Transmission des arbovirus par allaitement : le virus Zika et le virus de la fièvre jaune

Sophie Desgraupes

▶ **To cite this version:**

Sophie Desgraupes. Transmission des arbovirus par allaitement : le virus Zika et le virus de la fièvre jaune. Virologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : . tel-04080799

HAL Id: tel-04080799
https://pasteur.hal.science/tel-04080799

Submitted on 25 Apr 2023

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

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

Université Paris Cité

INSTITUT PASTEUR

Thèse de doctorat de Université Paris Cité
École doctorale : Bio Sorbonne Paris Cité 562
Laboratoire d'accueil : Institut Pasteur, Paris, France
Département de Virologie,
Unité « Épidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes »

Transmission des arbovirus par allaitement : le virus Zika et le virus de la fièvre jaune

Sophie DESGRAUPES

Thèse de Doctorat en Infectiologie

Dirigée par Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi
Supervisée par Dr. Aurore Vidy-Roche

Soutenue publiquement le 14 décembre 2022 à 14h
À l'Institut Pasteur de Paris

Devant le jury composé de :

Pr Philippe VAN DE PERRE (Université de Montpellier) ..... Rapporteur
Dr Stephan ZIENTARA (Anses-EnvA-INRAe) ..... Rapporteur
Pr Sylvie VAN DER WERF (Université Paris Cité) ..... Examinatrice
Dr Sandra MARTIN-LATIL (Anses) ..... Examinatrice
Dr Virginie RIGOURD (APHP, Hôpital Necker Enfants Malades) ..... Examinatrice
Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI (Université Paris Cité) ..... Directeur de thèse
Dr. Aurore VIDY-ROCHE (Université Paris Cité) ..... Membre invité

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail :

- Je remercie MM. les Professeurs Philippe Van de Perre et Stephan Zientara d'avoir lu et évalué mon manuscrit de thèse.
- Je remercie Mmes les Docteurs Sandra Martin-Latil et Virginie Rigourd d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.
- Et je remercie Mme la Professeure Sylvie Van der Werf de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie mon Directeur de thèse, Pierre-Emmanuel Ceccaldi, pour m'avoir donné l'occasion de réaliser cette thèse, avec la supervision du Docteur Aurore Vidy-Roche. Je vous remercie pour la liberté que vous m'avez laissée dans nos recherches, pour votre gentillesse et pour votre compréhension et tolérance vis-à-vis des problèmes de santé de mon père cette dernière année.

Je tiens à remercier notre chef d'Unité, Antoine Gessain, ainsi que toute l'équipe EPVO qui m'a été d'un grand soutien au cours de cette thèse et de très bonne compagnie ! Je remercie Philippe Afonso, Jim Zoladek, Patricia Jeannin, Olivier Cassar, Jill-Léa Ramassamy, Youna Coquin, Lasse Dynesen, Thomas Montange, Florence Buseyne, Isma Ziani et Jocelyne Creff.

Je tiens à remercier particulièrement Jim pour notre quotidien passé ensemble, pour toutes nos âneries, pour nos nombreuses soirées et surtout pour tous nos problèmes partagés. Comme tu le sais, *frinchemin*, j'ai trouvé en toi un vrai ami !

Je remercie Philippe et Patricia pour leur grand soutien tout au long de ma thèse. Merci pour les discussions scientifiques, merci pour votre soutien moral en cette dernière année qui a été extrêmement difficile pour moi sur le plan personnel. Merci de m'avoir poussée et motivée à m'accrocher ! *Cœur cœur paillettes* pour nos nombreuses soirées.

Je remercie tous les collègues du 4ème étage du bâtiment Lwoff pour les interactions du quotidien et les échanges à la machine à café. Je remercie également Nolwenn Jouvenet et Maxime Chazal (Institut Pasteur), Philippe Roigneard (Université François Rabelais, Tours) et Virginie Rigourd (APHP) pour leur aide et leurs précieux conseils.

Je remercie les étudiants que j'ai eu l'occasion d'encadrer en stage : Benjamin Leonardon et Jeanne Pascard. Jeanne, ça aura été un plaisir de t'encadrer pendant 6 mois. Je pars en sachant que le projet continue entre tes mains. Merci de m'avoir permis de découvrir l'encadrement de recherches sur tes 6 mois de stage et merci pour les discussions et réflexions scientifiques. Je te remercie également pour toutes nos soirées, j'ai eu beaucoup de chance de tomber sur une étudiante aussi motivée, impliquée et joviale !

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour m'avoir laissé choisir ma passion et pour m'avoir soutenue au cours de mes études et de ma thèse. Je remercie particulièrement mon papa pour m'avoir donné le goût des sciences. Je tiens aussi à remercier ma sœur, Zoé. *Sœur !* Merci infiniment pour ton soutien cette année. Tu as toujours su me rassurer, me motiver et me faire relativiser dans les moments les plus difficiles. Tu as su me soutenir à l'hôpital et calmer mon stress vis-à-vis de l'avancement de ma thèse. Quelle chance d'avoir une sœur comme toi.

RÉSUMÉ

La transmission de certains arbovirus (« arthropode-borne virus ») par allaitement a été suggérée chez l'Homme (e.g. virus Zika (ZIKV), virus de la fièvre jaune (YFV), virus de la Dengue, virus West Nile…). Parmi ceux-ci, ZIKV et YFV sont particulièrement discutés. Pour ZIKV, de nombreuses études de cas rapportent la présence du virus dans le lait maternel et l'infection du nourrisson allaité tandis que pour YFV la transmission virale par allaitement a été observée pour la souche vaccinale, non transmise par les moustiques. Il est nécessaire de comprendre l'importance que représente l'allaitement dans la transmission de ces arbovirus afin de prévenir l'infection des nourrissons par allaitement lors de futures épidémies.

Au laboratoire, nous avions précédemment montré la transmission de ZIKV par allaitement sur le modèle murin A129 (IFNAR KO). Nous avions également démontré que ZIKV dissémine aux glandes mammaires et infecte les cellules épithéliales mammaires (à l'aide du modèle murin, de cellules épithéliales mammaires humaines primaires et de lignées cellulaires). Enfin nous avions montré que ZIKV franchit la barrière intestinale *in vivo* et *in vitro* et nous avions proposé un mécanisme de franchissement comme étant l'infection productive de l'épithélium sans altération de sa fonction de barrière.

