell trafficking across the blood–brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol. Rev.* **248**, 228–239 (2012).
421. Chang, C.-Y. Y. J. Y. C.-J. *et al.* Interplay of inflammatory gene expression in pericytes following Japanese encephalitis virus infection. *Brain. Behav. Immun.* **66**, 230–243 (2017).
422. Bhowmick, S. *et al.* Induction of IP-10 (CXCL10) in astrocytes following Japanese encephalitis. *Neurosci. Lett.* **414**, 45–50 (2007).
423. Gnanadurai, C. W. & Fu, Z. F. CXCL10 and blood-brain barrier modulation in rabies virus infection. *Oncotarget* **7**, 10694–10695 (2016).
424. Wang, S. *et al.* Pericytes Regulate Vascular Basement Membrane Remodeling and Govern Neutrophil Extravasation during Inflammation. *PLoS One* **7**, e45499 (2012).
425. Proebstl, D. *et al.* Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of

venular walls in vivo. *J. Exp. Med.* **209**, 1219–1234 (2012).

426. Ludlow, M. *et al.* Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol.* **131**, 159–184 (2016).
427. Constant, O. *et al.* Role of Dendritic Cells in Viral Brain Infections. *Front. Immunol.* **13**, 1–15 (2022).
428. Rhodes, J. W. *et al.* Human anogenital monocyte-derived dendritic cells and langerin+cDC2 are major HIV target cells. *Nat. Commun.* **12**, 2147 (2021).
429. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
430. Nasr, N. *et al.* Inhibition of Two Temporal Phases of HIV-1 Transfer from Primary Langerhans Cells to T Cells: The Role of Langerin. *J. Immunol.* **193**, 2554–2564 (2014).
431. Bertram, K. M. *et al.* Identification of HIV transmitting CD11c+ human epidermal dendritic cells. *Nat. Commun.* **10**, 2759 (2019).
432. Pollara, G. *et al.* Dendritic cells in viral pathogenesis: Protective or defective? *Int. J. Exp. Pathol.* **86**, 187–204 (2005).
433. Sprecher, E. & Becker, Y. Langerhans cell density and activity in mouse skin and lymph nodes affect herpes simplex type 1 (HSV-1) pathogenicity. *Arch. Virol.* **107**, 191–205 (1989).
434. Soto, J. A. *et al.* The Role of Dendritic Cells During Infections Caused by Highly Prevalent Viruses. *Front. Immunol.* **11**, 1–22 (2020).
435. Lenza, M. P., Atxabal, U., Oyenarte, I., Jiménez-Barbero, J. & Ereño-Orbea, J. Current Status on Therapeutic Molecules Targeting Siglec Receptors. *Cells* **9**, 1–19 (2020).
436. Carbaugh, D. L. & Lazear, H. M. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. *J. Virol.* **94**, (2020).
437. Colton, C. A. Immune heterogeneity in neuroinflammation: Dendritic cells in the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 145–162 (2013).
438. Sagar, D. *et al.* Mechanisms of Dendritic Cell Trafficking Across the Blood–brain Barrier. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **7**, 74–94 (2012).
439. De Laere, M., Berneman, Z. N. & Cools, N. To the brain and back: Migratory paths of dendritic cells in multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **77**, 178–192 (2018).
440. Marchetti, L. & Engelhardt, B. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation. *Vasc. Biol.* **2**, H1–H18 (2020).
441. Sagar, D. *et al.* Dendritic cell CNS recruitment correlates with disease severity in EAE via CCL2 chemotaxis at the blood–brain barrier through paracellular transmigration and ERK activation. *J. Neuroinflammation* **9**, 747 (2012).
442. Jain, P., Coisne, C., Enzmann, G., Rottapel, R. & Engelhardt, B. α 4 β 1 Integrin Mediates the Recruitment of Immature Dendritic Cells across the Blood-Brain Barrier during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **184**, 7196–7206 (2010).
443. Zozulya, A. L. *et al.* Dendritic Cell Transmigration through Brain Microvessel Endothelium Is Regulated by MIP-1α Chemokine and Matrix Metalloproteinases. *J. Immunol.* **178**, 520–529 (2007).
444. Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 363–374 (2020).
445. Silvin, A. *et al.* Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell* **182**, 1401-1418.e18 (2020).
446. Ou, R. *et al.* Regulation of Immune Response and Inflammatory Reactions against Viral Infection by VCAM-1. *J. Virol.* **82**, 2952–2965 (2008).
447. Basu, A., Krady, J. K. & Levison, S. W. Interleukin-1: A master regulator of neuroinflammation. *J. Neurosci. Res.* **78**, 151–156 (2004).

448. Wuest, T. R. & Carr, D. J. J. Dysregulation of CXCR3 Signaling due to CXCL10 Deficiency Impairs the Antiviral Response to Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J. Immunol.* **181**, 7985–7993 (2008).
449. Kim, J. H. *et al.* Ablation of CD11c hi dendritic cells exacerbates Japanese encephalitis by regulating blood-brain barrier permeability and altering tight junction/adhesion molecules. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **48**, 22–32 (2016).
450. Schönrich, G. & Raftery, M. J. Dendritic cells as Achilles' heel and Trojan horse during varicella zoster virus infection. *Front. Microbiol.* **6**, 1–6 (2015).
451. 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. *Nat. Microbiol.* **2**, 1462–1470 (2017).
452. FALANGOLA, M. F., HANLY, A., GALVAO-CASTRO, B. & PETITO, C. K. HIV Infection of Human Choroid Plexus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**, 497–503 (1995).
453. Petito, C. K. *et al.* HIV infection of choroid plexus in AIDS and asymptomatic HIV-infected patients suggests that the choroid plexus may be a reservoir of productive infection. *J. Neurovirol.* **5**, 670–677 (1999).
454. McMahon, E. J., Bailey, S. L., Castenada, C. V., Waldner, H. & Miller, S. D. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat. Med.* **11**, 335–339 (2005).
455. Münz, C. Dendritic cells during Epstein Barr virus infection. *Front. Microbiol.* **5**, 1–5 (2014).
456. Veroni, C. & Aloisi, F. The CD8 T Cell-Epstein-Barr Virus-B Cell Trialogue: A Central Issue in Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Front. Immunol.* **12**, 1–26 (2021).
457. Clarkson, B. D. *et al.* Innate-Adaptive Crosstalk: How Dendritic Cells Shape Immune Responses in the CNS. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* **946**, 309–333 (2012).
458. Murcko, R., Marchi, N., Bailey, D. & Janigro, D. Diagnostic biomarker kinetics: how brain-derived biomarkers distribute through the human body, and how this affects their diagnostic significance: the case of S100B. *Fluids Barriers CNS* **19**, 1–20 (2022).
459. Lima, W. G., Barra, A., Brito, J. C. M. & Nizer, W. S. C. D -Dimer serum levels as a biomarker associated for the lethality in patients with coronavirus disease 2019: A meta-analysis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **31**, 335–338 (2020).
460. Kanberg, N. *et al.* Neurochemical signs of astrocytic and neuronal injury in acute COVID-19 normalizes during long-term follow-up. *EBioMedicine* **70**, 103512 (2021).
461. Falconi-Agapito, F. *et al.* Peptide Biomarkers for the Diagnosis of Dengue Infection. *Front. Immunol.* **13**, 1–14 (2022).
462. Liu, Y. E. *et al.* An 8-gene machine learning model improves clinical prediction of severe dengue progression. *Genome Med.* **14**, 1–15 (2022).
463. Fares-Gusmao, R. *et al.* Differential Pattern of Soluble Immune Markers in Asymptomatic Dengue, West Nile and Zika Virus Infections. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).
464. Janigro, D. *et al.* Peripheral Blood and Salivary Biomarkers of Blood–Brain Barrier Permeability and Neuronal Damage: Clinical and Applied Concepts. *Front. Neurol.* **11**, (2021).
465. Le, N. D. *et al.* Evaluation of neurofilament light chain in the cerebrospinal fluid and blood as a biomarker for neuronal damage in experimental pneumococcal meningitis. *J. Neuroinflammation* **17**, 1–9 (2020).
466. Harris, J. O., Frank, J. A., Patronas, N., McFarlin, D. E. & McFarland, H. F. Serial gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging scans in patients with early, relapsing-remitting multiple sclerosis: Implications for clinical trials and natural history. *Ann. Neurol.* **29**, 548–555 (1991).
467. Guttmann, C. R. G. *et al.* Multiple sclerosis lesion formation and early evolution revisited: A weekly high-resolution magnetic resonance imaging study. *Mult. Scler.* **22**, 761–769 (2016).
468. Rüber, T. *et al.* Evidence for peri-ictal blood–brain barrier dysfunction in patients with epilepsy. *Brain* **141**, 2952–2965 (2018).

469. Profaci, C. P., Munji, R. N., Pulido, R. S. & Daneman, R. The blood–brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J. Exp. Med.* **217**, 1–16 (2020).

470. Petersen, L. R., Brault, A. C. & Nasci, R. S. West Nile virus: Review of the literature. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **310**, 308–315 (2013).

471. Maximova, O. A., Bernbaum, J. G. & Pletnev, A. G. West Nile Virus Spreads Transsynaptically within the Pathways of Motor Control: Anatomical and Ultrastructural Mapping of Neuronal Virus Infection in the Primate Central Nervous System. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–23 (2016).

472. Hussmann, K. L., Samuel, M. A., Kim, K. S., Diamond, M. S. & Fredericksen, B. L. Differential Replication of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of West Nile Virus within Astrocytes. *J. Virol.* **87**, 2814–2822 (2013).

473. Grubaugh, N. D. *et al.* West Nile Virus Population Structure, Injury, and Interferon-Stimulated Gene Expression in the Brain From a Fatal Case of Encephalitis. *Open Forum Infect. Dis.* **3**, (2016).

474. Shives, K. D., Tyler, K. L. & Beckham, J. D. Molecular mechanisms of neuroinflammation and injury during acute viral encephalitis. *J. Neuroimmunol.* **308**, 102–111 (2017).

475. Hasebe, R. *et al.* Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiol.* **10**, 165 (2010).

476. Verma, S. *et al.* West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology* **385**, 425–433 (2009).

477. Getts, D. R. *et al.* Ly6c + 'inflammatory monocytes' are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J. Exp. Med.* **205**, 2319–2337 (2008).

478. Liu, K. & Nussenzweig, M. C. Development and homeostasis of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2099–2102 (2010).

479. Belz, G. T. & Nutt, S. L. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 101–113 (2012).

480. Durrant, D. M., Robinette, M. L. & Klein, R. S. IL-1R1 is required for dendritic cell-mediated T cell reactivation within the CNS during west nile virus encephalitis. *J. Exp. Med.* **210**, 503–516 (2013).

481. McCandless, E. E. *et al.* IL-1R Signaling within the Central Nervous System Regulates CXCL12 Expression at the Blood-Brain Barrier and Disease Severity during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **183**, 613–620 (2009).

482. McGavern, D. B. & Kang, S. S. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 318–329 (2011).

483. Wang, S. *et al.* Drak2 Contributes to West Nile Virus Entry into the Brain and Lethal Encephalitis. *J. Immunol.* **181**, 2084–2091 (2008).

484. Michlmayr, D. & Lim, J. K. Chemokine receptors as important regulators of pathogenesis during arboviral encephalitis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–14 (2014).

485. Bai, F. *et al.* A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J. Infect. Dis.* **202**, 1804–1812 (2010).

486. Roe, K., Orillo, B. & Verma, S. West nile virus-induced cell adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells regulate leukocyte adhesion and modulate permeability of the in vitro blood-brain barrier model. *PLoS One* **9**, 1–12 (2014).

487. Paul, A. M. *et al.* Osteopontin facilitates West Nile virus neuroinvasion via neutrophil 'trojan horse' transport. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).

488. Wang, P. *et al.* Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates West Nile Virus Entry into the Brain. *J. Virol.* **82**, 8978–8985 (2008).

489. Roe, K. *et al.* West nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is

characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J. Gen. Virol.* **93**, 1193–1203 (2012).

490. Xu, Z., Waeckerlin, R., Urbanowski, M. D., van Marle, G. & Hobman, T. C. West nile virus infection causes endocytosis of a specific subset of tight junction membrane proteins. *PLoS One* **7**, 1–11 (2012).
491. Verma, S., Kumar, M., Gurjav, U., Lum, S. & Nerurkar, V. R. Reversal of West Nile virus-induced blood–brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* **397**, 130–138 (2010).
492. Wang, T. *et al.* Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* **10**, 1366–1373 (2004).
493. Dai, J., Wang, P., Bai, F., Town, T. & Fikrig, E. ICAM-1 Participates in the Entry of West Nile Virus into the Central Nervous System. *J. Virol.* **82**, 4164–4168 (2008).
494. Barr, K. L., Anderson, B. D., Prakoso, D. & Long, M. T. Working with Zika and Usutu Viruses In Vitro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004931 (2016).
495. Salinas, S. *et al.* Deleterious effect of Usutu virus on human neural cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, 1–21 (2017).
496. Riccetti, S. *et al.* Modelling west nile virus and usutu virus pathogenicity in human neural stem cells. *Viruses* **12**, 1–19 (2020).
497. Weissenböck, H., Bakonyi, T., Chvala, S. & Nowotny, N. Experimental Usutu virus infection of suckling mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination. *Acta Neuropathol.* **108**, 453–460 (2004).
498. de Sousa, A. K., Magalhães, D. de A., Ferreira, J. dos S. & Barbosa, A. L. dos R. SARS-CoV-2-mediated encephalitis: Role of AT2R receptors in the blood-brain barrier. *Med. Hypotheses* **144**, 110213 (2020).
499. Puelles, V. G. *et al.* Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* **383**, 590–592 (2020).
500. Matschke, J. *et al.* Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. *Lancet Neurol.* **19**, 919–929 (2020).
501. Cantuti-Castelvetri, L. *et al.* Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* **370**, 856–860 (2020).
502. Solomon, T. & Vaughn, D. W. Pathogenesis and clinical features of Japanese encephalitis and West Nile virus infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **267**, 171–194 (2002).
503. Song, E. *et al.* Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J. Exp. Med.* **218**, (2021).
504. Manosso, L. M. *et al.* Microbiota-Gut-Brain Communication in the SARS-CoV-2 Infection. *Cells* **10**, 1993 (2021).
505. Douaud, G. *et al.* SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature* **604**, 697–707 (2022).
506. Ramani, A. *et al.* SARS -CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids. *EMBO J.* **39**, 1–14 (2020).
507. Jacob, F. *et al.* Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells and Brain Organoids Reveal SARS-CoV-2 Neurotropism Predominates in Choroid Plexus Epithelium. *Cell Stem Cell* **27**, 937-950.e9 (2020).
508. Bullen, C. K. *et al.* Infectability of human BrainSphere neurons suggests neurotropism of SARS-CoV-2. *ALTEX* **37**, 665–671 (2020).
509. Chigr, F., Merzouki, M. & Najimi, M. Autonomic Brain Centers and Pathophysiology of COVID-19. *ACS Chem. Neurosci.* **11**, 1520–1522 (2020).
510. Li, Y. C., Bai, W. Z. & Hashikawa, T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J. Med. Virol.* **92**, 552–555 (2020).

511. Sharifi-Razavi, A., Karimi, N. & Rouhani, N. COVID-19 and intracerebral haemorrhage: causative or coincidental? *New microbes new Infect.* **35**, 100669 (2020).
512. Bikdeli, B. *et al.* COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology* **75**, 2950–2973 (2020).
513. Klok, F. A. *et al.* Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb. Res.* **191**, 148–150 (2020).
514. Labò, N., Ohnuki, H. & Tosato, G. Vasculopathy and Coagulopathy Associated with SARS-CoV-2 Infection. *Cells* **9**, 1–30 (2020).
515. Goshua, G. *et al.* Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol.* **7**, e575–e582 (2020).
516. Rhea, E. M. *et al.* The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood–brain barrier in mice. *Nat. Neurosci.* **24**, 368–378 (2021).
517. Buzhdygan, T. P. *et al.* The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **146**, 105131 (2020).
518. Petrovszki, D. *et al.* Penetration of the SARS-CoV-2 Spike Protein across the Blood–Brain Barrier, as Revealed by a Combination of a Human Cell Culture Model System and Optical Biosensing. *Biomedicines* **10**, (2022).
519. Wenzel, J. *et al.* The SARS-CoV-2 main protease Mpro causes microvascular brain pathology by cleaving NEMO in brain endothelial cells. *Nat. Neurosci.* **24**, 1522–1533 (2021).
520. Song, E. *et al.* Divergent and self-reactive immune responses in the CNS of COVID-19 patients with neurological symptoms. *Cell Reports Med.* **2**, 100288 (2021).
521. Lee, M. H. *et al.* Neurovascular injury with complement activation and inflammation in COVID-19. *Brain* **145**, 2555–2568 (2022).
522. Pellegrini, L. *et al.* SARS-CoV-2 Infects the Brain Choroid Plexus and Disrupts the Blood-CSF Barrier in Human Brain Organoids. *Cell Stem Cell* **27**, 951-961.e5 (2020).
523. James, L. M. & Georgopoulos, A. P. At the Root of 3 “Long” Diseases: Persistent Antigens Inflicting Chronic Damage on the Brain and Other Organs in Gulf War Illness, Long-COVID-19, and Chronic Fatigue Syndrome. *Neurosci. Insights* **17**, 263310552211148 (2022).
524. Lopez-Leon, S. *et al.* More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **11**, 1–12 (2021).
525. Sanchez-Ramirez, D. C., Normand, K., Yang, Z. & Torres-Castro, R. Long-term impact of COVID-19: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Biomedicines* **9**, 1–15 (2021).
526. Zarei, M. *et al.* Long-term side effects and lingering symptoms post COVID-19 recovery. *Rev. Med. Virol.* **32**, (2022).
527. Tate, W. *et al.* Molecular Mechanisms of Neuroinflammation in ME/CFS and Long COVID to Sustain Disease and Promote Relapses. *Front. Neurol.* **13**, 1–20 (2022).
528. Natale, N. R., Lukens, J. R. & Petri, W. A. The nervous system during COVID-19: Caught in the crossfire. *Immunol. Rev.* 1–22 (2022). doi:10.1111/imr.13114
529. Rutkai, I. *et al.* Neuropathology and virus in brain of SARS-CoV-2 infected non-human primates. *Nat. Commun.* **13**, 1–13 (2022).
530. Seehusen, F. *et al.* Neuroinvasion and Neurotropism by SARS-CoV-2 Variants in the K18-hACE2 Mouse. *Viruses* **14**, 1020 (2022).
531. Karuppan, M. K. M., Devadoss, D., Nair, M., Chand, H. S. & Lakshmana, M. K. SARS-CoV-2 Infection in the Central and Peripheral Nervous System-Associated Morbidities and Their Potential Mechanism. *Mol. Neurobiol.* **58**, 2465–2480 (2021).
532. Kakarla, V. *et al.* Pathophysiologic mechanisms of cerebral endotheliopathy and stroke due to Sars-CoV-2. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **41**, 1179–1192 (2021).