Cependant, certaines études de cas ont rapporté une absence de transmission de ZIKV à des nourrissons allaités par une mère infectée. Différents facteurs biologiques ou génétiques contrôlant la transmission d'autres virus par allaitement (i.e. virus de l'immunodéficience humaine, virus T-lymphotrope humain, cytomégalovirus) ont été décrits : la charge virale et la forme virale infectieuse dans le lait, le statut immunologique de la mère, la durée de l'allaitement, etc. Dans ce projet doctoral, nous avons étudié la forme infectieuse de ZIKV dans le lait maternel murin et nous avons détecté du virus libre et « cellule-associé ». Nous avons également étudié l'effet des composants du lait sur l'infection par ZIKV et nous avons observé un effet inhibiteur des acides gras à longue chaîne carbonée.

Dans un second axe, nous avons étudié les mécanismes de transmission de YFV par allaitement au nourrisson à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* (souris A129). Nous avons étudié la souche vaccinale 17D-204 (transmise par allaitement chez l'Homme) ainsi que 2 souches sauvages (Asibi et Dakar) afin d'évaluer si ces dernières pourraient également être transmises par allaitement. Nous avons montré que YFV dissémine aux glandes mammaires murines après l'infection et que des particules infectieuses sont excrétées dans le lait. *In vitro,* nous avons montré que des lignées épithéliales mammaires humaines sont permissives à l'infection et nous avons proposé un mécanisme de franchissement de la barrière intestinale du nourrisson. À l'instar de ZIKV, les 3 souches de YFV testées franchissent la barrière intestinale par infection productive de l'épithélium sans altération de sa fonction de barrière.

En conclusion, ce projet doctoral a permis de mettre en évidence la présence de ZIKV dans le lait maternel murin sous forme libre et « cellule-associée », d'identifier un effet inhibiteur de certains acides gras libres du lait sur ZIKV, ainsi que d'aborder les mécanismes de passage transépithélial de YFV au niveau des barrières mammaire et intestinale. Ces résultats apportent des éléments de compréhension dans l'évaluation, voire la prévention, du risque de transmission de ces deux virus par allaitement.

Mots clé : virus Zika, virus de la fièvre jaune, allaitement, transmission mère-enfant, franchissement d'épithélium, antiviral.

Title: Transmission of arboviruses during breastfeeding: Zika virus and yellow fever virus.

ABSTRACT

The transmission of certain arboviruses ("arthropod-borne viruses") by breastfeeding has been suggested in humans (e.g. Zika virus (ZIKV), yellow fever virus (YFV), Dengue virus, West Nile virus...). Among these, ZIKV and YFV are particularly discussed. For ZIKV, numerous case reports show the presence of the virus in breast milk and the infection of the breastfed infant, while for YFV, viral transmission through breastfeeding has been observed for the vaccine strain (not transmitted by mosquitoes). It is necessary to understand the importance of breastfeeding in the transmission of these arboviruses to prevent their transmission to newborns through breastfeeding during future outbreaks.

In our laboratory, we have previously demonstrated the transmission of ZIKV by breastfeeding in the A129 mouse model (IFNAR KO). We also demonstrated that ZIKV disseminates to the mammary glands and infects mammary epithelial cells (using the mouse model, primary human mammary epithelial cells and cell lines). Finally, we showed that ZIKV crosses the intestinal barrier *in vivo* and *in vitro*, and we identified the mechanism of crossing as being the productive infection of the epithelium without alteration of its barrier function.

However, some case studies have reported a lack of transmission of ZIKV to breastfed newborns by an infected mother. Different biological or genetic factors controlling the transmission of other viruses by breastfeeding (i.e. human immunodeficiency virus, human T-lymphotropic virus, cytomegalovirus) have been described: viral load and infectious viral form in breast milk, immunological status of the mother, duration of breastfeeding, etc. In this doctoral project, we studied the infectious form of ZIKV in murine breast milk and detected free and cell-associated virus. We also studied the effect of milk components on ZIKV infection and observed an inhibitory effect of long chain fatty acids.

In a second axis, we studied the mechanisms of YFV transmission to newborns during breastfeeding, using *in vitro* and *in vivo* models (A129 mice). We studied the vaccine strain 17D-204 (transmitted by breastfeeding in humans) as well as two wild type strains (Asibi and Dakar) to assess whether the latter could also be transmitted by breastfeeding. We showed that YFV disseminates to murine mammary glands after infection and that free infectious viral particles are excreted in breast milk. *In vitro*, we have shown that human mammary epithelial cell lines are permissive to infection, and we have suggested a mechanism of intestinal barrier crossing of the newborn. Like ZIKV, the three YFV strains tested cross the intestinal barrier by productive infection of the epithelium without altering its barrier function.

In conclusion, this doctoral project has allowed us to demonstrate the presence of ZIKV in murine breast milk both in a free and "cell-associated" form, to identify an inhibitory effect of certain free fatty acids in milk on ZIKV, and to address the mechanisms of transepithelial passage of YFV at the mammary and intestinal barriers. These results provide elements of understanding in the evaluation, or even prevention, of the risk of transmission of these two viruses by breastfeeding.

Key words: Zika virus, yellow fever virus, breastfeeding, mother-to-child transmission, epithelial crossing, antiviral.

À mon papa,

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS 3

RÉSUMÉ 4

ABSTRACT 5

TABLE DES MATIÈRES 9

LISTE DES ABRÉVIATIONS 13

TABLE DES ILLUSTRATIONS 14

TABLE DES TABLEAUX 15

INTRODUCTION 17

LE VIRUS ZIKA ET LE VIRUS DE LA FIEVRE JAUNE 19

Découverte des arbovirus 19

Biologie moléculaire des flavivirus 20

Génome et structure des flavivirus 20

Cycle viral des flavivirus 22

Le virus Zika 24

Physiopathologie du virus Zika 24

Modes de transmission du virus Zika 24

Découverte et isolement du virus Zika 25

Épidémies causées par le virus Zika 26

Circulation du virus Zika de nos jours 28

Risques d'émergence virale 29

Le virus de la fièvre jaune 31

Physiopathologie du virus de la fièvre jaune 31

Développement de vaccins contre le virus de la fièvre jaune 31

Modes de transmission du virus de la fièvre jaune 33

Épidémiologie du virus de la fièvre jaune 33

LA GLANDE MAMMAIRE 36

Anatomie et fonction de la glande mammaire 36

Développement de la glande mammaire 37

Développement embryonnaire 37

Développement pubertaire 37

Développement gestationnel 38

L'épithélium mammaire 38

Comparaison des glandes mammaires humaines et murines 39

LE LAIT MATERNEL 42

L'allaitement : une pratique culturelle hétérogène 42

Composition du lait maternel 42

LA BARRIÈRE INTESTINALE 45
Anatomie du système digestif *45*
Structure et fonction de la barrière intestinale *45*
L'épithélium intestinal *46*
Les entérocytes 47
Les cellules Microfold (« cellules M ») 47
Les cellules caliciformes 48
Les cellules de Paneth 49
Les cellules entéroendocrines 49
Les cellules « Tuft » 50
Systèmes de défense du tube digestif *50*
La barrière microbiologique (le microbiote intestinal) 51
La barrière chimique (le mucus et les peptides antimicrobiens) 51
La barrière mécanique (l'épithélium intestinal) 52
La barrière immunologique (le tissu lymphoïde associé aux intestins) 53

TRANSMISSION DE VIRUS PAR ALLAITEMENT 55
Les trois principaux virus transmis par allaitement *55*
Transmission des arbovirus par allaitement *56*
Le virus chikungunya 56
Le virus de la dengue 56
Le virus West Nile 57
Le virus de la fièvre jaune 58
Le virus Zika 58
Mécanismes de franchissement viral de l'épithélium mammaire de la mère *62*
Franchissement de l'épithélium mammaire par les trois principaux virus transmis par allaitement 62
Franchissement de l'épithélium mammaire par les arbovirus 64
Effet du lait maternel sur l'infectiosité virale *66*
Effet du lait entier 66
Effet de la lactoferrine 67
Effet des acides gras libres 69
Effet du lait maternel sur les arbovirus 70
Mécanismes de franchissement viral de l'épithélium intestinal du nourrisson *72*
Franchissement de la barrière intestinale par les virus transmis par voie orale 72
Franchissement de la barrière intestinale par les arbovirus 74

OBJECTIFS DU PROJET DOCTORAL 79

MATERIEL & METHODES **81**

Lignées cellulaires *83*
Souches virales *83*
Modèle animal *84*

Déclaration éthique 84
Infection des animaux et prélèvement d'échantillons 84
Isolement des fractions du lait maternel 85
Extractions d'ARN 86
RT-qPCR 86
Titrage en plage de lyse 87
Immunomarquages et cytométrie en flux 87
Co-cultures 88
Tests de viabilité cellulaire 88
Test d'activité antivirale de la lactoferrine, de la lactalbumine et des acides gras libres sur les cellules Caco-2 88
Test d'activité antivirale du DMSO, de l'éthanol, de la lactoferrine, de la lactalbumine et des acides gras libres sur le virus Zika 88
Cinétiques de l'effet antiviral des acides gras libres sur l'infectiosité du virus Zika 89
Résistance électrique trans-épithéliale 89
Différenciation des cellules Caco-2 in vitro 89
Immunofluorescence 90
Analyses statistiques 90

RESULTATS **91**

AXE 1 : LE VIRUS ZIKA. 93
Nature des entités virales excrétées dans le lait maternel. 93
Des particules libres du virus Zika sont présentes dans le lait maternel de souris infectées et le virus est efficacement transmis aux souriceaux allaités. 93
Identification des types cellulaires du lait murin et présence de virus Zika associé aux cellules. 96
Effet des composants du lait sur l'infection par le virus Zika. 98
Effet de la lactoferrine, de la lactalbumine et des acides gras sur la viabilité des cellules Caco-2. 100
Effet de l'éthanol et du diméthyl sulfoxide sur l'infectiosité des particules du virus Zika. 102
La lactoferrine, la lactalbumine et certains acides gras libres n'ont pas d'effet sur l'infectabilité des cellules Caco-2 par le virus Zika. 102
Certains acides gras libres inhibent l'infectiosité des particules du virus Zika, contrairement à la lactoferrine et à la lactalbumine. 104
Effet des acides gras sur la viabilité des cellules Vero. 106
Cinétiques d'inactivation des particules du virus Zika par les acides gras libres. 108

AXE 2 : LE VIRUS DE LA FIEVRE JAUNE. 111
Mécanismes de franchissement de la barrière épithéliale mammaire de la mère. 111
Dissémination de la souche Dakar du virus de la fièvre jaune aux glandes mammaires de souris. 111
Dissémination de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune aux glandes mammaires de souris. 114
Les lignées épithéliales de glande mammaire MDA-MB-231 et MCF-7 sont sensibles et permissives à l'infection par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune. 116

Présence de particules virales infectieuses libres de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune dans le lait maternel de souris infectées. 118

Mécanismes de franchissement de la barrière intestinale du nourrisson. *121*

Les cellules de la lignée entérocytaire humaine Caco-2 sont sensibles et permissives à l'infection par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune. 121

Modèle de barrière intestinale différenciée et polarisée *in vitro*. 124

L'infection par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune n'altère pas la distribution de la protéine de jonctions serrées ZO-1 dans les barrières intestinales *in vitro*. 126

L'infection par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune n'altère pas l'étanchéité de la barrière intestinale *in vitro*. 128

Les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune franchissent le modèle de barrière intestinale polarisée *in vitro*. 130

Les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune se répliquent dans les barrières intestinales polarisées *in vitro*. 132