533. West Nile Virus | West Nile Virus | CDC. Available at: https://www.cdc.gov/westnile/. (Accessed: 22nd June 2022)
534. Bournez, L. *et al.* Exposure of Wild Ungulates to the Usutu and Tick-Borne Encephalitis Viruses in France in 2009–2014: Evidence of Undetected Flavivirus Circulation a Decade Ago. *Viruses* **12**, 10 (2019).
535. Buchebner, N. *et al.* Low Usutu virus seroprevalence in four zoological gardens in central Europe. *BMC Vet. Res.* **9**, (2013).
536. Caballero-Gómez, J. *et al.* Evidence of exposure to zoonotic flaviruses in zoo mammals in Spain and their potential role as sentinel species. *Vet. Microbiol.* **247**, 108763 (2020).
537. Ziegler, U. *et al.* Spread of West Nile Virus and Usutu Virus in the German Bird Population , 2019 – 2020. 2019–2020 (2022).
538. McCracken, I. R. *et al.* Lack of Evidence of ACE2 Expression and Replicative Infection by SARSCoV-2 in Human Endothelial Cells. *Circulation* **143**, (2021).
539. Bocci, M. *et al.* Infection of brain pericytes underlying neuropathology of covid-19 patients. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–12 (2021).
540. Carossino, M. *et al.* Fatal Neurodissemination and SARS-CoV-2 Tropism in K18-hACE2 Mice Is Only Partially Dependent on hACE2 Expression. *Viruses* **14**, (2022).
541. Bauer, L. *et al.* In vitro and in vivo differences in neurovirulence between D614G, Delta And Omicron BA.1 SARS-CoV-2 variants. *Acta Neuropathol. Commun.* **10**, 124 (2022).
542. de Melo, G. D. *et al.* COVID-19–related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci. Transl. Med.* **13**, (2021).
543. Soung, A. L. *et al.* COVID-19 induces CNS cytokine expression and loss of hippocampal neurogenesis. *Brain* 1–9 (2022). doi:10.1093/brain/awac270
544. Choi, J., Park, J. H., Jo, C., Kim, K. & Koh, Y. H. SARS-CoV-2 spike S1 subunit protein-mediated increase of beta-secretase 1 (BACE1) impairs human brain vessel cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **626**, 66–71 (2022).
545. Andrews, M. G. *et al.* Tropism of SARS-CoV-2 for human cortical astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, 1–12 (2022).
546. Banks, W. A. & Erickson, M. A. The next chapter for COVID-19: A respiratory virus inflames the brain. *Brain. Behav. Immun.* **101**, 286–287 (2022).
547. Beasley, D. W. C., Li, L., Suderman, M. T. & Barrett, A. D. T. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. *Virology* **296**, 17–23 (2002).
548. Eyer, L. *et al.* An E460D Substitution in the NS5 Protein of Tick-Borne Encephalitis Virus Confers Resistance to the Inhibitor Galidesivir (BCX4430) and Also Attenuates the Virus for Mice. *J. Virol.* **93**, 12 (2019).
549. Gaibani, P. *et al.* Comparative Genomic and Phylogenetic Analysis of the First Usutu Virus Isolate from a Human Patient Presenting with Neurological Symptoms. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
550. Benzarti, E. & Garigliany, M. In vitro and in vivo models to study the zoonotic mosquito-borne usutu virus. *Viruses* **12**, (2020).
551. AL-OBAIDI, M. M. J. *et al.* Disruption of the blood brain barrier is vital property of neurotropic viral infection of the central nervous system. *Acta Virol.* **62**, 16–27 (2018).
552. Vidaña, B. *et al.* West Nile Virus spread and differential chemokine response in the central nervous system of mice: Role in pathogenic mechanisms of encephalitis. *Transbound. Emerg. Dis.* **67**, 799–810 (2020).
553. Lim, S. M., Koraka, P., Osterhaus, A. D. M. E. & Martina, B. E. E. West Nile virus: Immunity and pathogenesis. *Viruses* **3**, 811–828 (2011).
554. Wang, C. *et al.* Endocytosis of flavivirus NS1 is required for NS1-mediated endothelial hyperpermeability and is abolished by a single N-glycosylation site mutation. *PLOS Pathog.* **15**,

e1007938 (2019).

555. Jagadapillai, R. *et al.* Potential Cross Talk between Autism Risk Genes and Neurovascular Molecules: A Pilot Study on Impact of Blood Brain Barrier Integrity. *Cells* **11**, 2211 (2022).
556. Okamoto, T. *et al.* Regulation of apoptosis during flavivirus infection. *Viruses* **9**, 1–12 (2017).
557. Chakraborty, S. & Basu, A. miR-451a Regulates Neuronal Apoptosis by Modulating 14-3-3ζ-JNK Axis upon Flaviviral Infection. *mSphere* **7**, e0020822 (2022).
558. Zhao, W., Han, L., Bae, Y. & Manickam, D. S. Lucifer Yellow - A Robust Paracellular Permeability Marker in a Cell Model of the Human Blood-brain Barrier. *J. Vis. Exp.* **2019**, 1–14 (2019).
559. Cheng, Y. *et al.* Intrinsic antiviral immunity of barrier cells revealed by an iPSC-derived blood-brain barrier cellular model. *Cell Rep.* **39**, 110885 (2022).
560. Daniels, B. P. *et al.* Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *MBio* **5**, e01476-14 (2014).
561. Simöes Da Gama, C. & Morin-Brureau, M. Study of BBB Dysregulation in Neuropathogenicity Using Integrative Human Model of Blood–Brain Barrier. *Front. Cell. Neurosci.* **16**, (2022).
562. Reis, V. P. Dos, Keller, M., Schmidt, K., Ulrich, R. G. & Groschup, M. H. αVβ3 Integrin Expression Is Essential for Replication of Mosquito and Tick-Borne Flaviviruses in Murine Fibroblast Cells. *Viruses* **14**, 18 (2021).
563. Rua, R. *et al.* Infection drives meningeal engraftment by inflammatory monocytes that impairs CNS immunity. *Nat. Immunol.* **20**, 407–419 (2019).
564. Klein, R. S. *et al.* Neuronal CXCL10 Directs CD8 + T-Cell Recruitment and Control of West Nile Virus Encephalitis. *J. Virol.* **79**, 11457–11466 (2005).
565. DiStasi, M. R. & Ley, K. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends Immunol.* **30**, 547–556 (2009).
566. Kempuraj, D. *et al.* Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J. Neurol. Neurosurg. spine* **1**, 1–15 (2016).
567. Streit, W. J., Mrak, R. E. & Griffin, W. S. T. Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. *J. Neuroinflammation* **1**, 1–4 (2004).
568. Ransohoff, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science (80-.).* **353**, 777–783 (2016).
569. Bedin, A. S. *et al.* Monocyte CD169 Expression as a Biomarker in the Early Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.* **223**, 562–567 (2021).
570. Zetterberg, H. Neurofilament Light: A Dynamic Cross-Disease Fluid Biomarker for Neurodegeneration. *Neuron* **91**, 1–3 (2016).
571. Zingaropoli, M. A. *et al.* Neuro-Axonal Damage and Alteration of Blood–Brain Barrier Integrity in COVID-19 Patients. *Cells* **11**, 2480 (2022).
572. Phetsouphanh, C. *et al.* Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. *Nat. Immunol.* **23**, 210–216 (2022).
573. Wouk, J., Rechenchoski, D. Z., Rodrigues, B. C. D., Ribelato, E. V. & Faccin-Galhardi, L. C. Viral infections and their relationship to neurological disorders. *Arch. Virol.* **166**, 733–753 (2021).
574. Leonard, B. E. Inflammation and depression: A causal or coincidental link to the pathophysiology? *Acta Neuropsychiatr.* **30**, 1–16 (2018).
575. Velly, L. *et al.* Optimal combination of early biomarkers for infection and sepsis diagnosis in the emergency department: The BIPS study. *J. Infect.* **82**, 11–21 (2021).
576. Mir, I. N. & Chalak, L. F. Serum biomarkers to evaluate the integrity of the neurovascular unit. *Early Hum. Dev.* **90**, 707–711 (2014).
577. Grygorczuk, S. *et al.* The increased concentration of macrophage migration inhibitory factor in serum and cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis. *J. Neuroinflammation* **14**, 1–17 (2017).

578. Arjona, A. *et al.* Abrogation of macrophage migration inhibitory factor decreases West Nile virus lethality by limiting viral neuroinvasion. *J. Clin. Invest.* **117**, 3059–3066 (2007).
579. Puerta-Guardo, H. *et al.* Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Disassembly of Intercellular Junctions Leading to Barrier Dysfunction and Vascular Leak in a GSK-3β-Dependent Manner. *Pathogens* **11**, 615 (2022).
580. Cardier, J. E. *et al.* Evidence of Vascular Damage in Dengue Disease: Demonstration of High Levels of Soluble Cell Adhesion Molecules and Circulating Endothelial Cells. *Endothelium* **13**, 335–340 (2006).
581. Morichi, S., Kashiwagi, Y., Takekuma, K., Hoshika, A. & Kawashima, H. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy. *Int. J. Neurosci.* **123**, 17–23 (2013).
582. Noren Hooten, N. *et al.* Association of extracellular vesicle inflammatory proteins and mortality. *Sci. Rep.* **12**, 14049 (2022).
583. Cao, M. C. *et al.* Serum biomarkers of neuroinflammation and blood-brain barrier leakage in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurol.* **22**, 216 (2022).
584. Beck, C. *et al.* Contrasted Epidemiological Patterns of West Nile Virus Lineages 1 and 2 Infections in France from 2015 to 2019. *Pathogens* **9**, 908 (2020).
585. Zana, B. *et al.* Multi-approach investigation regarding the west Nile virus situation in Hungary, 2018. *Viruses* **12**, 1–12 (2020).
586. Bohmwald, K. *et al.* The Causes and Long-Term Consequences of Viral Encephalitis. *Front. Cell. Neurosci.* **15**, 1–19 (2021).
587. Tran, V. T. A., Lee, L. P. & Cho, H. Neuroinflammation in neurodegeneration via microbial infections. *Front. Immunol.* **13**, 1–18 (2022).
588. Buchmeier, M. J. & Lane, T. E. Viral-induced neurodegenerative disease. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 398–402 (1999).
589. Smeyne, R. J., Noyce, A. J., Byrne, M., Savica, R. & Marras, C. Infection and Risk of Parkinson's Disease. *J. Parkinsons. Dis.* **11**, 31–43 (2021).
590. Zhou, L., Miranda-Saksena, M. & Saksena, N. K. Viruses and neurodegeneration. *Virol. J.* **10**, 172 (2013).
591. Guasp, M. *et al.* CSF Biomarkers in COVID-19 Associated Encephalopathy and Encephalitis Predict Long-Term Outcome. *Front. Immunol.* **13**, 866153 (2022).
592. Rajan, S. *et al. In the wake of the pandemic: Preparing for Long COVID [Internet]*. (2021).
593. Xie, Y., Xu, E. & Al-Aly, Z. Risks of mental health outcomes in people with covid-19: cohort study. *BMJ* **376**, e068993 (2022).
594. Swank, Z. *et al.* Persistent circulating SARS-CoV-2 spike is associated with post-acute COVID-19 sequelae. *Clin. Infect. Dis.* 1–13 (2022). doi:10.1093/cid/ciac722
595. Natarajan, A. *et al.* Gastrointestinal symptoms and fecal shedding of SARS-CoV-2 RNA suggest prolonged gastrointestinal infection. *Med* **3**, 371-387.e9 (2022).
596. Chertow, D. *et al. SARS-CoV-2 infection and persistence throughout the human body and brain National Institutes of Health*. *Research Square* (2021). doi:10.21203/rs.3.rs-1139035/v1
597. Frank, M. G. *et al.* SARS-CoV-2 spike S1 subunit induces neuroinflammatory, microglial and behavioral sickness responses: Evidence of PAMP-like properties. *Brain. Behav. Immun.* **100**, 267–277 (2022).
598. Weatherhead, J. E. *et al.* Long-term neurological outcomes in West Nile virus-infected patients: An observational study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **92**, 1006–1012 (2015).
599. Ouhoumanne, N. *et al.* Morbidity, mortality and long-term sequelae of West Nile virus disease in Québec. *Epidemiol. Infect.* **146**, 867–874 (2018).
600. Lino, A., Erickson, T. A., Nolan, M. S., Murray, K. O. & Ronca, S. E. A Preliminary Study of

Proinflammatory Cytokines and Depression Following West Nile Virus Infection. *Pathogens* **11**, 650 (2022).

601. Colucci-D'amato, L., Speranza, L. & Volpicelli, F. Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–29 (2020).
602. Chang, B. *et al.* Serum levels of cell adhesion molecules in patients with neuromyelitis optica spectrum disorder. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **7**, 1854–1861 (2020).
603. Aspahan, M. C. *et al.* Neuromyelitis optica spectrum disorder associated with Zika virus infection. *Neurol. Clin. Pract.* **9**, e1–e3 (2019).
604. Aït Amiri, S. *et al.* Identification of First-in-Class Inhibitors of Kallikrein-Related Peptidase 6 That Promote Oligodendrocyte Differentiation. *J. Med. Chem.* **64**, 5667–5688 (2021).
605. Pamies, D. & Hartung, T. 21st Century Cell Culture for 21st Century Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 43–52 (2017).
606. Gosselet, F. Modélisation in vitro de la barrière hémato-encéphalique. *médecine/sciences* **33**, 423–431 (2017).
607. Pediaditakis, I. *et al.* A microengineered Brain-Chip to model neuroinflammation in humans. *iScience* **25**, 104813 (2022).
608. Nzou, G. *et al.* Human Cortex Spheroid with a Functional Blood Brain Barrier for High-Throughput Neurotoxicity Screening and Disease Modeling. *Sci. Rep.* **8**, 7413 (2018).
609. Martín-Acebes, M. A. *et al.* A recombinant DNA vaccine protects mice deficient in the alpha/beta interferon receptor against lethal challenge with Usutu virus. *Vaccine* **34**, 2066–2073 (2016).
610. Pingen, M., Schmid, M. A., Harris, E. & McKimmie, C. S. Mosquito Biting Modulates Skin Response to Virus Infection. *Trends Parasitol.* **33**, 645–657 (2017).
611. Schneider, B. S. *et al.* Potentiation of West Nile encephalitis by mosquito feeding. *Viral Immunol.* **19**, 74–82 (2006).
612. McNutt, M. Reproducibility. *Science (80-.).* **343**, 229 (2014).
613. Lindenbach, B. D. Reinventing positive-strand RNA virus reverse genetics. in *Resuscitation* **151**, 1–29 (2022).
614. Domingo, E. Mechanisms of viral emergence. *Veterinary Research* **41**, 38 (2010).
615. Simonin, Y., van Riel, D., Van de Perre, P., Rockx, B. & Salinas, S. Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, 1–8 (2017).
616. Aubry, F. *et al.* Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nat. Commun.* **12**, 1–14 (2021).
617. Kozlov, M. Omicron Makes a Feeble Attack on the Lungs. *Nature* **601**, 177–177 (2022).
618. Taquet, M. *et al.* Neurological and psychiatric risk trajectories after SARS-CoV-2 infection: an analysis of 2-year retrospective cohort studies including 1 284 437 patients. *The lancet. Psychiatry* 1–13 (2022). doi:10.1016/S2215-0366(22)00260-7
619. Kvapil, P. *et al.* A Sentinel Serological Study in Selected Zoo Animals to Assess Early Detection of West Nile and Usutu Virus Circulation in Slovenia. *Viruses* **13**, 626 (2021).
620. Fynmore, N. *et al.* Rapid assessment of West Nile virus circulation in a German zoo based on honey-baited FTA cards in combination with box gravid traps. *Parasit. Vectors* **14**, 1–10 (2021).
621. Cadar, D. *et al.* Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, Western Europe, 2016. *Eurosurveillance* **22**, 1–7 (2017).
622. Cadar, D. *et al.* Usutu Virus in Bats, Germany, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1771–1773 (2014).
623. Sieg, M. *et al.* Outbreak and Cocirculation of Three Different Usutu Virus Strains in Eastern Germany. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **17**, 662–664 (2017).
624. Calzolari, M. *et al.* Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and

2014. *Infect. Genet. Evol.* **51**, 255–262 (2017).

625. Taucher, C., Berger, A. & Mandl, C. W. A trans -Complementing Recombination Trap Demonstrates a Low Propensity of Flaviviruses for Intermolecular Recombination. *J. Virol.* **84**, 599–611 (2010).
626. Fros, J. J. *et al.* Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local Culex pipiens mosquitoes in north-western Europe. *One Heal.* **1**, 31–36 (2015).
627. Wang, H. *et al.* Competition between Usutu virus and West Nile virus during simultaneous and sequential infection of Culex pipiens mosquitoes. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 2642–2652 (2020).
628. Nikolay, B. A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: How much do transmission cycles overlap? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **109**, 609–618 (2015).
629. Martin, H. *et al.* Usutu Virus Infects Human Placental Explants and Induces Congenital Defects in Mice. *Viruses* **14**, 1619 (2022).
630. Mencattelli, G. *et al.* West Nile Virus Lineage 2 Overwintering in Italy. *Trop. Med. Infect. Dis.* **7**, 160 (2022).
631. Hawkes, R. ENHANCEMENT OF THE INFECTIVITY OF ARBOVIRUSES BY SPECIFIC ANTISERA PRODUCED IN DOMESTIC FOWLS. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **42**, 465–482 (1964).
632. Biering, S. B. *et al.* Structural basis for antibody inhibition of flavivirus NS1–triggered endothelial dysfunction. *Science (80-.).* **371**, 194–200 (2021).
633. Chessa, C. *et al.* Antiviral Effect of hBD-3 and LL-37 during Human Primary Keratinocyte Infection with West Nile Virus. *Viruses* **14**, 1552 (2022).
634. Kieseier, B. C. The mechanism of action of interferon-β in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* **25**, 491–502 (2011).
635. Spitzer, D. *et al.* Profiling the neurovascular unit unveils detrimental effects of osteopontin on the blood–brain barrier in acute ischemic stroke. *Acta Neuropathol.* **144**, 305–337 (2022).
636. Enria, D. *et al.* Strengthening the evidence base for decisions on public health and social measures. *Bull. World Health Organ.* **99**, 610-610A (2021).
637. Dance, A. Beyond coronavirus: the virus discoveries transforming biology. *Nature* **595**, 22–25 (2021).

Annexes

Annexe 1 Revue

frontiers | Frontiers in Immunology

REVIEW
published: 22 April 2022
doi: 10.3389/fimmu.2022.862053



Role of Dendritic Cells in Viral Brain Infections

Orianne Constant[1], Ghizlane Maarifi[2], Fabien P. Blanchet[2], Philippe Van de Perre[1], Yannick Simonin[1†] and Sara Salinas[1*†]*

[1] Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), University of Montpellier, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France, [2] Institut de Recherche en Infectiologie de Montpellier, Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Université de Montpellier, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Michael H. Lehmann, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany

Reviewed by:
Aditya Rayasam, Medical College of Wisconsin, United States
Andrew Nicholas Harman, The University of Sydney, Australia

***Correspondence:**
Yannick Simonin
yannick.simonin@umontpellier.fr
Sara Salinas
sara.salinas@inserm.fr

†These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Viral Immunology, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: *25 January 2022*
Accepted: *22 March 2022*
Published: *22 April 2022*

Citation:
Constant O, Maarifi G, Blanchet FP, Van de Perre P, Simonin Y and Salinas S (2022) Role of Dendritic Cells in Viral Brain Infections. Front. Immunol. 13:862053. doi: 10.3389/fimmu.2022.862053

To gain access to the brain, a so-called immune-privileged organ due to its physical separation from the blood stream, pathogens and particularly viruses have been selected throughout evolution for their use of specific mechanisms. They can enter the central nervous system through direct infection of nerves or cerebral barriers or through cell-mediated transport. Indeed, peripheral lymphoid and myeloid immune cells can interact with the blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers and allow viral brain access using the "Trojan horse" mechanism. Among immune cells, at the frontier between innate and adaptive immune responses, dendritic cells (DCs) can be pathogen carriers, regulate or exacerbate antiviral responses and neuroinflammation, and therefore be involved in viral transmission and spread. In this review, we highlight an important contribution of DCs in the development and the consequences of viral brain infections.

Keywords: viral infection, dendritic cell, blood–brain barrier, neuroinflammation, neuroinfections, blood–cerebrospinal barrier

INTRODUCTION

The central nervous system (CNS) is often considered as an immune-privileged organ because it is separated from the blood by specific cellular barriers. Nonetheless, pathogens, in particular neurotropic viruses, have been selected throughout evolution for their ability to reach the brain (1). Human pathologies following CNS viral infections can be due to direct virus invasion and elicited toxicity or indirectly by mediators of neuroinflammation. For instance, some virus-associated neuronal diseases can be due to direct infection of neurons or to indirect effects triggered by CNS-supporting cells and inflammatory mediators, causing damages and dysfunctions (paralysis, cognitive deficits, ocular problems) (2, 3). Different clinical symptoms may appear depending of the site of infection and/or inflammation: meningitis for inflammation of leptomeningeal structures, myelitis for the inflammation of the spinal cord, and encephalitis for inflammation of parenchymal brain tissue (4), the latter being most common upon viral neuroinfections. Viral brain infections are generally limited by *in situ* innate immune response of the host and by the physical protection exerted by the brain barriers. These are complex

multicellular structures forming an endothelium or an epithelium that separates the systemic circulation from the CNS. Depending on their location, the brain barriers exert different functions but they mostly control diffusion between CNS and blood and allow a precise regulation of CNS metabolism and immunity.

Importantly, immune cells have an ambivalent role during viral brain infections, as they are actors of the antiviral response but can also be viral carriers into the CNS and therefore participate in virus transmission, neuroinflammation, and associated deleterious effects. Moreover, because of the presence of viruses or inflammatory mediators in the brain, the release of cytokines and chemokines will further allow transmigration of immune cells such as monocytes, T lymphocytes, natural killer cells (NK), and dendritic cells (DCs) (5–7).

Immunosurveillance is provided by specific resident and incoming immune cell subsets. Their distribution varies depending on the nature of the epithelium and the inflammatory state of the tissue (8, 9). Among these immune cells, DCs are the very first responders following viral infection, as they are at the frontier between innate and adaptive immunity and acting as sentinels of the immune system, notably in the site of potential infection, including in the CNS. In this review, we try to shed some light on the pathogenesis of viral brain infections with a particular interest in the interactions with brain barriers and a focus on the role of DCs during viral brain invasion.

MECHANISMS OF VIRAL BRAIN ACCESS

Different viral CNS access mechanisms have been characterized, involving a neuronal-mediated spread mechanism (through axonal transport) and a hematogenous-mediated viral entry route (through interaction with brain barriers) (**Table 1**). Notably, entry mechanisms and viral tropism may determine neurological symptoms and clinical outcome (42, 43).

Axonal Transport

Neurons represent significant entry gates to the CNS for numerous pathogens (43). Indeed, cranial nerves from the olfactory system (**Figure 1A**) or peripheral nerves (**Figure 1B**) can be used for axonal transport by viruses such as rabies virus, herpes simplex virus (HSV), poliovirus, St. Louis encephalitis virus, West Nile virus (WNV), or severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (10–12, 14–16, 18, 19, 23, 24). Viruses use also the host cell transport machinery, such as transport mediated by kinesins along microtubules in the anterograde direction or the interaction of dynactin and dynein with microtubules in the retrograde transport (44–46) (**Figure 1B**) and trans-synaptic trafficking that will enhance brain invasion as it was described for WNV (47) and Measles virus (25) (**Figure 1A**). This allows a direct access to the CNS while escaping from host immune response (17, 48, 49). For instance, some viruses can access the CNS *via* peripheral uptake because of limited host defense that did not control peripheral infection (1).

Entry Through the Blood–Brain Barrier

The blood–brain barrier (BBB), located between neuronal capillaries and the CNS, is constituted by pericytes and astrocytes closely interacting with a monolayer of endothelial cells to control exchanges with the blood through the high expression of tight junction proteins (**Figure 1C**) (50–52). This structure is found in cerebral blood vessels and is essential for the transport of lipid-soluble molecules or gaseous and liquid components by passive diffusion, while the transport of large and polar molecules is reduced (53). The BBB also has active transport mechanisms that regulate CNS homeostasis while avoiding neuroinvasion by leukocytes or pathogens (54). However, some molecules and pathogens can be transported in endocytic vesicles across the endothelial cells and pericytes, and transferred into the CNS, such as cells and pathogens upon secretion of chemoattractant molecules (28, 55).

Cell-free viruses, when in sufficient amount in the blood, can reach the CNS during the primary viremia (**Figure 1C**). Thereupon, endothelial cells can be susceptible and permissive to direct viral infection and replication, leading to brain invasion by basolateral viral particle release. Measles virus, for example, can productively infect BBB endothelial cells, allowing the release of viral particles and CNS invasion (26). Other studies on the interaction between human brain endothelial cells and flaviviruses have demonstrated CNS invasion by direct infection of these cells (**Figure 1C**) (28, 56). Moreover, the presence of viral particles such as WNV in the blood can also lead to BBB dysregulation with a decrease of tight junction protein expression, mostly zona occludens-1 (ZO-1) and claudin-5, after activation of Rho GTPases following the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs). For instance, human T-cell lymphotrophic virus type 1 (HTLV-1) is also able to productively infect human brain endothelial cells, leading to a dysregulation of tight junction protein expression and subsequent transcellular virus spread into the CNS (27, 57).

Viral Interaction With Meninges and the Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier

The blood–cerebrospinal fluid (CSF) barrier (BCSFB) limits the passage between the blood and the CSF produced by the choroid plexus (51) (**Figure 1D**). Located in the ventricular system of the brain, the choroid plexus complexed with endothelial cells and CSF form the BCSFB. The stroma, at the center of the choroid plexus, is composed of fibroblasts, immune cells, connective tissue, and blood microvessels (58). Similarly to the BBB, this barrier is an important interface between the peripheral circulation and the CNS. Indeed, the specialized cuboidal epithelial cells form a layer with a high expression of tight junctions to separate the blood from the CSF that they produce (51, 59). Some viruses display important choroid plexus tropism such as chikungunya virus, echovirus-30, JC virus (JCV), or Zika virus (ZIKV) (31–33, 60). Neuroinvasion

TABLE 1 | Different CNS mechanism access and symptoms for some neurotropic viruses.

Viruses	CNS access	Main cells targeted	Symptoms	References
Rabies virus	Axonal transport (peripheral nerve and olfactory bulb)	Neurons	Encephalitis	(10–13)
Herpes simplex virus	Axonal transport (olfactory bulb)	Glial cells (astrocytes) Neurons	Encephalitis, persisting latent infection	(14)
Poliovirus	Axonal transport (peripheral nerve and olfactory bulb) Entry *via* brain barrier	Neurons	Paralytic poliomyelitis, encephalitis, acute flaccid paralysis	(15, 16)
St. Louis encephalitis virus	Axonal transport (peripheral nerve and olfactory bulb) Entry *via* brain barrier	Neurons Glial cells (astrocytes)	Meningitis, encephalitis, coma, agitations, confusion, tremors	(17)
West Nile virus	Axonal transport (peripheral nerve and olfactory bulb) Entry *via* brain barrier Cell-mediated (leukocytes neutrophils)	Neurons Endothelial cells Astrocytes	Encephalitis, cognitive dysfunction, flaccid paralysis, ocular manifestations, muscle weakness	(18–22)
SARS-CoV-2	Axonal transport (olfactory bulb)	Neurons?	Seizures, encephalitis, loss of consciousness, anosmia, ageusia, Guillain–Barré syndrome, ischemic stroke	(23, 24)
Measles	Axonal transport (peripheral nerve and olfactory bulb) Cell-mediated Entry *via* brain barrier	Neurons BBB endothelial cells	Encephalitis, encephalomyelitis, subacute sclerosing, panencephalitis	(25, 26)
HTLV-1	Entry *via* brain barrier	Neurons	HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)	(27)
Zika	Axonal transport (peripheral nerve and olfactory bulb) Cell-mediated (leukocytes) Entry *via* brain barrier	Neurons BBB cells Glial cells	Guillain–Barré syndrome, congenital Zika syndrome, meningoencephalitis	(28–30)
Chikungunya virus	Entry *via* brain barrier	Neurons Glial cells (astrocytes)	Myalgia, arthralgia, encephalopathy, hemorrhagic fever, meningoencephalitis, myelitis, Guillain–Barré syndrome	(31)
Echovirus-30	Entry *via* brain barrier (infection choroid plexus)		Meningitis, encephalitis, flaccid paralysis, myocarditis	(32)
JC virus	Entry *via* brain barrier (infection choroid plexus) Cell-mediated (B cells)	Oligodendrocytes Microglial cells	Encephalitis, meningoencephalitis, multifocal leukoencephalopathy	(33, 34)
HIV-1 (and SIV)	Cell-mediated (CD4+ T cells, monocytes, DCs) Entry *via* brain barriers	Macrophages Microglia	HIV-1-associated dementia (HAD), cognitive and motor disorders, HIV-1-associated neurocognitive disorders (HAND)	(35–37)
Coxsackievirus	Cell-mediated (myeloid cells) Entry *via* brain barrier (infection choroid plexus)	Neurons	Encephalomyelitis, meningitis	(38)
Toscana virus	Cell-mediated Entry *via* brain barriers	Brain endothelial cells Neurons?	Kernig sign, nuchal rigidity, photophobia, consciousness troubles, tremors, nystagmus, paresis, meningitis, meningoencephalitis, encephalitis	(39)
Varicella zoster virus	Cell-mediated (DCs and T cells) Entry *via* brain barriers	Nerve cells	Postherpetic neuralgia, congenital varicella syndrome	(40)
Nipah virus	Cell-mediated Axonal transport Entry *via* brain barriers	Brain endothelial cells Neurons	Encephalitis, vasculitis, parenchymal necrosis drowsiness, headache, disorientation or confusion, reduced consciousness	(41)

BBB, blood-brain barrier; HIV, human immunodeficiency virus; HTLV, human T-cell lymphotrophic virus; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SIV, simian immunodeficiency virus.

and/or spreading may also involve meninges and the CSF. Of note, the lymphatic transport system (glymphatic system and meningeal lymphatic vessels) is also a key actor in the regulation of CNS homeostasis due to its functions in immune monitoring and metabolite draining among others (61). It is also involved in pathological mechanisms, including brain infections (62). Because the lymphatic transport system is involved in CSF drainage (or outflow), it can also facilitate cell and viral CNS access. Indeed, evidence of close interaction between CSF and lymphatic vessels, notably for CSF drainage from subarachnoid space (63, 64), can support cell-mediated and viral particle circulation in the CNS.

The Trojan Horse Mechanism

Importantly, an exacerbated primary inflammatory response that alters brain barrier permeability can also facilitate transfer

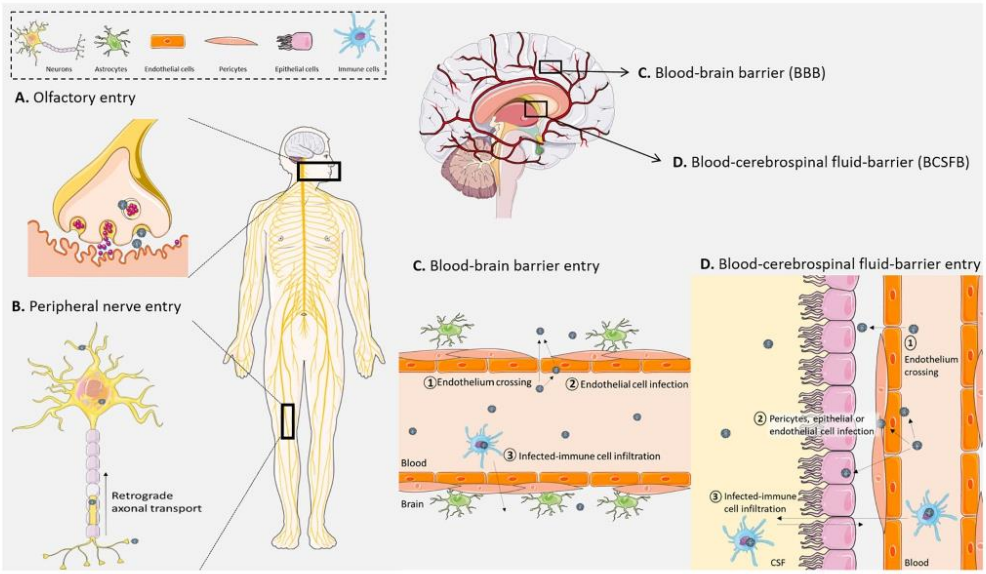


FIGURE 1 | Different viral modes of access to the central nervous system (CNS). **(A)** Viruses can be up taken by nerve terminals at the olfactory bulb to gain access to the CNS. **(B)** They also can infect peripheral neurons and use long-range retrograde axonal transport. **(C)** At the blood–brain barrier (BBB), (1) viruses can directly cross the endothelium (by paracellular or transcellular ways), (2) they can infect and replicate in brain endothelial cells and be released in the CNS, (3) and finally they can pass through the BBB by infecting immune cells that cross the endothelium through the "Trojan horse" mechanism. **(D)** At the blood–cerebrospinal fluid barrier, (1) viruses can directly cross the endothelium, (2) they can also infect, replicate, and be released from endothelial cells, pericytes, or epithelial cells of the choroid plexus, (3) and finally infected immune cells can also cross this barrier and deliver viruses in the CNS. Created with SMART Servier Medical Art.

through circulating infected immune cells (**Figure 1C**). The transfer of pathogens to the CNS through infected immune cells is called "Trojan horse" mechanism and is increasingly studied, as several viruses are now described to use this pathway to invade the CNS (65). CNS infection by human immunodeficiency virus (HIV)-1 can presumably occur in a cell-free manner (66), but virus transport across the brain barriers can be mediated by HIV-1-infected immune cells as monocytes or $CD4^+$ T cells (35, 36, 66). HIV-1-infected $CD14^+$/$CD16^+$ monocytes were also reported to efficiently cross the BBB, thus placing the "Trojan horse" strategy as a main route of CNS infection (4, 67, 68). In non-human primates, it was also demonstrated in the role of simian immunodeficiency virus (SIV)-infected monocytes in neuroinvasion (37). Similarly, JCV can infect B cells, which transmigrate across the BBB (34). By its location at the interface of the blood, CSF, and brain, the choroid plexus is an important regulator of immune cell traffic and is also a target during infections and immune cell infiltration supporting neuroinflammation (59). For example, myeloid cells infected by coxsackievirus are suspected of being disseminators of the virus from the blood within the CNS *via* the choroid plexus (38).

Nonetheless, it seems that viral access through brain barriers and direct neuronal access to the CNS are not mutually exclusive and can occur concomitantly for instance during infection by rabies virus and WNV (1, 13, 17, 47, 69) (**Table 1**). Mediators released during infection can interact with and modulate the BBB permeability as vasogenic and growth factors, cytokines, and chemokines (70, 71). These examples illustrate how infections and pro-inflammatory factors lead to an increase in brain barrier permeability and an enhanced access across brain barriers, promoting the development of neuroinflammation (71–73) (**Figure 2**).

Upon cytokines, chemokines, and cellular adhesion molecule upregulation, different classes of immune cells can be recruited at brain barriers. Their transmigration into the CNS helps the antiviral response and control neuroinflammation or facilitate viral entry (**Figure 2**). In healthy context, macrophages and DCs can be found in the perivascular space at the BBB and choroid plexus, which ensure immunosurveillance. During pathological conditions, these cells and other antigen-presenting cells (APC) can recruit effector immune cells in these perivascular spaces (74). For example, in the context of SIV infection, SIV-infected immune cells are found in the perivascular space (37). This

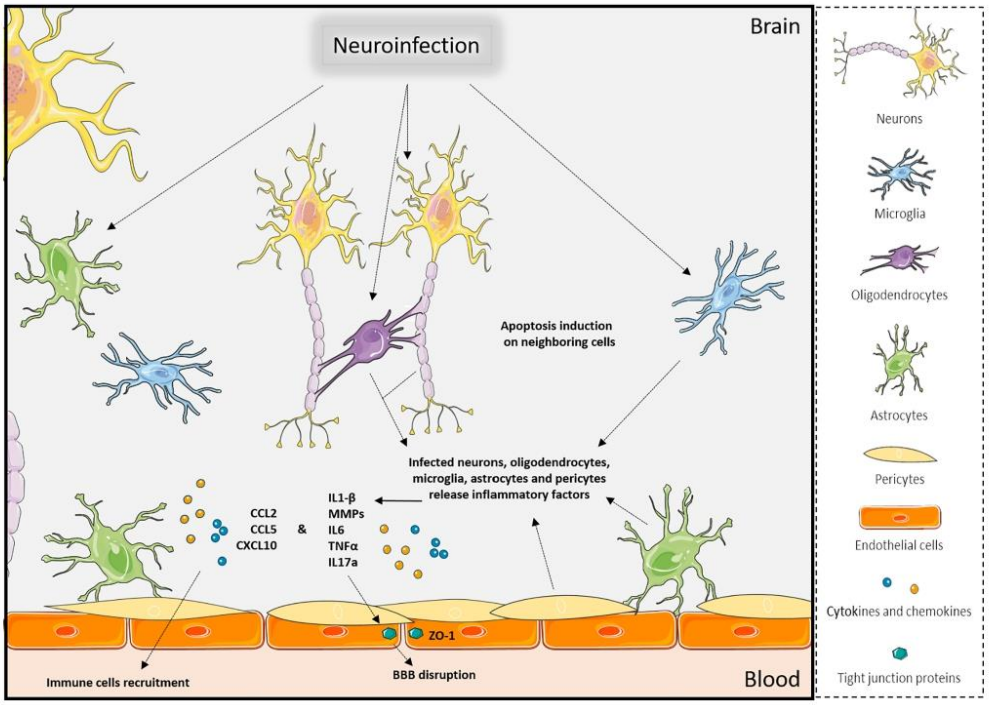


FIGURE 2 | Effects of neuroinfections in the CNS. Viral brain infections will trigger multiple molecular and cellular mechanisms in the various CNS cell types that can lead to apoptosis of neuronal cells, release of pro-inflammatory factors, disruption of brain barriers, and immune cell recruitment, which ultimately will exacerbate neuroinflammation. Created with SMART Servier Medical Art.

compartment should not be neglected during neuroinflammation studies, as immune cell recruitment at the BBB starts with a transmigration in the perivascular space before migration across glia limitans (75, 76).

A FOCUS ON DENDRITIC CELLS

Immunosurveillance is provided by specific resident and incoming immune cell subsets. Their distribution varies depending on the nature and the inflammatory state of the tissue (8, 9). Among these immune cells, DCs are the very first responders following viral infection, as they are at the frontier between innate and adaptive immunity and acting as sentinels of the immune system, including in the CNS.

DCs include different subsets with specific cellular and immunological properties: the myeloid/conventional DCs (DCs), the Langerhans cells (LCs) that are the unique DC subset located in mucosal stratified (intestine and oral mucosa) and pseudostratified epithelium (example: lung) as well as skin epidermis (8, 77), and the plasmacytoid DCs (pDCs), which are unconventional DCs characterized by their ability to produce large amounts of type I interferon (IFN-I) in response to viral pathogens (78, 79) (**Table 2**).

DC subsets originate from bone marrow $CD34^+$ hematopoietic stem cells giving rise to common myeloid/lymphoid progenitors (CMLPs), which then differentiate toward common myeloid progenitor (CMP) or common lymphoid progenitor (CLP). Under specific environmental cytokine conditions, concomitantly with the expression of defined transcription factors, CMPs separate from the monocyte/macrophage axis and generate common DC progenitors (CDPs), which will give rise to pDCs and conventional DC subsets (8, 80). Various DC precursors (Pre-DCs) with selective functional features are characterized by the unique expression of AXL and SIGLEC6 along with myeloid and plasmacytoid markers like CD11c and CD123 (81, 82). However, this was recently challenged, since DC (Axl^+ Siglec 6^+), named AS DC, was described in 2017 as a potential new functional DC subset instead of being an exclusive pre-DC progenitor (81).

TABLE 2 | Phenotypic and functional markers of human blood and tissue dendritic cell subsets.

	Plasmacytoid DCs (pDCs)	Myeloid DC subtypes			
		Myeloid DCs	Langerhans cells (LCs)	Conventional DCs	Monocyte- derived DCs (MoDCs)
				cDC1 cDC2	
Localization	Blood	Blood	Epidermis and other tissues	Dermis and other tissues	*In vitro*
Phenotype	$CD11c^{-}CD1a^{+}$ $CD1c^{-}CD123^{high}$ $BDCA4^{+}$ $BDCA2^{+}$	$CD11c^{+}CD1a^{+}$ $CD1c^{+}CD123^{low}$ BDCA1+	CD11c+CD1a+ CD207+	$CD11c^{low}$ CD68+ CD11b- $CLEC9A^{+}$ $XCR1^{+}$ CD11c + CD11b + SIRPa	CD11c+CD1a+ $CD1c+CD123^{low}$
TLR (toll like receptor) expression	TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 and TLR10	TLR1,TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8 and TLR10	TLR1, TLR2, TLR3, TLR6, TLR7 and TLR8	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 and TLR8	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8 and TLR10
C-type lectin expression	BDCA2 and DCIR	DCIR, DC-SIGN and MR	Langerin/CD207	DC-SIGN and MR	DCIR, DC-SIGN and MR

BDCA2, blood DC antigen 2 (also known as CLEC4C); DCIR, DC immunoreceptor (also known as CLEC4A); MR, mannose receptor; SIRPa, signal regulatory protein a. BDCA2, blood DC antigen 2 (also known as CLEC4C); CD, cluster of differentiation; cDC, conventional dendritic cells; CLEC, C-type lectin domain containing; DC-SIGN, dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin; DCIR, DC immunoreceptor (also known as CLEC4A); MR, mannose receptor; pDC, plasmacytoid dendritic cells; SIRPa, signal regulatory protein a; TLR, Toll-like receptor; XCR, X-C motif chemokine receptor.

Nevertheless, DCs can be divided into three major DC subsets, pDC, conventional DC1 (cDC1), and conventional DC2 (cDC2), but other cell phenotypes can arise from those subsets particularly when considering tissue-resident DCs and inflammatory status (8, 80). Interestingly, LCs, which represent a DC subset exclusively present in the epidermis and upper mucosal layers, were shown to be functionally related to DCs but ontogenically closer to macrophages due to their reported embryonic origin and self-renewing capacities (83, 84). Indeed, the ontogeny of LCs has always been subject to intense debate, and new transcriptomic data suggest that LCs are rather closely related to tissue-resident macrophages. Nevertheless, LCs were recently reported to share ontogeny and transcriptional features with both macrophages and DCs (85). From a functional and phenotypic point of view, LCs have strong similarities with DCs (86). For example, LCs have the ability to capture pathogens and possess migratory abilities to initiate T-cell responses in lymph nodes. Moreover, LCs can be generated *ex vivo* from hematopoietic precursors in response to cytokines and cell membrane-associated ligands. Thus, LCs were found to share both macrophage and DC characteristics (85, 87), as particularly evidenced upon skin damage and inflammation or infection processes *in vivo*. All the current debates based on the different reported cell or animal models emphasize the importance to consider functional lineage plasticity besides ontogenetic data. Also, as LCs, other DC subsets were reported to develop under certain conditions like monocyte-derived DC (MoDC), arising in inflamed tissues and reminiscent of reported inflammatory DC subsets (88, 89). Importantly, the myeloid DC lineages (cDC1 and cDC2) are clearly distinguished from MoDCs, which are usually derived from monocytes predominantly under inflammatory conditions *in vivo* and *in vitro* (**Table 2**) (90), although the identification of new DC subsets evolves with the recent identification of new human anogenital MoDCs present in non-inflamed tissues that take up HIV and transmit virus to CD4 T cells (91).