DISCUSSION 135

DISCUSSION 137

BIBLIOGRAPHIE 151

ANNEXES 171

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A129 : Fond génétique *129S2/SvPas-Ifnar1tm1Agt*
ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
AG129 : Fond génétique *129S7/SvEvBrd*
ARNv : ARN viral
BEBV : Virus Bebaru
CDC : Center for Disease Control and Prevention
Cellules M : Cellules Microfold
CHIKV : Virus Chikungunya
CMC : Carboxymethyl-cellulose
CMV : Cytomégalovirus
DENV : Virus de la dengue
DMSO : Dimethyl sulfoxide
FAE : Follicle-associated epithelium
GalCer : Galactosyl-céramide
GALT : Gut-associated lymphoid tissue
GETV : Virus Getah
GH : Growth Hormone
HAV : Virus de l'hépatite A
HCV : Virus de l'hépatite C
HSPG : Héparane-sulfates protéoglycanes
HSV-1 : Virus de l'herpès simplex de type 1
HSV-2 : Virus de l'herpès simplex de type 2
HTLV-1 : Virus T-lymphotrope humain de type 1
IAV : Virus de l'influenza A
Ig : Immunoglobuline
JEV : Virus de l'encéphalite japonaise
LA : Lactalbumine
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LF : Lactoferrine
MALT : Mucosa-associated lymphoid tissue
MAYV : Virus Mayaro
MCMV : Cytomégalovirus murin
MESRI : Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation
MMTV : Virus de la tumeur mammaire de la souris
MOI : Multiplicité d'infection
MVV : Virus Maëdi-Visna
NDV : Virus de la maladie de Newcastle
NV : Norovirus
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PV : Poliovirus
RE : Reticulum endoplasmique
RRV : Virus Ross River
RT : Température ambiante (« room temperature »)
RV : Rotavirus
SD : Déviation standard
SeV : Virus Sendaï
SFV : Virus Semliki forest
SINV : Virus Sindbis
SVF : Sérum de vœu fétal
TAM : TYRO3, AXL et MER
TBEV : Virus de l'encéphalite à tiques
TCR : Récepteur T
TEER : Résistance électrique trans-épithéliale
TIM : T-cell immunoglobulin mucin 1
TOSV : Virus Toscana
USUV : Virus Usutu
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VSV : Virus de la stomatite vésiculaire
WNV : Virus West Nile
YFV : Virus de la fièvre jaune
ZO : Zonula occludens

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

Figure 1 : Structure de la particule virale et du génome des flavivirus.

Figure 2 : Étapes du cycle viral des flavivirus.

Figure 3 : Distribution géographique du virus Zika au cours du temps.

Figure 4 : Distribution géographique du virus de la fièvre jaune au cours du temps.

Figure 5 : Organisation générale de la glande mammaire humaine.

Figure 6 : Structure de l'épithélium mammaire.

Figure 7 : Distribution et morphologie des glandes mammaires chez la souris.

Figure 8 : Coupes histologiques de glandes mammaires humaine et murine.

Figure 9 : Composition du lait maternel humain.

Figure 10 : L'appareil digestif chez l'Homme.

Figure 11 : Structure de l'épithélium intestinal.

Figure 12 : Systèmes de défenses dans le tube digestif.

Figure 13 : Les jonctions intercellulaires de la barrière intestinale.

Figure 14 : Mécanismes hypothétiques de franchissement viral de l'épithélium mammaire.

Figure 15 : Mécanismes d'inhibition de l'infectiosité virale par la lactoferrine.

Figure 16 : Mécanisme hypothétique d'inhibition de l'infectiosité virale par le lait conservé à 4°C.

Figure 17 : Mécanismes de franchissement de la barrière intestinale par les virus.

RÉSULTATS – AXE 1 : LE VIRUS ZIKA

Figure 18 : Des particules libres du virus Zika sont présentes dans le lait maternel de souris infectées et le virus est efficacement transmis aux souriceaux allaités.

Figure 19 : Identification des types cellulaires du lait murin et présence de virus Zika associé aux cellules.

Figure 20 : Concentrations en acides gras libres dans le lait maternel humain à 4 semaine post-partum.

Figure 21 : Échelle de variation des concentrations en lactoferrine et lactalbumine au cours de l'allaitement.

Figure 22 : Effet de la lactoferrine, de la lactalbumine et des acides gras libres sur la viabilité des cellules Caco-2.

Figure 23 : Effet de l'éthanol et du diméthyl sulfoxide sur l'infectiosité des particules du virus Zika.

Figure 24 : La lactoferrine, la lactalbumine et certains acides gras libres n'ont pas d'effet sur l'infectabilité des cellules Caco-2 par le virus Zika.

Figure 25 : Certains acides gras libres inhibent l'infectiosité des particules du virus Zika, contrairement à la lactoferrine et à la lactalbumine.

Figure 26 : Effet des acides gras sur la viabilité des cellules Vero.

Figure 27 : Cinétiques d'inactivation des particules du virus Zika par les acides gras libres.

RÉSULTATS – AXE 2 : LE VIRUS DE LA FIÈVRE JAUNE

Figure 28 : Dissémination de la souche Dakar du virus de la fièvre jaune aux glandes mammaires de souris.
Figure 29 : Dissémination de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune aux glandes mammaires de souris.
Figure 30 : Les lignées épithéliales de glande mammaire MDA-MB-231 et MCF-7 sont sensibles et permissives à l'infection par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune.
Figure 31 : Présence de particules virales infectieuses libres de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune dans le lait maternel de souris infectées.
Figure 32 : Les cellules de la lignée entérocytaire humaine Caco-2 sont sensibles et permissives à l'infection par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune.
Figure 33 : Modèle de barrière intestinale différenciée et polarisée *in vitro*.
Figure 34 : L'infection par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune n'altère pas la distribution de la protéine de jonctions serrées ZO-1 dans les barrières intestinales *in vitro*.
Figure 35 : L'infection par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune n'altère pas l'étanchéité de la barrière intestinale *in vitro*.
Figure 36 : Les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune franchissent le modèle de barrière intestinale polarisée *in vitro*.
Figure 37 : Les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune se répliquent dans les barrières intestinales polarisées *in vitro*.