DCs are highly specialized professional APC populations through the expression of major histocompatibility complex (MHC) class II and costimulatory molecules that lead to naive T-cell stimulation (91–94). They have the capacity to capture antigen in the periphery and in the subepithelium to migrate to proximal lymph nodes where they prime naive T cells and engage the adaptive immune response. These cells express various pathogen sensors, including many specific PRRs and toll like receptors (TLRs), allowing major secretion of type I IFN that induces IFN-stimulated genes (ISGs) used to counteract infection (8, 95–97). However, their capacity to capture pathogens is mainly due to their expression of lectin and lectin-like receptors such the sialic acid-binding immunoglobulin (Ig)-like lectins (Siglecs) family (98) and especially C-type lectins receptors (CLRs). CLRs bind carbohydrate structures associated with viruses, fungi, or bacteria expressed by LCs, Dendritic cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and the CLR DC-associated C-type lectin-2 (Dectin-2/CLEC6A) expressed by DCs and macrophage, and galactose type C-type lectin (MGL, CD301) expressed by both DCs and macrophages (but not LCs), respectively (99, 100). Although CLRs have established antiviral functions, many viruses are capable of hijacking these receptors to their advantage. In particular, langerin escape or its hijacking by a virus seems to be much rarer in contrast to DC-SIGN that has been shown to bind the gp120 glycoprotein of HIV-1 and promotes efficient trans-infection of $CD4^{+}$ T cells. DC-SIGN can also be used to infect certain DCs with many viruses, such as cytomegalovirus or Ebola

virus but also several flaviviruses, including dengue virus and WNV (101). Thus, some DC subtypes may constitute the point of access of viruses, allowing their subsequent transmission and propagation through the body including the CNS. Although the contribution of different DCs is not clearly established, they may also represent a "Trojan horse" because they can migrate efficiently to the brain.

DENDRITIC CELLS IN NEUROINFLAMMATION AND BRAIN DISEASES

DCs are naturally present within the brain where they act as sentinels under steady-state conditions and during brain disease and neuroinflammation (102). They have been shown to efficiently interact with brain barriers in order to access the CNS.

During the leukocyte recruitment at the BBB, immune cells including DCs interact with various actors. First, cytokines and chemokines, released during CNS inflammation such as CCL2, can chemoattract circulating DCs at brain barriers. Then, contact between the upregulated cellular adhesion molecules (CAMs) P-selectin, E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) on endothelial cells with P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) and DC-SIGN on DCs allows rolling and adhesion on the BBB apical surface (103). These steps are followed by potential transmigration, facilitated by interaction of DC-SIGN with CAMs or tight junction proteins. Interestingly, DCs can also express tight junction proteins to facilitate this step without a deleterious effect on the BBB integrity (103) (**Figure 3A**). Importantly, neuroinfiltration may depend on the DC state. Indeed, during activation and arrest steps, migration of mature DCs across the BBB can be enhanced by interaction of CCR7 with CCL19 and CCL21 (**Figure 3B**), whereas immature DCs can also be attracted by CCR2, CCR3, and CCR5, which interact with CCL2, CCL3, and CCL5, respectively (**Figure 3C**) (6, 104). Interestingly, immature DCs have better capacity to cross the BBB than mature DCs in part because of the different expressions of specific traffic signals at their surface (105, 106). *In vitro*, the transmigration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced DCs across the BBB was shown to be increased in the presence of CCL3. In addition, GM-CSF-matured DCs secrete metalloproteinases, allowing transmigration across the BBB with redistribution of tight junction molecules (107). Regarding the BCSFB, molecular mechanisms of DC interaction are less well-defined (108, 109). As in the blood compartment, DCs are mainly recruited in the CSF by chemoattraction through the release of CCL2, CCL3, CCL4, and CXCL12, the latter of which being critical during this recruitment step (110). Following increased concentration of DCs in the CSF, they can interact by the expression of CAMs on their surface and on the surface of choroid plexus epithelial cells (5). All these interactions support BCSFB immunosurveillance functions with DC's high APC role and recruitment in brain parenchyma.

Brain DCs represent 1% of immune cells found in the brain and are sparsely found in the CSF (less than 1% of CSF cells) (5, 111, 112). Macrophages and DCs are found naturally in non-pathological conditions in the choroid plexus stroma (113), in sites of plasticity and neurogenesis, and where the BBB is absent to provide immunosurveillance (114). Through their innate properties, brain DCs can activate encephalitogenic T cells (self-antigen-reactive T cells) or release pro-inflammatory cytokines to the detriment of the CNS homeostasis; their loss leads to dysregulation of immune tolerance and excessive inflammatory response (115). Consequently, in a context of adaptive immune response, DCs are important potential inducers of primary T cells (113). For example, they are among the APCs, present in dural sinuses, one compound of the meninges, and they allow the presentation of antigen from CSF to T cells in cervical lymph nodes (115, 116).

During neuroinflammation, the number of DCs increases in the CNS and particularly in the CSF where they can more easily reach lymph nodes to activate the immune response. They participate indirectly to exacerbate neuroinflammation (74, 110). For example, they are involved in autoimmune diseases as in the murine model of multiple sclerosis (MS) named experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (117). MS is a chronic CNS inflammatory disease, often studied with the EAE mouse model, based on the reactivity of T cells to endogenous myelin epitopes (encephalitogenic T cells). At the EAE onset, DCs from the CNS support inflammatory T cells at the peak of the disease, then become poor APC and prime the development of regulatory T cells (118–120). Notably, it was shown that DCs promote myelin-reactive T cells during the reactivation phase of EAE (121) leading to the proposition to target DCs for therapeutic approaches in MS. The accumulation of DCs during the neuroinflammation translating the EAE is becoming better understood. These immune cells can be mainly from peripheral bone marrow-derived precursors or from activation of resident microglia that will show DC characteristics, reflecting the wide range of DC precursors (120, 122). Another illustration is the role of DC during Guillain–Barré syndrome. They are the main APCs in the CSF, whether they are myeloid or plasmacytoid; they can present auto-antigen from spinal nerve, activate T and B cells, and finally lead to the autoimmune disease (123, 124).

Neuroinflammation can also be due to CNS injuries such as strokes or seizures. In these cases, different DC subpopulations can be recruited due to the release of various cytokines and chemokines by damaged cells. cDCs and pDCs have different sensitivities to chemokines according to their receptor expression (125). Studies have found peripheral derived DCs in the necrotic zone after stroke injury, but also resident DCs associated with T cells in the penumbral zone where they have a more immunomodulatory function after activation probably due to release of IFNγ (126). Others have shown the presence of DCs from bone marrow-derived population that exert pro-inflammatory actions with the production of cytokines after ischemic lesions (120, 127). Epilepsy is a consequence of infection or autoimmune disease, and during extended seizure,

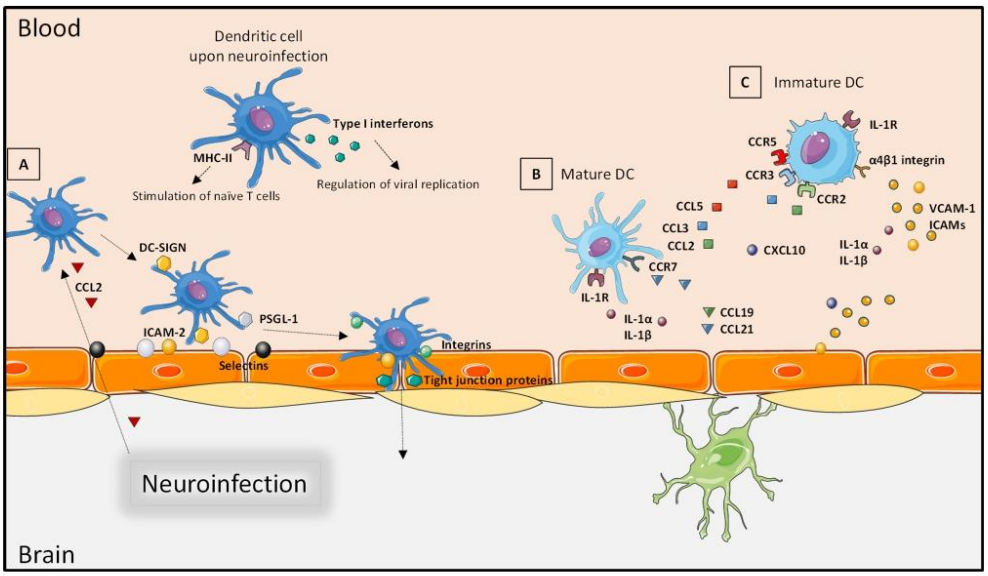


FIGURE 3 | Interaction of dendritic cells with the blood–brain barrier. Through the neuroinfection and the release of pro-inflammatory factors, DCs can produce type I interferon to regulate viral replication. Infected DCs can also act as antigen-presenting cells and stimulate T cells. **(A)** DCs are chemoattracted to brain barriers by circulating chemokines (such as CCL2); a firm contact is established by interaction of cellular adhesion molecules expressed by endothelial cells that facilitate rolling and adhesion. Transmigration occurs as an interaction of cellular adhesion molecules and integrins. **(B)** The recruitment of mature DCs is facilitated by expression of CCR7 and IL-1R that increases attraction by secreted CCL19, CCL21 or IL-1α and IL-1β, respectively. **(C)** Immature DCs can also be attracted by interaction of IL-1α or IL-1β with IL-1R, but their expression of CCR2, CCR3, and CCR5 increases the interactions with CCL2, CCL3, and CCL5. Created with SMART Servier Medical Art.

there are glial cell activation and upregulation of CAM expression on endothelial cells (128, 129). Also, in epileptic experimentation on rats, DCs can be found in blood vessels until 24 h after the seizure (130). In humans, the study of chronic epileptic patients has found the presence of DCs and T cells in blood vessels (131). In this epileptic context, DCs seems to maintain the chronic inflammation, source of seizures (132).

DCs are also important players during brain infections. During protozoal infection of the brain, caused by *Toxoplasma gondii*, DCs are major factors of neuroinflammation. First, the intracellular parasite accesses the brain through "Trojan horse" mechanisms using migratory leukocytes, including DCs (120, 133, 134). Next, during *T. gondii*-induced encephalitis, DCs found in the brain are mature APCs, produce pro-inflammatory interleukin (IL)-12 cytokines, and can provide Th1 response from $CD4^+$ T cells (135, 136). Here, DCs participate in the initiation of immune response against the parasite, but they also maintain neuroinflammation and can contribute in *T. gondii*-induced encephalitis chronicity. For bacterial meningitis, the more severe CNS infection etiology, DCs are in high concentration in patient CSF. They lead to neuroinflammation by Th1 immune response induction, but they also exert a key role in the regulation of the host immune evasion of some bacterial strains such as *Escherichia coli* K1 (120, 137).

IMPLICATION OF DENDRITIC CELLS IN VIRAL BRAIN INFECTIONS

Dendritic Cells as CNS Trojan Horses

DCs display also various roles in viral brain infections notably through their interaction with brain barriers. Indeed, especially mucosal and skin-resident DCs and LCs that are the first line of defense and an immune barrier against a multitude of external pathogens are also unexpectedly key actors of infection spread to the lymph nodes and other distal sites (8). Thereby, they can be viral carriers to the CNS by this inherent role as sentinel. These cells will also locally amplify the inflammatory response that, under certain conditions, can further aggravate infection outcome, and their activation can switch these protective cells to virus-transmitting cells (138, 139). However, there is currently a limited knowledge on the role of these cells in virus evasion, transmission, and systemic dissemination, especially when considering tissue-resident DCs and LCs upon flavivirus skin

infection for instance, and their potential role in viral brain spread.

Concerning the recruitment mechanisms of DCs during viral infection, the release of chemokines or cellular adhesion molecules initiate the process. For instance, WNV- and Japanese encephalitis virus-infected neurons can produce CCL2 (140), and in EAE models, CCL2 released by astrocytes and endothelial cells will lead to chemoattraction of DCs (105). In this same model, immature DCs migrate in the CNS by interaction of α4β1 integrin with endothelial VCAM-1 and then participate in inflammation (106). Ou et al. (141) have also highlighted the role of VCAM-1 in DC recruitment during lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice (**Figure 3**). Furthermore, an important expression and production of pro-inflammatory IL-1α and IL-1β have been reported during neuroinflammation in viral encephalitis (142, 143); IL-1 participates in lymphocyte activation and leukocyte infiltration by increasing CAM expression and other cytokine and chemokine induction. Also, IL-1 can be released by microglia and brain endothelial cells, leading to the enhancement of BBB damage and leukocyte recruitment (**Figure 3**). In that way, studies have demonstrated that during WNV infection, the IL-1 receptor (IL-1R1) participates in the activation of two types of DC populations with APC functions: the lymphoid-derived DCs and migratory DCs (144–146). And following WNV infection, *IL-1R1*-deficient mice have shown fulminant encephalitis (147), indicating a possible correlation between DC recruitment and neurological symptoms *via* IL-1 release. The involvement of BBB permeability during Japanese encephalitis virus infection in $CD11^{hi}$DCs-ablated mice also illustrates the importance of these cells during regulation of brain infections (148). CXCL10 is another important chemokine for leukocyte recruitment in the brain. In HSV-1-infected mouse brains with CXCL10 deletion, there is a lower and even absence of NK cells, $CD8^+$ T cells, and DCs, which translate to important viral loads with consequent CNS defects (149).

An important role of $CD4^+$ T cells and DCs was also demonstrated in the dissemination of varicella zoster virus (VZV) at the BBB (40). Resident DCs and LCs from the skin and mucosa are the main carriers of VZV and VZV viral antigens to the lymph nodes where they can activate T cells. But they can also participate in viral dissemination through a "Trojan horse" mechanism (40). This mechanism has been reported in the case of other infections such as ZIKV brain infection (29) and WNV neuroinfection (20–22) or in a more older case of Maedi–Visna virus dissemination (150). For Nipah virus brain infection, reports establish that the principal access occurs through the transfer of infected DCs from the blood to the CNS (41). Toscana virus (TOSV), an arbovirus from the *Phlebovirus* genus, has been found in DCs from blood circulation of infected animals and humans. It was shown that TOSV-infected DCs notably produce IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)-α, pro-inflammatory cytokines able to dysregulate the BBB. Thus, TOSV-infected DCs can be a pathway to reach the CNS (39). From the BCSFB side, it was shown that HIV-infected monocytes and DCs can allow viral invasion of the brain after CP passage. Thus, studies have proposed that HIV encephalitis emerges mainly by CNS infection through the choroid plexus (151, 152).

Numerous factors are implicated and are key regulators during the recruitment of DCs in the CNS, but the consequences of this recruitment must be discussed.

Dendritic Cells and Brain Antiviral Response

Numbers of studies reveal the role of DCs in neuroinflammation during viral brain infections. DCs have major roles in antiviral responses, particularly through the regulation of T-cell responses. In a mouse model of viral encephalitis, the depletion of peripheral DCs led to a decrease of the viral presentation to $CD8^+$ T cells and a delay in viral clearance from the brain, illustrated by an increasing death rate (103). Moreover, there is a complex role of DCs during HIV infection: they are at the entry site of the virus (mainly in mucosal areas) and can be infected and recruit $CD4^+$ T cells, the main HIV reservoir (80). In the choroid plexus, they can also provide a CNS reservoir in HIV brain infection as mentioned earlier (153). During vesicular stomatitis virus infection, a model of acute encephalitis, DCs are the first responders at the olfactory bulb, the site of infection by this virus. Here, DCs activate and participate in the differentiation of T cells at early steps of neuronal infection (120). Similarly, in the Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease mouse model, T cells are activated against endogenous myelin epitope due to an antigen presentation by DCs directly in the CNS (154). Epstein–Barr virus preferentially infects B cells and immortalizes them, but DCs play a role during this infection. Indeed, they can initiate innate and adaptive immune responses notably by viral antigen detection. Then, DCs can activate NK, $CD4^+$, or $CD8^+$ cells (155). However, a dysregulated $CD8^+$ T-cell response against EBV can be at the origin of CNS impairments, and a link with MS development and recurrence is increasingly suggested (156, 157). From these last examples, DCs are clearly the activator of T-cell responses that will participate in viral clearance but consequently in neuroinflammation.

In response to viral infection and because they express high TLR7, TLR9, and interferon regulatory factor7 (IRF7), pDCs are the main IFN type I producers (158). They recognize PAMPs as viral antigens through their PRRs leading to a production of type I IFN and transcription of ISGs. For instance, when DENV particles or DENV-infected cells are brought into contact with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), the first response is a secretion of IFNα by pDCs (159). It has been shown that direct DC infection by the neurotropic arbovirus Usutu virus (USUV) induces strong IFNα production and, in comparison to WNV-infected DCs, USUV seems to be more sensitive to this type I IFN response. This can partly explain that the percentage of neurological clinical disorder in human following WNV infection is higher than USUV infection (160). Nonetheless, during WNV infection, DCs are mostly found in brain tissue of mouse models where there is a predominance of *IFNα* mRNA (161).

As already noted, DCs have an important function during epileptic seizure, and some viral infection of the CNS can lead to epileptic syndrome such as SARS-CoV-2 infection (162), arbovirus infection (30, 163–165) or during HIV infection and HSV encephalitis. Incidentally, studies reveal that a large proportion of epileptic seizures could be from infectious etiology and that a lot of work needs to be done in that domain (166). Notably, during epilepsy studies on guinea pig brains, the release of neuroinflammatory factors was described at the BBB (129). These are selectins and CAMs, known to attract leukocytes as DCs. In this context, it appears that DCs could be an interesting target for therapy (167).

Finally, various DC phenotypes are recruited depending on the virus and host immune responses. *In vivo*, the mouse hepatitis virus model shows two DC populations of which the most predominant expresses co-stimulatory molecules (CD40, CD80, and CD86). This DC population is responsible for effector $CD8^+$ T-cell activation upon CCL3 modulation (168). The two distinct pDC and cDC populations can be detected in the brain of HSV-1-infected mice, and it was shown that respective CCR knockout models have increased susceptibility to the virus, indicating a complementary role (149). In a cohort study of coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients with neurological impairments, it appears that DCs found in the CSF have a different profile compared to the normal DC subset found in the CSF of healthy controls. They are more susceptible to interaction with CD8 and CD4 T cells and have a critical role during the emergence of neuronal symptoms (169). More generally, each DC subtype can be recruited during CNS infection following specific neuroinflammatory mediators (170).

In these examples, DCs are important to control virus spread in the systemic circulation, but they are also transporters of virus to the CNS or promoters of neuroinflammation. In addition, several DC subpopulations can have a role during the same infection. Hence, the importance of their study to boost antiviral response and control virus spread and neuroinflammation that can have serious and long-term consequences.

DISCUSSION

In conclusion, it appears that 1) viral brain infection can be mediated by several mechanisms and lead to neuroinflammation with various consequences including leukocyte recruitment; 2) as a result, immune cells and particularly DCs can interact with brain barriers and invade the CNS to act against the viral infection; 3) they can also support neuroinflammation; 4) and they can be a "Trojan horse" during virus CNS entry. Indeed, a viral infection can lead to general inflammation as seen with a cytokine storm that can have a deleterious effect on the CNS with chronic neuroinflammation leading to various sequelae (171, 172). This inflammation, as well as by DC innate properties, can lead to recruitment of DCs in the CNS (125), sometimes also carrying the virus itself in the brain (40, 72). Once in the CNS, DCs can directly act against viruses, for example, with IFN production (173), they also contribute to neuroinflammation by T-cell activation for instance (170). For each of these conditions, different DC populations can be recruited (120). However, to tackle these pathological manifestations, we need a better characterization of CNS inflammation following infections. Thus, there is a major need to better dissect the role of each cell type in the establishment of neuroinflammation processes by considering both neuronal and immune cells including DCs. Novel technologies allowing quantitative single-cell mRNA sequencing and proteomic profiling of inflammatory markers may reveal specific DC characteristics linking these cells with the establishment of inflammation and CNS disorders. These data will critically contribute to deepen our current knowledge on brain viral infection. Moreover, DCs are known for their role in priming T-cell responses. It will be, therefore, of interest to further characterize how DC-dependent antiviral T responses can lead to neuroinflammatory pathologies and what are the antigenic drivers of such conditions. Clarifying the role of DCs as major players in neuroinflammation as well as deeper investigations on how they are carrying viruses to distal organs will undoubtedly render the possibility to consider them as a therapeutic target in order to rapidly control the possible pathological outcomes of infections. Gathering more data on metabolic and immunobiological features of DC subsets at sites of primary viral infection will also allow to transpose and adapt novel antiviral therapies, for example, by a topical drug-based application targeting early events of skin DC infection.

Moreover, a flavonoid, apigenin, was proposed to regulate inflammation by a reduction of α4-chain expression by DC and limiting the BBB cross (174). In the context of MS, there are some studies as the use of prestimulation of DC TLR9 to increase neuroinflammation control and immune regulation of the course of the disease in EAE (175). The use of DC-vaccine was also proposed to support the treatment of neurodegenerative disease as Alzheimer's disease (176). Nonetheless, in the context of viral brain infection, there is a lack of evidence for the use of DC in care. Also, the regulation or the blocking of DC entry into the CNS should be explored, for example, to limit viral carrying. Increasing work on different subsets of DCs depending on the viral infection etiology could be a key issue to understand and treat neuroinfections that are considerable public health concerns.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SS conceived the study. OC, GM, FB, YS, and SS wrote the review. PVD corrected and amended the article. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was publicly funded through ANR (the French National Research Agency) under the "Investissements d'avenir" program with the reference ANR-16-IDEX-0006 » and by la Région Occitanie through the PhD funding program with the reference R19068FF.

REFERENCES

1. Koyuncu OO, Hogue IB, Enquist LW. Virus Infections in the Nervous System. *Cell Host Microbe* (2013) 13(4):379–93. doi: 10.1016/j.chom.2013.03.010
2. van den Pol AN. Viral Infection Leading to Brain Dysfunction: More Prevalent Than Appreciated? *Neuron* (2009) 64(1):17–20. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.023
3. Cassady KA, Whitley RJ. *Infections of the Central Nervous System* Vol. 44. New York: Lippincott Williams Wilkins (2004) p. 57–74.
4. Scheld MW, Whitley RJ, Marra CM. *Infections of the Central Nervous System*. Philadelphia, Pennsylvannia, USA:Lippincott Williams & Wilkins (2014).
5. Meeker RB, Williams K, Killebrew DA, Hudson LC. Cell Trafficking Through the Choroid Plexus. *Cell Adh Migr* (2012) 6(5):390–6. doi: 10.4161/cam.21054
6. Marchetti L, Engelhardt B. Immune Cell Trafficking Across the Blood-Brain Barrier in the Absence and Presence of Neuroinflammation. *Vasc Biol* (2020) 2(1):H1–18. doi: 10.1530/VB-19-0033
7. Meeker RB, Bragg DC, Poulton W, Hudson L. Transmigration of Macrophages Across the Choroid Plexus Epithelium in Response to the Feline Immunodeficiency Virus. *Cell Tissue Res* (2012) 347(2):443–55. doi: 10.1007/s00441-011-1301-8
8. Collin M, Bigley V. Human Dendritic Cell Subsets: An Update. *Immunology* (2018) 154(1):3–20. doi: 10.1111/imm.12888
9. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al. Human Tissues Contain CD141 Hi Cross-Presenting Dendritic Cells With Functional Homology to Mouse CD103 + Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* (2012) 37(1):60–73. doi: 10.1016/j.immuni.2012.04.012
10. Riel DV, Verdijk R, Kuiken T. The Olfactory Nerve: A Shortcut for Influenza and Other Viral Diseases Into the Central Nervous System. *J Pathol* (2015) 235(2):277–87. doi: 10.1002/path.4461
11. Tsiang H. Evidence for an Intraaxonal Transport of Fixed and Street Rabies Virus. *J Neuropathol Exp Neurol* (1979) 38(3):286–96. doi: 10.1097/00005072-197905000-00008
12. Potratz M, Zaeck LM, Weigel C, Klein A, Freuling CM, Müller T, et al. Neuroglia Infection by Rabies Virus After Anterograde Virus Spread in Peripheral Neurons. *Acta Neuropathol Commun* (2020) 8(1):1–15. doi: 10.1186/s40478-020-01074-6
13. Gnanadurai CW, Fu ZF. CXCL10 and Blood-Brain Barrier Modulation in Rabies Virus Infection. *Oncotarget* (2016) 7(10):10694–5. doi: 10.18632/oncotarget.7428
14. Esiri MM. Herpes Simplex Encephalitis. An Immunohistological Study of the Distribution of Viral Antigen Within the Brain. *J Neurol Sci* (1982) 54 (2):209–26. doi: 10.1016/0022-510X(82)90183-6
15. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, et al. Differential Localization of Neurons Susceptible to Enterovirus 71 and Poliovirus Type 1 in the Central Nervous System of Cynomolgus Monkeys After Intravenous Inoculation. *J Gen Virol* (2004) 85(10):2981–9. doi: 10.1099/vir.0.79883-0
16. Ohka S, Nihei CI, Yamazaki M, Nomoto A. Poliovirus Trafficking Toward Central Nervous System via Human Poliovirus Receptor-Dependent and-Independent Pathway. *Front Microbiol* (2012) 3(APR):147. doi: 10.3389/fmicb.2012.00147
17. Samuel MA, Wang H, Siddharthan V, Morrey JD, Diamond MS. Axonal Transport Mediates West Nile Virus Entry Into the Central Nervous System and Induces Acute Flaccid Paralysis. *Proc Natl Acad Sci* (2007) 104 (43):17140–5. doi: 10.1073/pnas.0705837104
18. Samuel MA, Diamond MS. Pathogenesis of West Nile Virus Infection: A Balance Between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion. *J Virol* (2006) 80(19):9349–60. doi: 10.1128/JVI.01122-06
19. Fredericksen BL. The Neuroimmune Response to West Nile Virus. *J Neurovirol* (2014) 20(2):113–21. doi: 10.1007/s13365-013-0180-z
20. Roe K, Orillo B, Verma S. West Nile Virus-Induced Cell Adhesion Molecules on Human Brain Microvascular Endothelial Cells Regulate Leukocyte Adhesion and Modulate Permeability of the *In Vitro* Blood-Brain Barrier Model. *PloS One* (2014) 9(7):1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0102598
21. Paul AM, Acharya D, Duty L, Thompson EA, Le L, Stokic DS, et al. Osteopontin Facilitates West Nile Virus Neuroinvasion *via* Neutrophil "Trojan Horse" Transport. *Sci Rep* (2017) 7(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-017-04839-7
22. Wang S, Welte T, McGargill M, Town T, Thompson J, Anderson JF, et al. Drak2 Contributes to West Nile Virus Entry Into the Brain and Lethal Encephalitis. *J Immunol* (2008) 181(3):2084–91. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2084
23. Meinhardt J, Radke J, Dittmayer C, Franz J, Thomas C, Mothes R, et al. Olfactory Transmucosal SARS-CoV-2 Invasion as a Port of Central Nervous System Entry in Individuals With COVID-19. *Nat Neurosci* (2021) 24 (2):168–75. doi: 10.1038/s41593-020-00758-5
24. Salinas S, Simonin Y. Les Atteintes Neurologiques Liées Au SARS-CoV-2 Et Autres Coronavirus Humains. *Med Sci* (2020) 36(8–9):775–82. doi: 10.1051/medsci/2020122
25. Young VA, Rall GF. Making It to the Synapse: Measles Virus Spread in and Among Neurons. In: *Measles*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (2009). p. 3–30. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-70617-5_1.
26. Dittmar S, Harms H, Runkler N, Maisner A, Kim KS, Schneider-Schaulies J. Measles Virus-Induced Block of Transendothelial Migration of T Lymphocytes and Infection-Mediated Virus Spread Across Endothelial Cell Barriers. *J Virol* (2008) 82(22):11273–82. doi: 10.1128/JVI.00775-08
27. Afonso PV, Ozden S, Cumont M-C, Seilhean D, Cartier L, Rezaie P, et al. Alteration of Blood–Brain Barrier Integrity by Retroviral Infection. *PloS Pathog* (2008) 4(11):e1000205. doi: 10.1371/journal.ppat.1000205
28. Papa MP, Meuren LM, Coelho SVA, Lucas CG de O, Mustafá YM, Lemos Matassoli F, et al. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, Without Barrier Disruption. *Front Microbiol* (2017) 8:2557/full(DEC). doi: 10.3389/fmicb.2017.02557/full
29. 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. *Nat Microbiol* (2017) 2(11):1462–70. doi: 10.1038/s41564-017-0035-0
30. Clé M, Eldin P, Briant L, Lannuzel A, Simonin Y, Van De Perre P, et al. Neurocognitive Impacts of Arbovirus Infections. *J Neuroinflammation* (2020) 17(1):1–14. doi : 10.1186/s12974-020-01904-3
31. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, et al. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PloS Pathog* (2008) 4(2):e29. doi: 10.1371/journal.ppat.0040029
32. Schneider H, Weber CE, Schoeller J, Steinmann U, Borkowski J, Ishikawa H, et al. Chemotaxis of T-Cells After Infection of Human Choroid Plexus Papilloma Cells With Echovirus 30 in an *In Vitro* Model of the Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier. *Virus Res* (2012) 170(1–2):66–74. doi: 10.1016/j.virusres.2012.08.019
33. O'Hara BA, Gee GV, Atwood WJ, Haley SA. Susceptibility of Primary Human Choroid Plexus Epithelial Cells and Meningeal Cells to Infection by JC Virus. *J Virol* (2018) 92(8):1–11. doi: 10.1128/JVI.00105-18
34. Chapagain ML, Nerurkar VR. Human Polyomavirus JC (JCV) Infection of Human B Lymphocytes: A Possible Mechanism for JCV Transmigration Across the Blood-Brain Barrier. *J Infect Dis* (2010) 202(2):184–91. doi: 10.1086/653823
35. Miller F, Afonso PV, Gessain A, Ceccaldi PE. Blood-Brain Barrier and Retroviral Infections. *Virulence* (2012) 3(2):222–9. doi: 10.4161/viru.19697
36. Liu Y, Tang XP, McArthur JC, Scott J, Gartner S. Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gp160 Sequences From a Patient With HIV Dementia: Evidence for Monocyte Trafficking Into Brain. *J Neurovirol* (2000) 6(Suppl 1):S70–81.
37. Clay CC, Rodrigues DS, Ho YS, Fallert BA, Janatpour K, Reinhart TA, et al. Neuroinvasion of Fluorescein-Positive Monocytes in Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection. *J Virol* (2007) 81(21):12040–8. doi: 10.1128/JVI.00133-07
38. Tabor-Godwin JM, Ruller CM, Bagalso N, An N, Pagarigan RR, Harkins S, et al. A Novel Population of Myeloid Cells Responding to Coxsackievirus Infection Assists in the Dissemination of Virus Within the Neonatal CNS. *J Neurosci* (2010) 30(25):8676–91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-10.2010

39. Cusi MG, Gandolfo C, Terrosi C, Savellini GG, Belmonte G, Miracco C. Toscana Virus Infects Dendritic and Endothelial Cells Opening the Way for the Central Nervous System. *J Neurovirol* (2016) 22(3):307–15. doi: 10.1007/s13365-015-0395-2
40. Schönrich G, Raftery MJ. Dendritic Cells as Achilles' Heel and Trojan Horse During Varicella Zoster Virus Infection. *Front Microbiol* (2015) 6 (MAY):417. doi: 10.3389/fmicb.2015.00417
41. Tiong V, Shu MH, Wong WF, Abubakar S, Chang LY. Nipah Virus Infection of Immature Dendritic Cells Increases its Transendothelial Migration Across Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Front Microbiol* (2018) 9 (NOV):2747. doi: 10.3389/fmicb.2018.02747
42. Neal JW. Flaviviruses are Neurotropic, But How do They Invade the CNS? *J Infect* (2014) 69:203–15. doi: 10.1016/j.jinf.2014.05.010
43. Salinas S, Schiavo G, Kremer EJ. A Hitchhiker's Guide to the Nervous System: The Complex Journey of Viruses and Toxins. *Nat Rev Microbiol* (2010) 8(9):645–55. doi: 10.1038/nrmicro2395
44. Berth SH. Virus-Induced Neuronal Dysfunction and Degeneration. *Front Biosci* (2009) 14(1):5239. doi: 10.2741/3595
45. Sodeik B. Mechanisms of Viral Transport in the Cytoplasm. *Trends Microbiol* (2000) 8(10):465–72. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01824-2
46. Döhner K, Nagel CH, Sodeik B. Viral Stop-and-Go Along Microtubules: Taking a Ride With Dynein and Kinesins. *Trends Microbiol* (2005) 13 (7):320–7. doi: 10.1016/j.tim.2005.05.010
47. Maximova OA, Bernbaum JG, Pletnev AG. West Nile Virus Spreads Transsynaptically Within the Pathways of Motor Control: Anatomical and Ultrastructural Mapping of Neuronal Virus Infection in the Primate Central Nervous System. *PloS Negl Trop Dis* (2016) 10(9):1–23. doi: 10.1371/journal.pntd.0004980
48. Solomon T. Neurological Aspects of Tropical Disease: Japanese Encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2000) 68(4):405–15. doi: 10.1136/jnnp.68.4.405
49. Shives KD, Tyler KL, Beckham JD. Molecular Mechanisms of Neuroinflammation and Injury During Acute Viral Encephalitis. *J Neuroimmunol* (2017) 308:102–11. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.03.006
50. Keaney J, Campbell M. The Dynamic Blood-Brain Barrier. *FEBS J* (2015) 282 (21):4067–79. doi: 10.1111/febs.13412
51. Tietz S, Engelhardt B. Brain Barriers: Crosstalk Between Complex Tight Junctions and Adherens Junctions. *J Cell Biol* (2015) 209(4):493–506. doi: 10.1083/jcb.201412147
52. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-Endothelial Interactions at the Blood-Brain Barrier. *Nat Rev Neurosci* (2006) 7(1):41–53. doi: 10.1038/nrn1824
53. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and Function of the Blood-Brain Barrier. *Neurobiol Dis* (2010) 37(1):13–25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
54. Rustenhoven J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends Pharmacol Sci* (2017) 38(3):291–304. doi: 10.1016/j.tips.2016.12.001
55. Liou ML, Hsu CY. Japanese Encephalitis Virus is Transported Across the Cerebral Blood Vessels by Endocytosis in Mouse Brain. *Cell Tissue Res* (1998) 293(3):389–94. doi: 10.1007/s004410051130
56. Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S, Nerurkar VR. Reversal of West Nile Virus-Induced Blood–Brain Barrier Disruption and Tight Junction Proteins Degradation by Matrix Metalloproteinases Inhibitor. *Virology* (2010) 397 (1):130–8. doi: 10.1016/j.virol.2009.10.036
57. Daniels BP, Holman DW, Cruz-Orengo L, Jujjavarapu H, Durrant DM, Klein RS. Viral Pathogen-Associated Molecular Patterns Regulate Blood-Brain Barrier Integrity *via* Competing Innate Cytokine Signals. *MBio* (2014) 5(5):e01476-14. doi: 10.1128/mBio.01476-14
58. Marques F, Sousa JC, Brito MA, Pahnke J, Santos C, Correia-Neves M, et al. The Choroid Plexus in Health and in Disease: Dialogues Into and Out of the Brain. *Neurobiol Dis* (2017) 107:32–40. doi: 10.1016/j.nbd.2016.08.011
59. Schwerk C, Tenenbaum T, Kim KS, Schroten H. The Choroid Plexus—a Multi-Role Player During Infectious Diseases of the CNS. *Front Cell Neurosci* (2015) 9(March):80. doi: 10.3389/fncel.2015.00080
60. Kim J, Alejandro B, Hetman M, Hattab EM, Joiner J, Schroten H, et al. Zika Virus Infects Pericytes in the Choroid Plexus and Enters the Central Nervous System Through the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *PloS Pathog* (2020) 16(5):e1008204. doi: 10.1371/journal.ppat.1008204
61. Li W, Chen D, Liu N, Luan Y, Zhu S, Wang H. Modulation of Lymphatic Transport in the Central Nervous System. *Theranostics* (2022) 12(3):1117–31. doi: 10.7150/thno.66026
62. Lamers SL, Rose R, Ndhlovu LC, Nolan DJ, Salemi M, Maidji E, et al. The Meningeal Lymphatic System: A Route for HIV Brain Migration? *J Neurovirol* (2016) 22(3):275–81. doi: 10.1007/s13365-015-0399-y
63. Johnston M, Zakharov A, Papaiconomou C, Salmasi G, Armstrong D. Evidence of Connections Between Cerebrospinal Fluid and Nasal Lymphatic Vessels in Humans, Non-Human Primates and Other Mammalian Species. *Cerebrospinal Fluid Res* (2004) 1:1–13. doi: 10.1186/1743-8454-1-2
64. Walter BA, Valera VA, Takahashi S, Ushiki T. The Olfactory Route for Cerebrospinal Fluid Drainage Into the Peripheral Lymphatic System. *Neuropathol Appl Neurobiol* (2006) 32(4):388–96. doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00737.x
65. McGavern DB, Kang SS. Illuminating Viral Infections in the Nervous System. *Nat Rev Immunol* (2011) 11(5):318–29. doi: 10.1038/nri2971
66. Spudich S, Gonzalez-Scarano F. HIV-1-Related Central Nervous System Disease: Current Issues in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012) 2(6):a007120–a007120. doi: 10.1101/cshperspect.a007120
67. Canet G, Dias C, Gabelle A, Simonin Y, Gosselet F, Marchi N, et al. HIV Neuroinfection and Alzheimer's Disease: Similarities and Potential Links? *Front Cell Neurosci* (2018) 12(September):307. doi: 10.3389/fncel.2018.00307
68. Soung A, Klein RS. Viral Encephalitis and Neurologic Diseases: Focus on Astrocytes. *Trends Mol Med* (2018) 24(11):950–62. doi: 10.1016/j.molmed.2018.09.001
69. Diamond MS, Klein RS. West Nile Virus: Crossing the Blood-Brain Barrier. *Nat Med* (2004) 10(12):1294–5. doi: 10.1038/nm1204-1294
70. Stamatovic S, Keep R, Andjelkovic A. Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to "Open" the Blood Brain Barrier. *Curr Neuropharmacol* (2008) 6 (3):179–92. doi: 10.2174/157015908785777210
71. Spindler KR, Hsu TH. Viral Disruption of the Blood-Brain Barrier. *Trends Microbiol* (2012) 20(6):282–90. doi: 10.1016/j.tim.2012.03.009
72. Mustafá YM, Meuren LM, Coelho SVA, de Arruda LB. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. *Front Microbiol* (2019) 10(MAR):525. doi: 10.3389/fmicb.2019.00525
73. Kooij G, Kopplin K, Blasig R, Stuiver M, Koning N, Goverse G, et al. Disturbed Function of the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Aggravates Neuro-Inflammation. *Acta Neuropathol* (2014) 128(2):267–77. doi: 10.1007/s00401-013-1227-1
74. Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. Disproportionate Recruitment of CD8+ T Cells Into the Central Nervous System by Professional Antigen-Presenting Cells. *Am J Pathol* (1999) 154(2):481–94. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65294-7
75. Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular Spaces and the Two Steps to Neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* (2008) 67(12):1113–21. doi: 10.1097/NEN.0b013e31818f9ca8
76. Savarin C, Stohlman SA, Atkinson R, Ransohoff RM, Bergmann CC. Monocytes Regulate T Cell Migration Through the Glia Limitans During Acute Viral Encephalitis. *J Virol* (2010) 84(10):4878–88. doi: 10.1128/JVI.00051-10
77. Daniels TE. Human Mucosal Langerhans Cells: Postmortem Identification of Regional Variations in Oral Mucosa. *J Invest Dermatol* (1984) 82(1):21–4. doi: 10.1111/1523-1747.ep12259038
78. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity* (2019) 50(1):37–50. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.027
79. Alculumbre S, Raieli S, Hoffmann C, Chelbi R, Danlos F-X, Soumelis V. Plasmacytoid Pre-Dendritic Cells (pDC): From Molecular Pathways to Function and Disease Association. *Semin Cell Dev Biol* (2019) 86:24–35. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.014
80. Rhodes JW, Tong O, Harman AN, Turville SG. Human Dendritic Cell Subsets, Ontogeny, and Impact on HIV Infection. *Front Immunol* (2019) 10:1088/full(May). doi: 10.3389/fimmu.2019.01088/full