TABLE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1 : Familles virales des arbovirus et leurs caractéristiques.
Tableau 2 : Arguments épidémiologiques et cliniques de la transmission des arbovirus par allaitement.
Tableau 3 : Inhibition de l'infectiosité des arbovirus par les composants du lait maternel.

Introduction

Durant ces dernières années, les arboviroses ont joué un rôle prépondérant dans l'émergence virale. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé que le poids annuel sur la santé publique des arboviroses (causées par le virus de la Dengue (DENV), le virus Chikungunya (CHIKV), le virus Zika (ZIKV), le virus de la fièvre jaune (YFV), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) et le virus West Nile (WNV)) représente près de 100 millions de cas d'infection par an et 2,3 millions de DALY par an (« disability-adjusted life years » prenant en compte les conséquences sur la qualité de vie des individus infectés). (WHO 2017)
Parmi ces arbovirus, les virus ZIKV et YFV ont eu un impact majeur en santé publique. La dernière épidémie causée par ZIKV en 2015-2016 a conduit l'OMS à déclarer une urgence de santé publique de portée internationale (WHO 2016), tandis que YFV cause encore aujourd'hui, malgré l'existence d'un vaccin, environ 200 000 cas d'infection par an, conduisant à 30 000 décès par an d'après l'OMS (Staples 2010).

LE VIRUS ZIKA ET LE VIRUS DE LA FIEVRE JAUNE

Découverte des arbovirus

Les arbovirus (de l'anglais « Arthropod-borne virus ») sont définis comme des virus qui se transmettent par piqûre d'arthropodes (invertébrés possédant un corps segmenté et articulé). En effet, certains arthropodes hématophages sont capables d'ingérer un agent pathogène en se nourrissant sur un hôte vertébré infecté (donneur), puis de répliquer l'agent pathogène et de le transmettre à un nouvel hôte vertébré (receveur). (WHO 1983)

L'hypothèse selon laquelle les arthropodes sont des vecteurs de maladies a été avancée pour la première fois en 1881, lorsque Carlos Finlay a suggéré que la fièvre jaune n'était pas transmise par contact humain, mais par les moustiques. Ce n'est qu'en 1901, que cette idée a été confirmée par le Major Walter Reed qui a démontré que la fièvre jaune était causée par un agent ultra-filtrable présent dans le sang des patients infectés. (Chaves-Carballo 2005)

Une découverte majeure a eu lieu cinq ans plus tard, en 1906, lorsque le moustique *Aedes aegypti* a été découvert comme étant vecteur de la dengue, faisant de celle-ci et de la fièvre jaune les deux premières maladies connues pour être causées par des virus transmis par les

arthropodes. Les deux arbovirus découverts par la suite ont été le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV) en 1936 et WNV en 1937.

En raison, notamment, de l'adaptation des arthropodes vecteurs aux environnements urbains, de l'augmentation de leur aire de répartition probablement due au changement climatique et de l'augmentation des transports mondiaux, les arbovirus ont connu une émergence rapide et étendue ces dernières années. Actuellement, près de 500 arbovirus sont identifiés. Ceux-ci forment un groupe non taxonomique et regroupent des virus appartenant principalement aux 9 familles virales suivantes : *Flaviviridae, Togaviridae, Nairoviridae, Phenuiviridae, Peribunyaviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Reoviridae* et *Asfarviridae* **(Tableau 1)**. (Hubálek et al. 2014)

Génome	Enveloppe	Famille	Genre	Principaux virus
ARN (+)	oui	*Flaviviridae*	*Flavivirus*	YFV, DENV, WNV, ZIKV, JEV, TBEV, USUV
		Togaviridae	*Alphavirus*	CHIKV, RRV, SFV, ONNV, VEEV, MAYV
ARN (-)	oui	*Nairoviridae*	*Orthonairovirus*	CCFV
		Phenuiviridae	*Phlebovirus*	RVFV
		Peribunyaviridae	*Orthobunyavirus*	BUNV
		Rhabdoviridae	*Vesiculovirus*	VSV
		Orthomyxoviridae	*Thogotovirus*	THOV
ARN db	non	*Reoviridae*	*Orbivirus*	BTV, ORUV
ADN db	oui	*Asfaviridae*	*Asfivirus*	ASFV

Tableau 1 : Familles virales des arbovirus et leurs caractéristiques.
Abréviations : virus de la fièvre jaune (YFV), virus de la dengue (DENV), virus West Nile (WNV), virus Zika (ZIKV), virus de l'encéphalite japonaise (JEV), virus de l'encéphalite à tique (TBEV), virus Usutu (USUV), virus chikungunya (CHIKV), virus Ross river (RRV), virus Semliki forest (SFV), virus o'nyong-nyong (ONNV), virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV), virus Mayaro (MAYV), virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCFV), virus de la fièvre de la Vallée du Rift (RVFV), virus bunyamwera (BUNV), virus de la stomatite vésiculaire (VSV), virus thogoto (THOV), virus de la fièvre catarrhale ovine (BTV), virus orungo (ORUV), virus de la peste porcine africaine (ASFV).

Biologie moléculaire des flavivirus

Génome et structure des flavivirus

Les virus ZIKV et YFV appartiennent à la famille *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*.
Les particules virales de flavivirus sont enveloppées, sphériques et d'un diamètre d'environ 50 nm. L'enveloppe de la particule contient deux protéines virales : la protéine d'enveloppe (E) et la protéine de membrane (M). Les particules infectieuses sont composées de 90 dimères

antiparallèles de la glycoprotéine E, recouvrant complètement la surface du virion. La capside virale, de symétrie icosaédrique, est composée de protéines de capside (C) et renferme le génome viral **(Figure 1)**. (Howley et al. 2021)

Le génome des flavivirus est constitué d'un unique segment d'ARN de polarité positive, d'une longueur d'environ 11 kb. Ce génome viral possède une coiffe en 5' et est dépourvu de queue poly-A en 3'. La coiffe permet d'initier la traduction, de stabiliser l'ARN viral (ARNv) et de contourner les défenses antivirales innées. Le génome code pour un unique cadre ouvert de lecture (d'environ 3400 codons) flanqué de régions non codantes en 5' et 3'. Celles-ci se composent d'environ 100 nucléotides et 400 à 700 nucléotides respectivement. Elles contiennent des structures d'ARN en *cis* et des séquences importantes pour l'expression et la réplication des gènes viraux, ainsi que pour la modulation immunitaire **(Figure 1)**. (Howley et al. 2021)