81. Villani A, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals New Types of Human Blood Dendritic Cells, Monocytes, and Progenitors. *Science (80-)* (2017) 356(6335):eaah4573. doi: 10.1126/science.aah4573
82. See P, Dutertre C-A, Chen J, Günther P, McGovern N, Irac SE, et al. Mapping the Human DC Lineage Through the Integration of High-Dimensional Techniques. *Science (80-)* (2017) 356(6342):eaag3009. doi: 10.1126/science.aag3009
83. Mass E, Ballesteros I, Farlik M, Halbritter F, Gunther P, Crozet L, et al. Specification of Tissue-Resident Macrophages During Organogenesis. *Science (80-)* (2016) 353(6304):aaf4238–aaf4238. doi: 10.1126/science.aaf4238
84. Guilliams M, Dutertre C, Scott CL, McGovern N, Sichien D, Chakarov S, et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells Across Tissues and Species. *Immunity* (2016) 45(3):669–84. doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.015
85. Wu X, Briseño CG, Durai V, Albring JC, Haldar M, Bagadia P, et al. Maf B Lineage Tracing to Distinguish Macrophages From Other Immune Lineages Reveals Dual Identity of Langerhans Cells. *J Exp Med* (2016) 213(12):2553–65. doi: 10.1084/jem.20160600
86. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science (80-)* (2010) 327(5966):656–61. doi: 10.1126/science.1178331
87. Doebel T, Voisin B, Nagao K. Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol* (2017) 38(11):817–28. doi: 10.1016/j.it.2017.06.008
88. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and Ultrastructural Characterization of Langerhans Cells and a Novel, Inflammatory Dendritic Epidermal Cell (IDEC) Population in Lesional Skin of Atopic Eczema. *J Invest Dermatol* (1996) 106(3):446–53. doi: 10.1111/1523-1747.ep12343596
89. Cheong C, Matos I, Choi J, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial Stimulation Fully Differentiates Monocytes to DC-SIGN/CD209+ Dendritic Cells for Immune T Cell Areas. *Cell* (2010) 143(3):416–29. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.039
90. Eisenbarth SC. Dendritic Cell Subsets in T Cell Programming: Location Dictates Function. *Nat Rev Immunol* (2019) 19(2):89–103. doi: 10.1038/s41577-018-0088-1
91. Rhodes JW, Botting RA, Bertram KM, Vine EE, Rana H, Baharlou H, et al. Human Anogenital Monocyte-Derived Dendritic Cells and Langerin+Cdc2 are Major HIV Target Cells. *Nat Commun* (2021) 12(1):2147(1-15). doi: 10.1038/s41467-021-22375-x
92. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, et al. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* (2000) 18(1):767–811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767
93. Nasr N, Lai J, Botting RA, Mercier SK, Harman AN, Kim M, et al. Inhibition of Two Temporal Phases of HIV-1 Transfer From Primary Langerhans Cells to T Cells: The Role of Langerin. *J Immunol* (2014) 193(5):2554–64. doi: 10.4049/jimmunol.1400630
94. Bertram KM, Botting RA, Baharlou H, Rhodes JW, Rana H, Graham JD, et al. Identification of HIV Transmitting CD11c+ Human Epidermal Dendritic Cells. *Nat Commun* (2019) 10(1): 2759(1-15). . doi: 10.1038/s41467-019-10697-w
95. Pollara G, Kwan A, Newton PJ, Handley ME, Chain BM, Katz DR. Dendritic Cells in Viral Pathogenesis: Protective or Defective? *Int J Exp Pathol* (2005) 86(4):187–204. doi: 10.1111/j.0959-9673.2005.00440.x
96. Sprecher E, Becker Y. Langerhans Cell Density and Activity in Mouse Skin and Lymph Nodes Affect Herpes Simplex Type 1 (HSV-1) Pathogenicity. *Arch Virol* (1989) 107(3–4):191–205. doi: 10.1007/BF01317916
97. Soto JA, Gálvez NMS, Andrade CA, Pacheco GA, Bohmwald K, Berrios RV, et al. The Role of Dendritic Cells During Infections Caused by Highly Prevalent Viruses. *Front Immunol* (2020) 11(July):1513. doi: 10.3389/fimmu.2020.01513
98. Lenza MP, Atxabal U, Oyenarte I, Jiménez-Barbero J, Ereño-Orbea J. Current Status on Therapeutic Molecules Targeting Siglec Receptors. *Cells* (2020) 9(12):1–19. doi: 10.3390/cells9122691
99. Valverde P, Martínez JD, Cañada FJ, Ardá A, Jiménez-Barbero J. Molecular Recognition in C-Type Lectins: The Cases of DC-SIGN, Langerin, MGL, and L-Sectin. *ChemBioChem* (2020) 21(21):2999–3025. doi: 10.1002/cbic.202000238
100. Mnich ME, van Dalen R, van Sorge NM. C-Type Lectin Receptors in Host Defense Against Bacterial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* (2020) 10 (July):309. doi: 10.3389/fcimb.2020.00309
101. Carbaugh DL, Lazear HM. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. *J Virol* (2020) 94(11):1–10. doi: 10.1128/JVI.00104-20
102. Colton CA. Immune Heterogeneity in Neuroinflammation: Dendritic Cells in the Brain. *J Neuroimmune Pharmacol* (2013) 8(1):145–62. doi: 10.1007/s11481-012-9414-8
103. Sagar D, Foss C, El Baz R, Pomper MG, Khan ZK, Jain P. Mechanisms of Dendritic Cell Trafficking Across the Blood–brain Barrier. *J Neuroimmune Pharmacol* (2012) 7(1):74–94. doi: 10.1007/s11481-011-9302-7
104. Ransohoff RM, Takeshita Y. Inflammatory Cell Trafficking Across the Blood–Brain Barrier: Chemokine Regulation and *In Vitro* Models. *Immunol Rev* (2012) 248:228–39. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01127.x
105. Sagar D, Lamontagne A, Foss CA, Khan ZK, Pomper MG, Jain P. Dendritic Cell CNS Recruitment Correlates With Disease Severity in EAE *via* CCL2 Chemotaxis at the Blood–Brain Barrier Through Paracellular Transmigration and ERK Activation. *J Neuroinflamm* (2012) 9(1):747. doi: 10.1186/1742-2094-9-245
106. Jain P, Coisne C, Enzmann G, Rottapel R, Engelhardt B. α 4 β 1 Integrin Mediates the Recruitment of Immature Dendritic Cells Across the Blood-Brain Barrier During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* (2010) 184(12):7196–206. doi: 10.4049/jimmunol.0901404
107. Zozulya AL, Reinke E, Baiu DC, Karman J, Sandor M, Fabry Z. Dendritic Cell Transmigration Through Brain Microvessel Endothelium Is Regulated by MIP-1α Chemokine and Matrix Metalloproteinases. *J Immunol* (2007) 178(1):520–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.1.520
108. Hatterer E, Touret M, Belin MF, Honnorat J, Nataf S. Cerebrospinal Fluid Dendritic Cells Infiltrate the Brain Parenchyma and Target the Cervical Lymph Nodes Under Neuroinflammatory Conditions. *PloS One* (2008) 3 (10): e3321 (1-15). doi: 10.1371/journal.pone.0003321
109. Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M, Vuaillat C, Malcus C, Belin MF, et al. How to Drain Without Lymphatics? Dendritic Cells Migrate From the Cerebrospinal Fluid to the B-Cell Follicles of Cervical Lymph Nodes. *Blood* (2006) 107(2):806–12. doi: 10.1182/blood-2005-01-0154
110. Pashenkov M, Link H, Lowenstein PR. Dendritic Cells and Immune Responses in the Central Nervous System (Multiple Letters). *Trends Immunol* (2002) 23(2):69–70. doi: 10.1016/S1471-4906(01)02114-7
111. Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, St. John JA, Ekberg JAK, et al. Pathogens Penetrating the Central Nervous System: Infection Pathways and the Cellular and Molecular Mechanisms of Invasion. *Clin Microbiol Rev* (2014) 27(4):691–726. doi: 10.1128/CMR.00118-13
112. Ransohoff RM, Engelhardt B. The Anatomical and Cellular Basis of Immune Surveillance in the Central Nervous System. *Nat Rev Immunol* (2012) 12 (9):623–35. doi: 10.1038/nri3265
113. McMenamin PG. Distribution and Phenotype of Dendritic Cells and Resident Tissue Macrophages in the Dura Mater, Leptomeninges, and Choroid Plexus of the Rat Brain as Demonstrated in Wholemount Preparations. *J Comp Neurol* (1999) 405(4):553–62. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990322)405:4%3C553::AID-CNE8%3E3.0.CO;2-6
114. Bulloch K, Miller MM, Gal-Toth J, Milner TA, Gottfried-Blackmore A, Waters EM, et al. CD11c/EYFP Transgene Illuminates a Discrete Network of Dendritic Cells Within the Embryonic, Neonatal, Adult, and Injured Mouse Brain. *J Comp Neurol* (2008) 508(5):687–710. doi: 10.1002/cne.21668
115. Croese T, Castellani G, Schwartz M. Immune Cell Compartmentalization for Brain Surveillance and Protection. *Nat Immunol* (2021) 22(9):1083–92. doi: 10.1038/s41590-021-00994-2
116. Rustenhoven J, Drieu A, Mamuladze T, de Lima KA, Dykstra T, Wall M, et al. Functional Characterization of the Dural Sinuses as a Neuroimmune Interface. *Cell* (2021) 184(4):1000–1016.e27. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.040
117. Anandasabapathy N, Victora GD, Meredith M, Feder R, Dong B, Kluger C, et al. Flt3L Controls the Development of Radiosensitive Dendritic Cells in the Meninges and Choroid Plexus of the Steady-State Mouse Brain. *J Exp Med* (2011) 208(18):1695–705. doi: 10.1084/jem.20102657

118. Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS Myeloid DCs Presenting Endogenous Myelin Peptides "Preferentially" Polarize CD4+ TH-17 Cells in Relapsing EAE. *Nat Immunol* (2007) 8(2):172–80. doi: 10.1038/ni1430
119. Miller SD, Mcmahon EJ, Schreiner B, Bailey SL. Antigen Presentation in the CNS by Myeloid Dendritic Cells Drives Progression of Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* (2007) 1103(1):179–91. doi: 10.1196/annals.1394.023
120. D'Agostino PM, Gottfried-Blackmore A, Anandasabapathy N, Bulloch K. Brain Dendritic Cells: Biology and Pathology. *Acta Neuropathol* (2012) 124 (5):599–614. doi: 10.1007/s00401-012-1018-0
121. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, et al. Dendritic Cells Permit Immune Invasion of the CNS in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *Nat Med* (2005) 11(3):328–34. doi: 10.1038/nm1197
122. Hesske L, Vincenzetti C, Heikenwalder M, Prinz M, Reith W, Fontana A, et al. Induction of Inhibitory Central Nervous System-Derived and Stimulatory Blood-Derived Dendritic Cells Suggests a Dual Role for Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Central Nervous System Inflammation. *Brain* (2010) 133(6):1637–54. doi: 10.1093/brain/awq081
123. Press R, Nennesmo I, Kouwenhoven M, Huang Y-M, Link H, Pashenkov M. Dendritic Cells in the Cerebrospinal Fluid and Peripheral Nerves in Guillain-Barrè Syndrome and Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* (2005) 159(1–2):165–76. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.09.020
124. Wang YZ, Feng XG, Wang Q, Xing CY, Shi QG, Kong QX, et al. Increased Plasmacytoid Dendritic Cells in Guillain-Barrè Syndrome. *J Neuroimmunol* (2015) 283:1–6. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.03.019
125. De Laere M, Berneman ZN, Cools N. To the Brain and Back: Migratory Paths of Dendritic Cells in Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* (2018) 77 (3):178–92. doi: 10.1093/jnen/nlx114
126. Felger JC, Abe T, Kaunzner UW, Gottfried-Blackmore A, Gal-Toth J, McEwen BS, et al. Brain Dendritic Cells in Ischemic Stroke: Time Course, Activation State, and Origin. *Brain Behav Immun* (2010) 24(5):724–37. doi: 10.1016/j.bbi.2009.11.002
127. Newman TA, Galea I, Van Rooijen N, Perry VH. Blood-Derived Dendritic Cells in an Acute Brain Injury. *J Neuroimmunol* (2005) 166(1–2):167–72. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.04.026
128. Vezzani A. Epilepsy and Inflammation in the Brain: Overview and Pathophysiology. *Epilepsy Curr* (2014) 14(1 Suppl):3–7. doi: 10.5698/1535-7511-14.s2.3
129. Librizzi L, Regondi MC, Pastori C, Frigerio S, Frassoni C, De Curtis M. Expression of Adhesion Factors Induced by Epileptiform Activity in the Endothelium of the Isolated Guinea Pig Brain *In Vitro*. *Epilepsia* (2007) 48 (4):743–51. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01047.x
130. Li X-W, Yang F, Wang Y-G, Wang J-C, Ma L, Jiang W. Brain Recruitment of Dendritic Cells Following Li-Pilocarpine Induced Status Epilepticus in Adult Rats. *Brain Res Bull* (2013) 91:8–13. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.11.007
131. Rhodes RH, Lehman RM, Wu BY, Roychowdhury S. Focal Chronic Inflammatory Epileptic Encephalopathy in a Patient With Malformations of Cortical Development, With a Review of the Spectrum of Chronic Inflammatory Epileptic Encephalopathy. *Epilepsia* (2007) 48(6):1184–202. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01034.x
132. Ludewig P, Gallizioli M, Urra X, Behr S, Brait VH, Gelderblom M, et al. Dendritic Cells in Brain Diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* (2016) 1862(3):352–67. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.11.003
133. Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gâtel D, Tardieux I. CD11c- and CD11b-Expressing Mouse Leukocytes Transport Single Toxoplasma Gondii Tachyzoites to the Brain. *Blood* (2006) 107(1):309–16. doi: 10.1182/blood-2005-02-0666
134. Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A. Induction of Dendritic Cell Migration Upon Toxoplasma Gondii Infection Potentiates Parasite Dissemination. *Cell Microbiol* (2006) 8(10):1611–23. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x
135. Fischer H-G, Bonifas U, Reichmann G. Phenotype and Functions of Brain Dendritic Cells Emerging During Chronic Infection of Mice With Toxoplasma Gondii. *J Immunol* (2000) 164(9):4826–34. doi: 10.4049/jimmunol.164.9.4826
136. Fischer H-G, Reichmann G. Brain Dendritic Cells and Macrophages/Microglia in Central Nervous System Inflammation. *J Immunol* (2001) 166 (4):2717–26. doi: 10.4049/jimmunol.166.4.2717
137. van de Beek D, Brouwer MC, Koedel U, Wall EC. Community-Acquired Bacterial Meningitis. *Lancet* (2021) 6736(21):1–13. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00883-7
138. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The Trinity of COVID-19: Immunity, Inflammation and Intervention. *Nat Rev Immunol* (2020) 20 (6):363–74. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8
139. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet AG, Dubuisson A, Derosa L, et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe From Mild COVID-19. *Cell* (2020) 182(6):1401–1418.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.002
140. Terry RL, Getts DR, Deffrasnes C, van Vreden C, Campbell IL, King NJC. Inflammatory Monocytes and the Pathogenesis of Viral Encephalitis. *J Neuroinflamm* (2012) 9(1):776. doi: 10.1186/1742-2094-9-270
141. Ou R, Zhang M, Huang L, Flavell RA, Koni PA, Moskophidis D. Regulation of Immune Response and Inflammatory Reactions Against Viral Infection by VCAM-1. *J Virol* (2008) 82(6):2952–65. doi: 10.1128/JVI.02191-07
142. Basu A, Krady JK, Levison SW. Interleukin-1: A Master Regulator of Neuroinflammation. *J Neurosci Res* (2004) 78(2):151–6. doi: 10.1002/jnr.20266
143. Kanneganti TD. Central Roles of NLRs and Inflammasomes in Viral Infection. *Nat Rev Immunol* (2010) 10(10):688–98. doi: 10.1038/nri2851
144. Liu K, Nussenzweig MC. Development and Homeostasis of Dendritic Cells. *Eur J Immunol* (2010) 40(8):2099–102. doi: 10.1002/eji.201040501
145. Belz GT, Nutt SL. Transcriptional Programming of the Dendritic Cell Network. *Nat Rev Immunol* (2012) 12(2):101–13. doi: 10.1038/nri3149
146. Durrant DM, Robinette ML, Klein RS. IL-1R1 is Required for Dendritic Cell-Mediated T Cell Reactivation Within the CNS During West Nile Virus Encephalitis. *J Exp Med* (2013) 210(3):503–16. doi: 10.1084/jem.20121897
147. McCandless EE, Budde M, Lees JR, Dorsey D, Lyng E, Klein RS. IL-1r Signaling Within the Central Nervous System Regulates CXCL12 Expression at the Blood-Brain Barrier and Disease Severity During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* (2009) 183(1):613–20. doi: 10.4049/jimmunol.0802258
148. Kim JH, Hossain FMA, Patil AM, Choi JY, Kim SB, Uyangaa E, et al. Ablation of CD11c(hi) Dendritic Cells Exacerbates Japanese Encephalitis by Regulating Blood-Brain Barrier Permeability and Altering Tight Junction/Adhesion Molecules. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* (2016) 48:22–32. doi: 10.1016/j.cimid.2016.07.007
149. Wuest TR, Carr DJJ. Dysregulation of CXCR3 Signaling Due to CXCL10 Deficiency Impairs the Antiviral Response to Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J Immunol* (2008) 181(11):7985–93. doi: 10.4049/jimmunol.181.11.7985
150. Peluso R, Haase A, Stowring L, Edwards M, Ventura P. A Trojan Horse Mechanism for the Spread of Visna Virus in Monocytes. *Virology* (1985) 147 (1):231–6. doi: 10.1016/0042-6822(85)90246-6
151. Falangola MF, Hanly A, Galvao-Castro B, Petito CK. HIV Infection of Human Choroid Plexus. *J Neuropathol Exp Neurol* (1995) 54(4):497–503. doi: 10.1097/00005072-199507000-00003
152. Petito CK, Chen H, Mastri AR, Torres-Munoz J, Roberts B, Wood C. HIV Infection of Choroid Plexus in AIDS and Asymptomatic HIV-Infected Patients Suggests That the Choroid Plexus may be a Reservoir of Productive Infection. *J Neurovirol* (1999) 5(6):670–7. doi: 10.3109/13550289909021295
153. Hanly A, Petito CK. HLA-DR-Positive Dendritic Cells of the Normal Human Choroid Plexus: A Potential Reservoir of HIV in the Central Nervous System. *Radiology* (1998) 208(1):278. doi: 10.1016/S0046-8177(98)90395-1
154. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope Spreading Initiates in the CNS in Two Mouse Models of Multiple Sclerosis. *Nat Med* (2005) 11(3):335–9. doi: 10.1038/nm1202
155. Münz C. Dendritic Cells During Epstein Barr Virus Infection. *Front Microbiol* (2014) 5(JUN). doi: 10.3389/fmicb.2014.00308
156. Veroni C, Aloisi F. The CD8 T Cell-Epstein-Barr Virus-B Cell Trialogue: A Central Issue in Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Front Immunol* (2021) 12 (July):665718. doi: 10.3389/fimmu.2021.665718

157. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal Analysis Reveals High Prevalence of Epstein-Barr Virus Associated With Multiple Sclerosis. *Science* 375(6578):296–301 (2022) 8222(January). doi: 10.1126/science.abj8222
158. Swiecki M, Colonna M. The Multifaceted Biology of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(8):471–85. doi: 10.1038/nri3865
159. Décembre E, Assil S, Hillaire MLB, Dejnirattisai W, Mongkolsapaya J, Screaton GR, et al. Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PloS Pathog* (2014) 10(10):e1004434. doi: 10.1371/journal.ppat.1004434
160. Cacciotti G, Caputo B, Selvaggi C, la Sala A, Vitiello L, Diallo D, et al. Variation in Interferon Sensitivity and Induction Between Usutu and West Nile (Lineages 1 and 2) Viruses. *Virology* (2015) 485:189–98. doi: 10.1016/j.virol.2015.07.015
161. Bréhin A-C, Mouriès J, Frenkiel M-P, Dadaglio G, Desprès P, Lafon M, et al. Dynamics of Immune Cell Recruitment During West Nile Encephalitis and Identification of a New CD19 + B220 – BST-2 + Leukocyte Population. *J Immunol* (2008) 180(10):6760–7. doi: 10.4049/jimmunol.180.10.6760
162. Helms J, Kremer S, Merdji H, Clere-Jehl R, Schenck M, Kummerlen C, et al. Neurologic Features in Severe SARS-CoV-2 Infection. *N Engl J Med* (2020) 382(23):2268–70. doi: 10.1056/NEJMc2008597
163. Clé M, Constant O, Barthelemy J, Desmetz C, Martin MF, Lapeyre L, et al. Differential Neurovirulence of Usutu Virus Lineages in Mice and Neuronal Cells. *J Neuroinflammation* (2021) 18(1):1–22. doi: 10.1186/s12974-020-02060-4
164. Bogovic P, Lotric-Furlan S, Strle F. What Tick-Borne Encephalitis may Look Like: Clinical Signs and Symptoms. *Travel Med Infect Dis* (2010) 8(4):246–50. doi: 10.1016/j.tmaid.2010.05.011
165. Ayhan N, Charrel RN. An Update on Toscana Virus Distribution, Genetics, Medical and Diagnostic Aspects. *Clin Microbiol Infect* (2020) 26(8):1017–23. doi: 10.1016/j.cmi.2019.12.015
166. Singh G, Prabhakar S. The Association Between Central Nervous System (CNS) Infections and Epilepsy: Epidemiological Approaches and Microbiological and Epileptological Perspectives. *Epilepsia* (2008) 49 (SUPPL.6):2–7. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01749.x
167. Hussain A, Rafeeq H, Munir N, Jabeen Z, Afsheen N, Rehman K, et al. Dendritic Cell–Targeted Therapies to Treat Neurological Disorders. *Mol Neurobiol* (2021) 59(1):603-19. doi: 10.1007/s12035-021-02622-4
168. Trifilo MJ, Lane TE. The CC Chemokine Ligand 3 Regulates CD11c +CD11b +Cd8α - Dendritic Cell Maturation and Activation Following Viral Infection of the Central Nervous System: Implications for a Role in T Cell Activation. *Virology* (2004) 327(1):8–15. doi: 10.1016/j.virol.2004.06.027
169. Song E, Bartley CM, Chow RD, Ngo TT, Jiang R, Zamecnik CR, et al. Divergent and Self-Reactive Immune Responses in the CNS of COVID-19 Patients With Neurological Symptoms. *Cell Rep Med* (2021) 2(5):100288. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100288
170. Clarkson BD, Héninger E, Harris MG, Lee J, Sandor M, Fabry Z. Innate-Adaptive Crosstalk: How Dendritic Cells Shape Immune Responses in the CNS. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Springer; Berlin, Germany) (2012). p. 309–33. doi: 10.1007/978-1-4614-0106-3_18
171. Thepmankorn P, Bach J, Lasfar A, Zhao X, Souayah S, Chong ZZ, et al. Cytokine Storm Induced by SARS-CoV-2 Infection: The Spectrum of its Neurological Manifestations. *Cytokine* (2021) 138:155404 (1-11). Academic Press. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155404
172. Sy M, Kitazawa M, Medeiros R, Whitman L, Cheng D, Lane TE, et al. Inflammation Induced by Infection Potentiates Tau Pathological Features in Transgenic Mice. *Am J Pathol* (2011) 178(6):2811–22. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.012
173. Varani S, Gelsomino F, Bartoletti M, Viale P, Mastroianni A, Briganti E, et al. Meningitis Caused by Toscana Virus is Associated With Strong Antiviral Response in the CNS and Altered Frequency of Blood Antigen-Presenting Cells. *Viruses* (2015) 7(11):5831–43. doi: 10.3390/v7112909
174. Ginwala R, McTish E, Raman C, Singh N, Nagarkatti M, Nagarkatti P, et al. Apigenin, a Natural Flavonoid, Attenuates EAE Severity Through the Modulation of Dendritic Cell and Other Immune Cell Functions. *J Neuroimmune Pharmacol* (2016) 11(1):36–47. doi: 10.1007/s11481-015-9617-x
175. Letscher H, Agbogan VA, Korniotis S, Gastineau P, Tejerina E, Gras C, et al. Toll-Like Receptor-9 Stimulated Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors Suppress Autoimmune Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *Sci Rep* (2021) 11(1):1–17. doi: 10.1038/s41598-021-84023-0
176. Sabahi M, Joshaghanian A, Dolatshahi M, Jabbari P, Rahmani F, Rezaei N. Modification of Glial Cell Activation Through Dendritic Cell Vaccination: Promises for Treatment of Neurodegenerative Diseases. *J Mol Neurosci* (2021) 71(7):1410–24. doi: 10.1007/s12031-021-01818-6

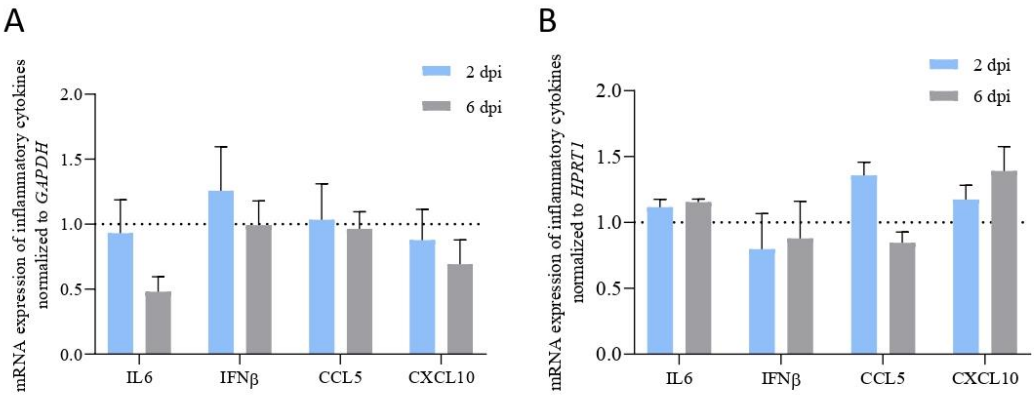
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

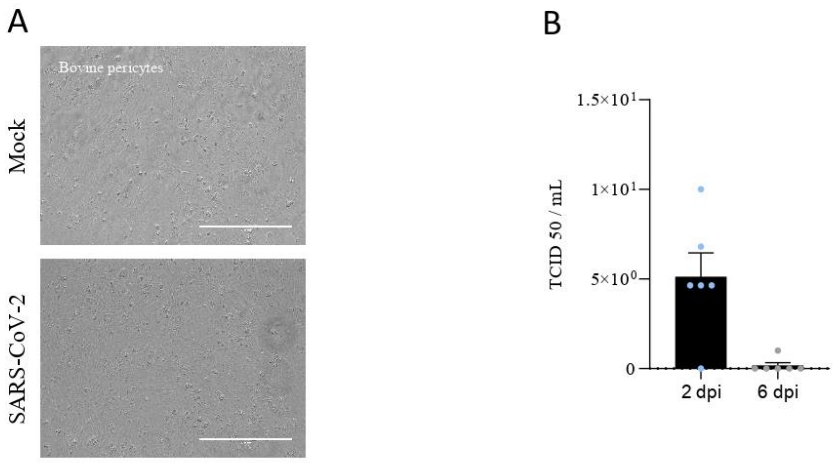
Copyright © 2022 Constant, Maarifi, Blanchet, Van de Perre, Simonin and Salinas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 2 Suppléments article portant sur le SARS-CoV-2

Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Annexe 3 Suppléments article de comparaison lignées USUV

Supplemental Figures Legends

Supplemental Figure 1. Two USUV EU2 strains induce a specific CPE and persistent viral replication in astrocytes

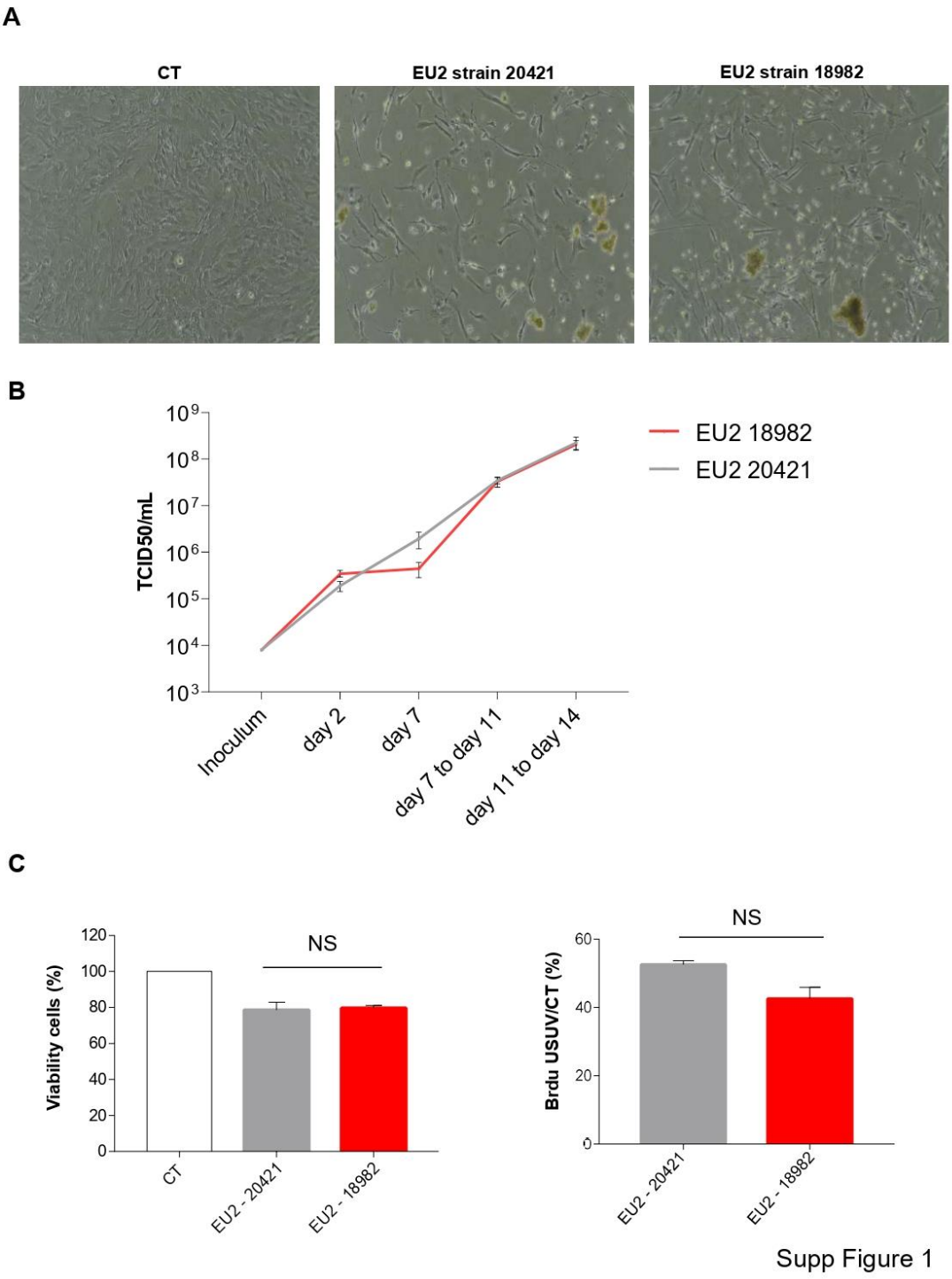
Human astrocyte cells were infected with two strains from EU2 lineage (20421 and 18982) at a MOI of 0,1. (A) Bright light images of human astrocytes infected at 7 dpi show similar atypical CPE with the two strains. (B) Supernatants from infected astrocyte cells (MOI 0,1) were collected at 2, 7, and 11 dpi and subjected to TCID50 measurement on Vero cells. EU2 strains have similar replication and persistence over time. Results are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiment. (C) Cellular proliferation (7 dpi) and apoptosis (4 dpi) cells measured respectively with BrdU and MTT are affected similarly with the two EU2 isolates. NS : Not significant.

Supplemental Figure 2. Differential CPE in USUV-infected murine microglia and neurons cells

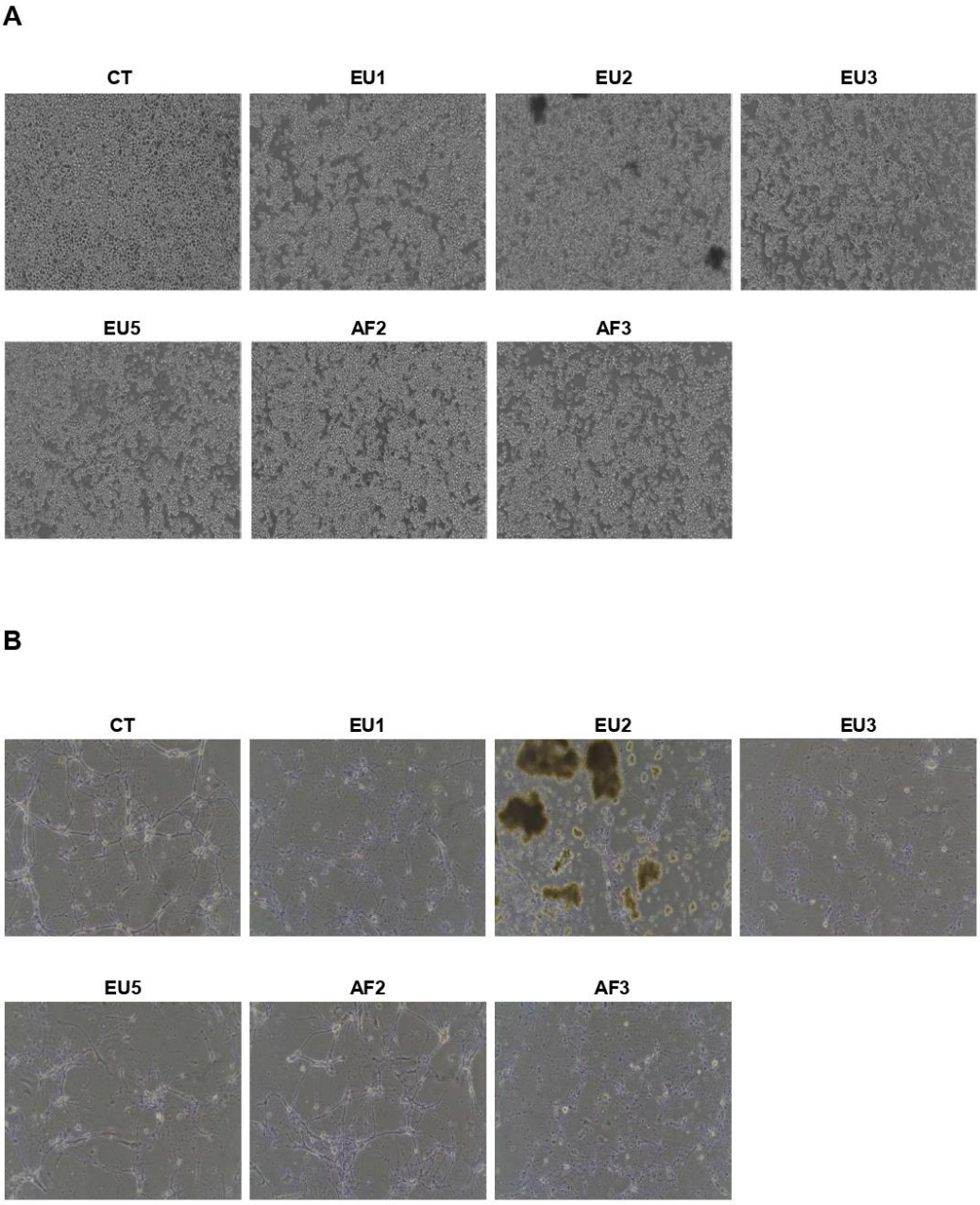
(A) Bright light images of infected murine microglial cells at 5 dpi and murine neurons (B) at 4 dpi (MOI of 0,1) showed specific CPE in EU2 USUV-infected condition.

Supplemental Figure 3. USUV isolates induces CPE in human endothelial cells with an atypical shape for EU2 while there is no CPE in pericytes

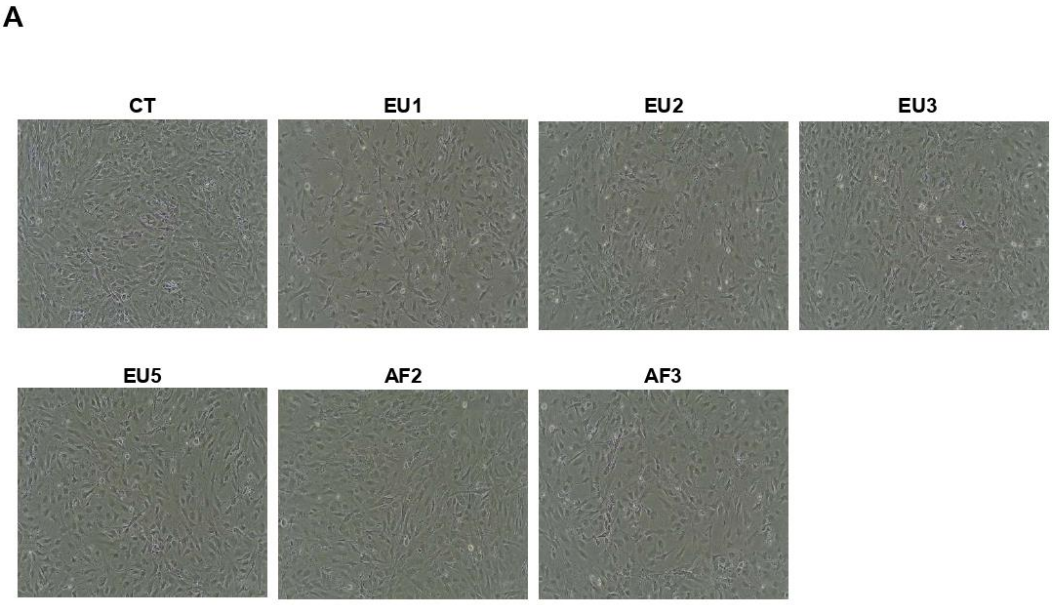
(A) USUV infection in pericytes (at 4pi) does not induce CPE unlike endothelial cells (B) where an atypical CPE is observed with the EU2 strain (at 6 dpi). (B) USUV infection in pericytes (at 4pi) does not induce CPE unlike endothelial cells (B) where an atypical CPE is observed with the EU2 strain (at 6 dpi).

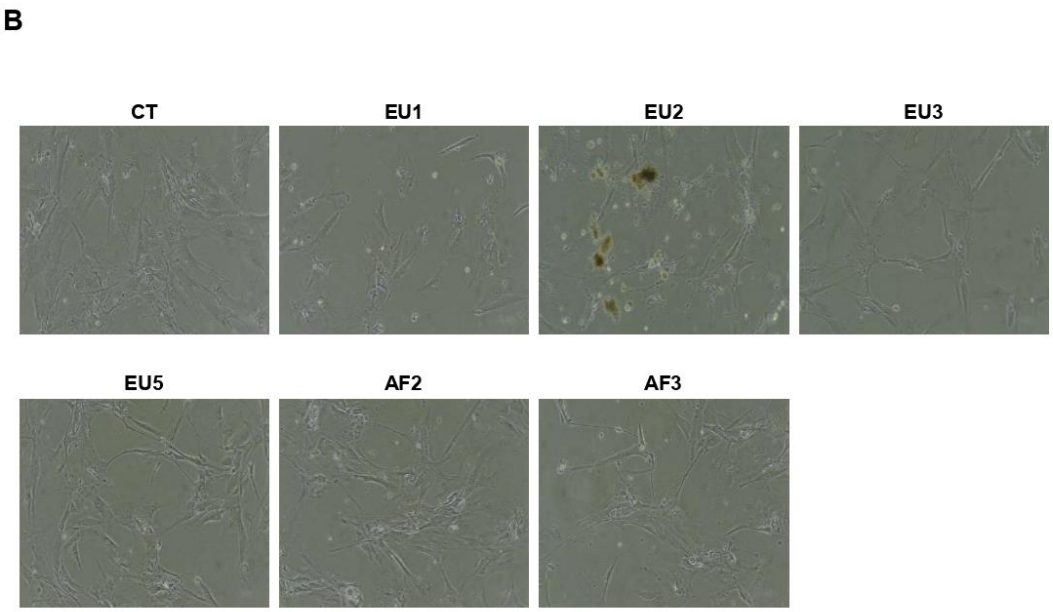


Supp Figure 1



Supp Figure 2





Supp Figure 3

Annexe 4 Correction article de comparaison lignées USUV

Clé *et al. Journal of Neuroinflammation* (2021) 18:59
https://doi.org/10.1186/s12974-021-02109-y

Journal of Neuroinflammation

CORRECTION Open Access

Correction to: Differential neurovirulence of Usutu viruslineages in mice and neuronal cells

Marion Clé[1†], Orianne Constant[1†], Jonathan Barthelemy[1], Caroline Desmetz[2], Marie France Martin[3], Lina Lapeyre[3], Daniel Cadar[4], Giovanni Savini[5], Liana Teodori[5], Federica Monaco[5], Jonas Schmidt-Chanasit[4,6], Juan-Carlos Saiz[7], Gaëlle Gonzales[8], Sylvie Lecollinet[8], Cécile Beck[8], Fabien Gosselet[9], Philippe Van de Perre[1,10], Vincent Foulongne[1,10], Sara Salinas[1] and Yannick Simonin[1*]

Correction to: J Neuroinflammation (2021) 18:11
https://doi.org/10.1186/s12974-020-02060-4

Following publication of the original article [1], the authors noticed that there were error bars offset in Figs. 3, 5 and 6 in the published version of this article. Presented here are the corrected Figs. 3, 5 and 6. The original article has been updated.