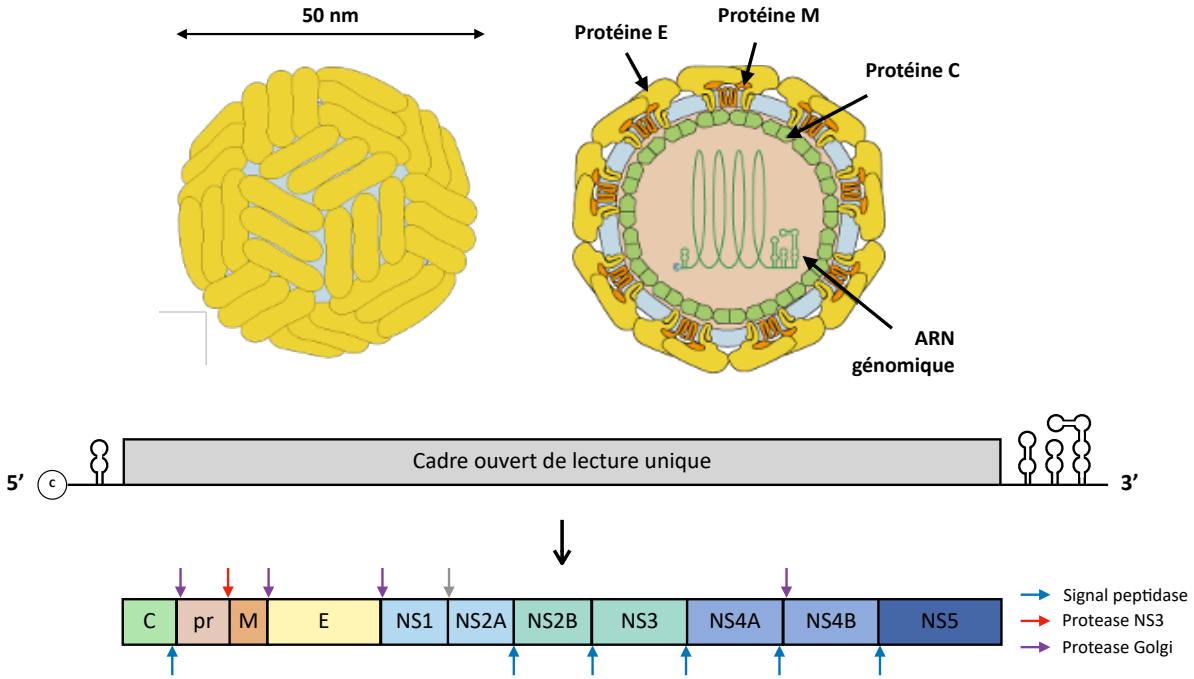


Figure 1 : Structure de la particule virale et du génome des flavivirus.
La particule virale mesure environ 50 nm de diamètre et est composée de protéines d'enveloppe (E, en jaune), de protéines de membrane (M, en orange) et de protéines de capside (C, en vert). Le génome viral est un ARN simple brin de polarité positive. Il contient un unique cadre ouvert de lecture et code pour une polyprotéine virale, composée de protéines structurales (C, prM, E) et de protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). Celles-ci sont clivées par des protéases virales et cellulaires (flèches). (*Adapté de ViralZone*).

Cycle viral des flavivirus

Les particules virales sont adsorbées à la surface de la membrane cellulaire suite à des interactions non spécifiques entre les protéines d'enveloppe E glycosylées et des facteurs cellulaires tels que des héparane-sulfates protéoglycanes (HSPG) **(Figure 2)**. Ces facteurs d'attachement permettent la rétention et la concentration des particules virales à la surface cellulaire, jusqu'à leur fixation plus spécifique par des récepteurs cellulaires. À ce jour, plusieurs types de récepteurs ont été décrits comme impliqués dans l'entrée des flavivirus dans différentes cellules cibles. Les lectines de type C, exprimées sur de nombreux types cellulaires tels que les cellules dendritiques, les macrophages ou les monocytes, lient les glycosylations de la protéine E de la particule virale (Lozach et al. 2005 ; Davis et al. 2006 ; Shimojima et al. 2014). Les protéines des familles TIM (i.e. TIM-1, TIM-3 et TIM-4) et TAM (i.e. TYRO3, AXL et MER) interagissent directement ou indirectement avec les phosphatidylsérines présentes dans l'enveloppe virale (Perera-Lecoin et al. 2014). Ces phospholipides permettent l'entrée virale dans la cellule en mimant la membrane des corps apoptotiques riche en ces molécules : ce mécanisme est appelé « mimétisme apoptotique ». L'internalisation de la particule virale médiée par ces récepteurs est effectuée par endocytose clathrine-dépendante. L'acidification de l'endosome au cours de l'endocytose entraîne plusieurs changements conformationnels des protéines d'enveloppe tels que leur trimérisation et l'exposition du peptide de fusion. L'enveloppe virale fusionne alors avec la membrane endosomale, permettant la libération de la capside virale dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les mécanismes de décapsidation sont à ce jour inconnus. L'ARNv est immédiatement pris en charge et traduit en polyprotéine par la machinerie cellulaire. Enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE), la polyprotéine virale est constituée de 3 protéines structurales et de 7 protéines non structurales : les protéines structurales (C, M et E) sont les seules protéines virales retrouvées au sein des virions, tandis que les protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) sont impliquées dans la réplication virale et l'échappement à la réponse immunitaire. Au niveau du RE, la libération de ces protéines est permise par les clivages de la polyprotéine par la protéase virale NS3 du côté cytoplasmique de la membrane du RE, ainsi que par des peptidases signal cellulaires, dans la lumière du RE. Les protéines non structurales néosynthétisées remodèlent alors la membrane du RE, formant des usines virales dans lesquelles a lieu la réplication du génome viral. De concert avec la protéine hélicase NS3, la protéine NS5 permet la transcription du génome viral, via son activité ARN-polymérase ARN-dépendante. Les anti-génomes de polarité négative

nouvellement synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN messagers et génomiques viraux. Ces derniers interagissent alors avec les protéines de capsides, et les nucléocapsides néo-synthétisées bourgeonnent ensuite dans la lumière du RE, leur permettant l'acquisition d'une enveloppe. Les virions néoformés sont ensuite transloqués vers l'appareil de Golgi via le réseau transgolgien, où le clivage du précurseur prM en protéine M par la furine cellulaire permet la formation de particules virales matures. La libération des particules virales matures dans le milieu extracellulaire est alors assurée par exocytose **(Figure 2)**. (Khaiboullina et al. 2019)

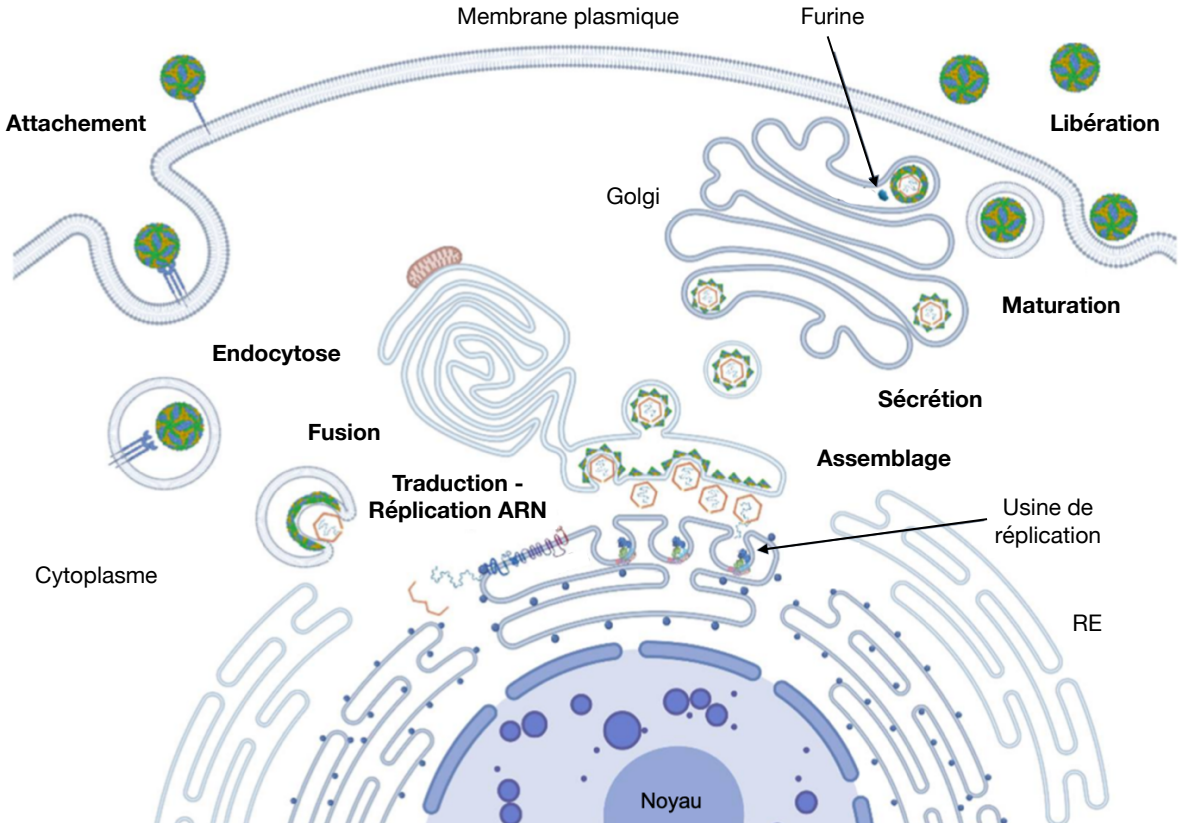


Figure 2 : Étapes du cycle viral des flavivirus.
Les particules virales sont concentrées à la surface de la membrane cellulaire par des facteurs d'attachements. Ensuite, la liaison à des récepteurs spécifiques entraîne l'internalisation des particules par endocytose clathrine-dépendante. L'enveloppe virale fusionne alors avec la membrane endosomale, libérant la capside virale dans le cytoplasme de la cellule. Après décapsidation, l'ARN viral est immédiatement traduit en polyprotéine au niveau du réticulum endoplasmique (RE). La polyprotéine enchâssée dans la membrane du RE est clivée par des protéases virales dans le cytoplasme, et cellulaires dans la lumière du RE. Les ARN viraux sont répliqués en anti-génomes qui servent de matrices pour la transcription et la synthèse de nouveaux ARN génomiques. Les protéines de capside traduites s'assemblent autour d'un nouvel ARN viral et bourgeonnent depuis la lumière du RE. Les virions néoformés sont ensuite transloqués vers l'appareil de Golgi où le clivage du précurseur prM en protéine M par la furine permet la formation de particules virales matures. Enfin, la libération des particules virales matures dans le milieu extracellulaire est assurée par exocytose. (*Adapté de Van den Elsen et al., 2021*)

Le virus Zika

Physiopathologie du virus Zika

Après une période d'incubation de 3 à 12 jours, bien que l'infection soit asymptomatique chez la majorité des personnes infectées (80%), certains individus développent des symptômes (20%). Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont peu sévères et non spécifiques à l'infection par ZIKV. Celles-ci comprennent de la fièvre, des douleurs articulaires, des maux de tête et des éruptions cutanées (Agumadu et al. 2018). Cependant, depuis 2015, il a été identifié que des symptômes neurologiques sévères sont également causés par l'infection par ZIKV. Ceux-ci peuvent affecter aussi bien les adultes que les nouveau-nés. En effet, les adultes peuvent notamment développer des syndromes de Guillain-Barré, caractérisés par une faiblesse voire une paralysie des membres inférieurs et/ou supérieurs. Leur incidence a été estimée à 0,24 ‰ cas d'infection par ZIKV (Cao-Lormeau et al. 2016 ; Mier-Y-Teran-Romero et al. 2018). Par ailleurs, les enfants nés de femmes infectées pendant la grossesse peuvent développer des syndromes neurologiques sévères tels que des troubles oculaires ou des malformations cérébrales, dont la microcéphalie. La prévalence de la microcéphalie chez les enfants nés de femmes infectées pendant la grossesse a été estimée à 2,3%. (Victor et al. 2017)

Le virus Zika possède un tropisme tissulaire large. En effet, le virus est notamment détecté dans le cerveau, le placenta, les yeux, les testicules, l'utérus, la peau et les ganglions lymphatiques (Silva 2020). Il infecte également un grand nombre de types cellulaires tels que les monocytes, les cellules dendritiques, les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Khaiboullina et al. 2019 ; Hamel et al. 2015).