Author details
[1]Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Université de Montpellier,INSERM, EFS, Montpellier, France. [2]BioCommunication en CardioMétabolique(BC2M), Montpellier University, Montpellier, France. [3]Université deMontpellier, CNRS, Viral Trafficking, Restriction and Innate Signaling, Montpellier, France. [4]Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, WHO Collaborating Centre for Arbovirus and Haemorrhagic Fever Reference and Research, 20359 Hamburg, Germany. [5]OIE Reference Centre for West NileDisease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale"G. Caporale", 46100 Teramo, Italy. [6]Faculty of Mathematics, Informatics and Natural Sciences, UniversitätHamburg, 20148 Hamburg, Germany. [7]Department of Biotechnology, INIA, Madrid, Spain. [8]UPE, Anses Animal Health Laboratory, UMR1161 Virology, INRA, Anses, ENVA, Maisons-Alfort, France. [9]Blood-Brain Barrier Laboratory (BBB Lab), University of Artois, UR2465, F-62300 Lens, France. [10]Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France.

Published online: 23 February 2021

Reference

1. Clé M, Constant O, Barthelemy J, et al. Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells. J Neuroinflammation. 2021;18:11 https://doi.org/10.1186/s12974-020-02060-4.

The original article can be found online at https://doi.org/10.1186/s12974-020-02060-4.

* Correspondence: yannick.simonin@umontpellier.fr
†Marion Clé and Orianne Constant contributed equally to this work.
[1]Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Université de Montpellier,INSERM, EFS, Montpellier, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

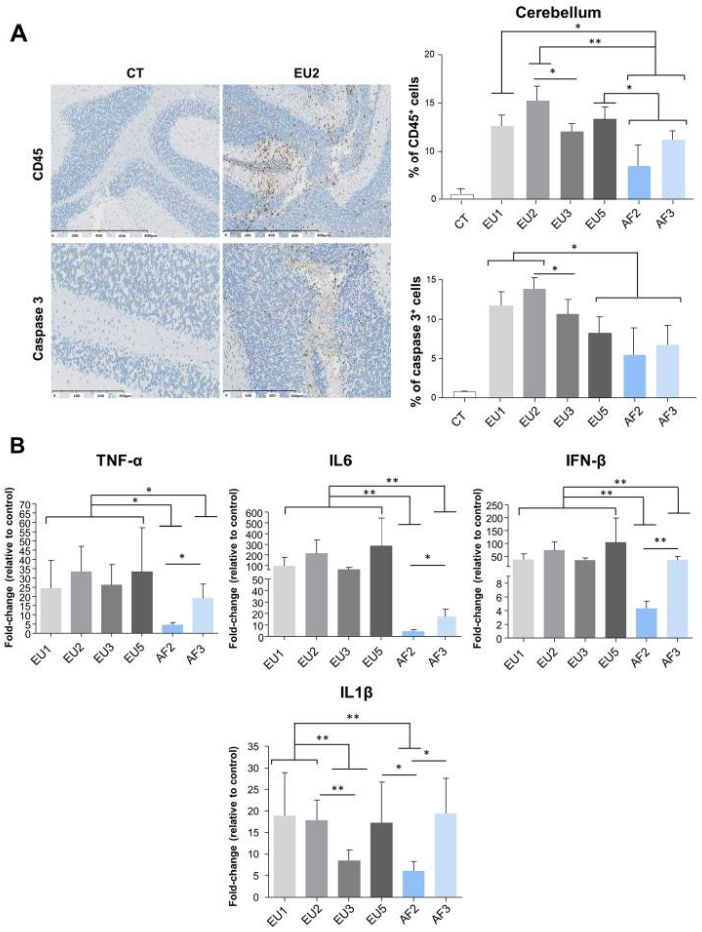


Fig. 3 USUV isolates differentially induce cellular infiltration, apoptosis, and inflammation in the mice brain. **a** Left panel: Immunohistochemical CD45 staining (associated with luxol blue) showing inflammatory infiltrates in the infected brain (brown staining) at 6 dpi. Some cells present caspase 3 staining after immunohistochemistry. Right panel: Quantification of CD45-positive cells and caspase 3 positive cells in USUV-infected brain compared to CT. **b** qRT-PCR analysis of TNFα, IL6, IFNβ, and IL1β mRNA from the brain collected at 6 dpi. Each histogram represents the mean ± SEM from 6 independent mice normalized to CT. *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$

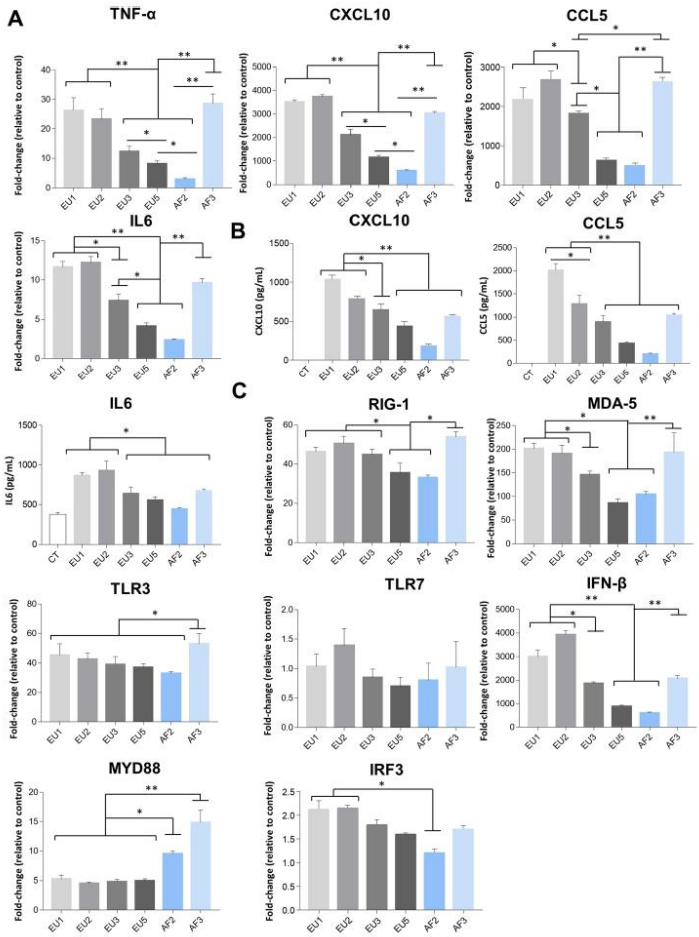


Fig. 5 Infection of astrocytes by USUV strains leads to different profiles in the secretion and expression of pro-inflammatory cytokines. **a** qRT-PCR analysis of TNFα, CXCL10, CCL5, and IL6 mRNA collected at 2 dpi from human astrocytes cells infected or not by USUV. Results are expressed as means of the fold regulation. **b** ELISA analyses of CXCL10, CCL5, and IL6 (pg/mL) at 2 dpi. Each histogram represents the mean ± SEM from 3 independent experiments. **c** qRT-PCR analysis of RIG-1, MDA-5, TLR3, TLR7, IFNβ, MYD88, and IRF3 mRNA collected at 2 dpi from human infected astrocytes. Results are expressed as means of the fold regulation normalized to CT (3 independent triplicates). *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$

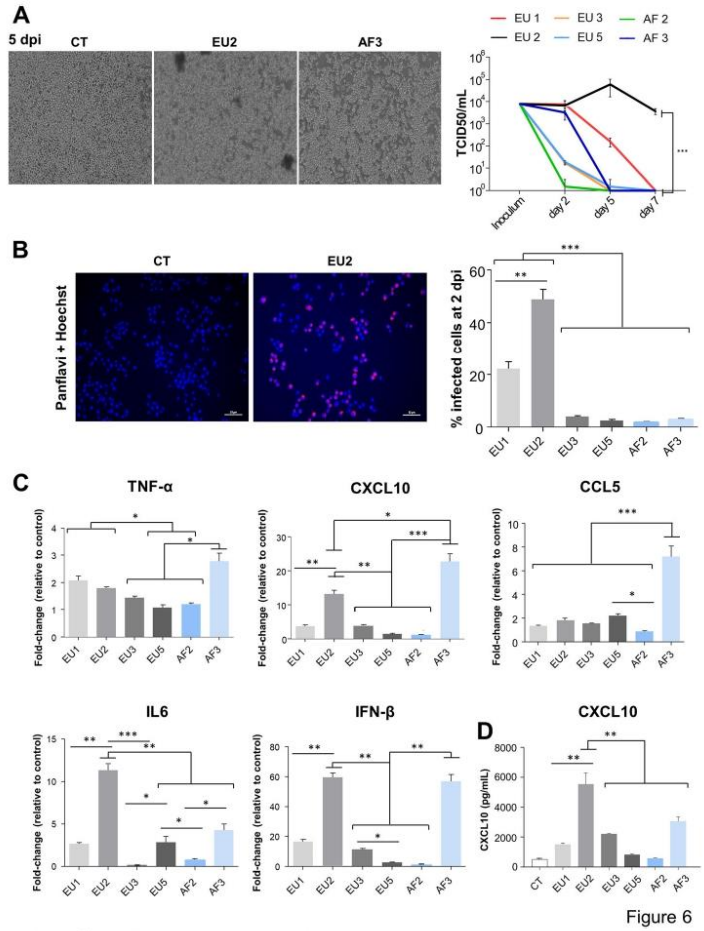


Figure 6

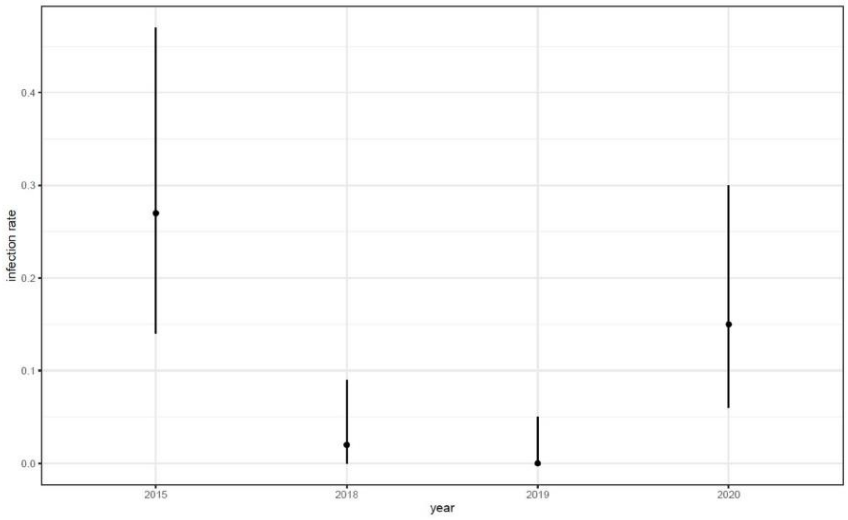
Fig. 6 USUV strains replicate differentially in murine microglia and EU2 strains persist longer. Murine microglia were infected with USUV strains at a MOI of 0.1. **a** Left panel: Bright light images of control and USUV-infected microglia at 5 dpi. We observe an atypical CPE- in EU2-infected cells. Right panel: Supernatants from infected cells (MOI 0.1) were collected at 2, 5, and 7 dpi, and subjected to TCID50 measurement. Viral production in USUV-infected microglia shows difference in terms of replication and persistence between strains, with greater virulence for EU2. **b** Left panel: USUV-infected cells were fixed at 2 dpi and labeled with the pan-*flavivirus* antibody (in red) as showed for EU2 strain. Scale bar = 50 µm. The corresponding quantification is indicated on the right panel ($n = 3$ independent experiments). **c** RT-qPCR analysis of TNFα, CXCL10, CCL5, IL6, and IFNβ of mRNA collected at 2 dpi from infected and non-infected (CT) microglial cells. **d** Analyses of CXCL10 by ELISA in the supernatants of CT- or USUV-infected microglia at 2 dpi. Results are expressed as mean ± SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$

Annexe 5 Suppléments article "One Health"

Supplementary material

"This supplementary material is hosted by Eurosurveillance as supporting information alongside the article [One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020], on behalf of the authors, who remain responsible for the accuracy and appropriateness of the content. The same standards for ethics, copyright, attributions and permissions as for the article apply. Supplements are not edited by Eurosurveillance and the journal is not responsible for the maintenance of any links or email addresses provided therein."

Supplemental Figure 1. Temporal dynamics of the infection rate of Usutu virus in Culex pipiens females.



Maximum likelihood estimates of infection rates (proportion of infected females per 100 females). Estimates were obtained by pooling data from all sites for a given year.

Supplemental Table 1.

Mosquito collection sites in the Camargue area between 2018 to 2020.

sites	latitude	longitude	2015	2018	2019	2020
Beaucaire	43°45'26.48"N	4°37'0.92"E	NO	NO	YES	YES
Bellegarde	43°44'35.84"N	4°30'17.68"E	NO	NO	YES	YES
Bélugue	43°25'20.64"N	4°41'0.90"E	NO	NO	YES	YES
Bois d'Espeyran	43°38'56.88"N	4°23'36.91"E	YES	YES	YES	YES
Bois François	43°23'54.35"N	4°47'13.54"E	YES	YES	YES	YES
Caisse d'Epargne	43°24'45.84"N	4°43'38.49"E	NO	YES	YES	YES
Camping Europe	43°29'21.52"N	3°46'37.64"E	NO	NO	YES	NO
Elysette	43°30'57.87"N	4° 9'20.48"E	YES	YES	YES	YES
Eysselle	43°24'55.74"N	4°46'11.90"E	NO	NO	YES	YES
Grande Sagne	42°50'33.15"N	2°56'0.02"E	NO	YES	NO	NO
Jardins	43°24'52.78"N	4°44'30.05"E	NO	YES	YES	YES
Jasse brulee	43°37'58.24"N	4°12'22.59"E	YES	YES	YES	YES
Désert	43°28'17.94"N	3°46'49.75"E	NO	YES	YES	YES
Mas d'Avon	43°34'5.14"N	4°12'29.24"E	YES	YES	YES	YES
La Palissade	43°22'34.76"N	4°48'35.81"E	NO	NO	YES	YES
Pêcheurs	42°53'52.44"N	3° 0'0.71"E	NO	YES	NO	NO
Petite Sylve	43°34'16.56"N	4°22'56.07"E	YES	YES	YES	YES
Port Napoléon	43°22'38.23"N	4°49'21.11"E	NO	YES	YES	YES
Roustan	43°21'35.05"N	4°50'54.17"E	NO	NO	YES	YES
Saint-Gilles	43°39'58.47"N	4°25'38.16"E	NO	NO	YES	YES
Sites			6	12	18	17
Mosquitoes			4220	5499	7705	4158
Pools			147	1369	257	145
USUV-positive pools			11	1	0	6
WNV-positive pools			-	2	0	0
USUV sequences			YES	YES (1/1)	-	YES (2/6)
WNV sequences			-	YES (1/2)	-	-

All sites were not sampled all years. Thus, a "YES" on a given year indicates sampling in that site and year. Data on the sites from our previous study in 2015 are provided for the sake of completeness. Sites with WNV-positive pools are shown in blue. Sites with USUV-positive pools are shown in yellow. Figures between brackets stand for number of pools yielding a virus sequence among positive pools for a given virus.

Résumé

Les virus Usutu (USUV) et West-Nile (WNV) sont des arbovirus émergents transmis principalement par des moustiques du genre *Culex*. Chez l'humain l'infection peut entrainer des atteintes neurologiques suite à un accès des virus au système nerveux central (SNC) notamment par le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ce projet de thèse s'intéresse à la caractérisation des mécanismes de passage et d'infection de la BHE par USUV et WNV. La neuroinflammation associée à ces infections étant une part importante de la pathogénèse, le rôle des cellules immunes et leur interaction avec la BHE ont aussi été étudiés. Ce travail a permis de mettre en évidence la susceptibilité de plusieurs types cellulaires neuronaux aux différentes lignées d'USUV ainsi que celle de modèles murins. La lignée Europe 2 semble être la plus virulente et son effet sur la BHE a été comparé avec celui de la lignée 2 de WNV, deux lignées associées à l'apparition de symptômes neuronaux lors d'infection humaine. Le modèle de BHE étudié permet la réplication des deux arbovirus avec un passage dans le SNC, WNV conduit aussi à une perturbation de l'intégrité de la barrière et les deux virus sont capable d'induire une forte réponse antivirale avec la sécrétion de molécules inflammatoires comme des cytokines (interleukines, interférons), des chimiokines et des molécules d'adhésion cellulaires. Cette inflammation induit le recrutement de cellules immunes amplifiant la neuroinflammation. D'autre part, USUV est capable d'infecter des cellules dendritiques qui seront aussi recrutées par la BHE à la différence de WNV, et peuvent être des chevaux de Troie lors de l'infection du SNC. Des sérums de patients ayant été infectés par le virus WNV ont été analysés afin de mettre en évidence la neuroinflammation et de trouver de potentiel biomarqueurs d'atteintes neuronales. Les patients infectés présentant des atteintes neurologiques montrent ainsi de fortes concentrations sériques de molécules pro-inflammatoires, persistantes plus de 20 jours après le début de l'infection, et la présence de molécules associées à des maladies neurodégénératives ou neuroinflammatoire. Par exemple, la concentration de TDP-43 pourrait être suivie après une infection par WNV afin d'anticiper les conséquences de son agrégation pouvant favoriser le développement de maladies neurodégénératives. Dans une démarche de « santé globale », ces travaux se sont aussi intéressés à la circulation de ces virus dans le sud de la France. Des tests de séroprévalence ont été menés afin de déterminer l'exposition des vecteurs, des réservoirs et d'autres hôtes à USUV et WNV. Enfin, en s'intéressant aux virus émergents responsables de troubles neuronaux, un travail de recherche sur l'infection de la BHE par le virus SARS-CoV-2 a été réalisé. En effet, ce virus est capable d'induire des symptômes neuronaux pouvant entrainer des séquelles. Les résultats suggèrent une faible infection directe de la barrière. L'ensemble de ces travaux permettent de mieux appréhender les infections virales de la BHE et la neuroinflammation, cela dans un contexte d'émergence avec des problématiques de santé publique soulevant l'importance de ces études.

Mots clés : Infection neuronale, Neuroinflammation, Barrière hémato-encéphalique, virus Usutu, virus West-Nile, SARS-CoV-2

Abstract

Usutu (USUV) and West-Nile (WNV) virus are emerging arboviruses mainly transmitted by Culex genus mosquitoes. In human, the infection can lead to neurological impairments following invasion of the central nervous system (CNS) by viruses, for example, through the blood-brain barrier (BBB). This thesis project aims to characterize access and infection mechanisms of the BBB by USUV and WNV. Neuroinflammation associated to these infections is an important part of the pathogenesis, consequently immune cell role and their interactions with the BBB have been studied. This work has shown the susceptibility of different cell types of the CNS to different USUV lineages and the susceptibility of murine models. Europe 2 lineage seems to be the more virulent and its effect on the BBB has been compared to the WNV lineage 2 effect, these two lineages being associated to neuronal symptom appearance during human infection. The BBB model used allows the replication of both arbovirus with passage in the CNS, WNV also leads to integrity perturbations of the barrier, and the two viruses are able to induce strong antiviral response with secretion of inflammatory molecules as cytokines (interleukins, interferons), chemokines and cell adhesion molecules. This inflammation induces immune cell recruitment and increases neuroinflammation. Unlike WNV, USUV is able to infect dendritic cells that can be recruited by the BBB and that can be Trojan horses during CNS infection. WNV infected patient sera have been analyzed to highlight the neuroinflammation and to search potential biomarkers of neurological impairments. Infected patients with neurological disorders show high serological concentrations of pro-inflammatory molecules, persisting more than 20 days before infection starting date, and of molecules associated to neurodegenerative or neuroinflammatory diseases. The concentration of TDP-43 could be followed after WNV infection in order to anticipate the consequences of its aggregation that can promote neurodegenerative disease development, for example. In a "One Health" approach, this work also studies circulation of these viruses in the south of France. Seroprevalence assays have been done to determine USUV and WNV exposition in vectors, reservoirs and other hosts. Finally, to investigate emerging virus that cause neuronal disorders, a study of the BBB infection by SARS-CoV-2 has been accomplished. Indeed, this virus can cause neuronal symptoms with possible sequels. Results suggest a poor direct infection of the barrier. Taken together, this work allow a better understanding of BBB viral infections and neuroinflammation, in a context of emergence associated to public health concerns that highlights importance of these studies.

Keywords: Neuronal infection, Neuroinflammation, Blood-brain barrier, Usutu virus, West-Nile virus, SARS-CoV-2