Modes de transmission du virus Zika

ZIKV est un arbovirus majoritairement transmis par les moustiques du genre *Aedes*. Il circule au sein de 2 cycles distincts : un cycle sylvatique et un cycle urbain. Le cycle sylvatique correspond à la transmission du virus entre des primates non-humains, par des moustiques simiophiles tels que *Aedes dalzieli*, *Aedes fowleri* ou *Aedes furcifer*. Suite à l'introduction d'un homme dans le cycle sylvatique, un cycle urbain se met en place entre des Hommes et des moustiques anthropophiles. La capacité des vecteurs à transmettre ZIKV varie selon les espèces de moustique et est appelée « compétence vectorielle ». Le vecteur le plus

compétent pour la transmission interhumaine de ZIKV est *Aedes aegypti* mais *Aedes albopictus* est également capable de transmettre le virus. (Boyer et al. 2018)

Cependant, d'autres modes de transmission interhumaine de ZIKV existent : la transmission transplacentaire et la transmission par voie sexuelle. En effet, le virus peut être transmis *in utero* par les femmes enceintes infectées à leur fœtus, à travers la barrière placentaire. ZIKV peut également être transmis par les sécrétions génitales au cours de rapports sexuels, majoritairement de l'homme à la femme. (Boyer et al. 2018)

Enfin, depuis 2013, un nouveau mode de transmission est débattu : la transmission de la mère à l'enfant par allaitement. En effet, des cas d'infection de nourrissons allaités par des mères infectées ont été rapportés, cependant la présence des vecteurs moustiques rend difficile la démonstration formelle de ce mode de transmission (pour revue : Desgraupes et al. 2021 ; Van de Perre et al. 2021). Ce mode de transmission de ZIKV ainsi que ses mécanismes seront introduits plus en détails dans la partie consacrée à la transmission virale par allaitement.

Découverte et isolement du virus Zika

ZIKV a été découvert en 1947 dans la forêt de Zika en Ouganda lors de travaux de surveillance sur la circulation sylvatique de YFV **(Figure 3)**. Suite au développement d'une forte fièvre par l'un des macaques rhesus sentinelles, *Dick et al*. ont isolé ZIKV à partir d'un échantillon sanguin (Dick et al. 1952). L'année suivante, le virus a été isolé à partir de moustiques *Aedes africanus*. Ce n'est qu'en 1954 que les premiers cas d'infections humaines ont été décrits : 3 individus présentant des symptômes pouvant être causés par une arbovirose (fièvre, douleurs articulaires, etc…) ont été identifiés au Nigéria. Au cours des soixante années suivant la découverte du virus, seuls quelques cas sporadiques d'infections humaines ont été rapportés, notamment en Afrique (Ouganda, Tanzanie, Égypte, République centrafricaine, Sierra Leone, Gabon et Sénégal) mais également dans certains pays d'Asie (Inde, Malaisie, Philippines, Thaïlande, Viêt Nam et Indonésie). Des analyses génétiques et phylogénétiques ont révélé de nombreuses différences de séquences entre les souches virales circulant en Afrique et en Asie, révélant l'existence de 2 lignages distincts de ZIKV (Haddow et al. 2012).

Épidémies causées par le virus Zika

Une première épidémie dans l'archipel de Yap en 2007 - En 2007, la première épidémie décrite causée par ZIKV a eu lieu en Micronésie dans les îles de Yap **(Figure 3)**. L'augmentation du nombre de personnes développant des symptômes caractéristiques d'une arbovirose a poussé les médecins locaux à rechercher la présence de DENV chez ces patients. Cependant, le faible taux d'immunoglobulines de type M (IgM) spécifiques de DENV ainsi que le développement d'un symptôme rarement associé à ce virus (i.e. la conjonctivite) ont permis d'identifier ZIKV comme nouvel agent étiologique. L'étude de la séroprévalence de ZIKV révéla que plus de 70% des habitants de l'archipel avaient été infectés lors de cette épidémie (5000 habitants).

Une deuxième épidémie en Océanie en 2013-2014 - Un deuxième épisode épidémique a eu lieu en 2013-2014 en Polynésie Française, lors duquel plus de 50 000 cas d'infection ont été signalés. L'épidémie s'est ensuite propagée dans d'autres îles de l'océan Pacifique telles que la Nouvelle-Calédonie, les îles Cook ou l'île de Pâques **(Figure 3)**.

En Nouvelle-Calédonie, des cas importés de Polynésie française ont été signalés à partir de novembre 2013. L'épidémie a atteint un pic en avril et, en septembre, le nombre de cas confirmés atteignait 1 400, dont 35 cas importés.

En février 2014, une épidémie de ZIKV a été signalée dans les îles Cook. À la fin de l'épidémie, en mai 2014, 50 cas d'infection avaient été confirmés et plus de 900 cas avaient été suspectés.

En mars 2014, 40 cas d'infection par ZIKV avaient été suspectés sur l'Île de Pâques. Cependant, à la fin de l'année, 173 cas avaient été confirmés, présentant uniquement des symptômes décrits comme " légers ".

Une troisième épidémie en Amérique centrale et du Sud en 2015-2016 - Suite à l'introduction du virus au Brésil, une épidémie d'une ampleur sans précédent s'est développée en Amérique Centrale et du Sud, provoquant l'infection de 440 000 à 1 500 000 personnes **(Figure 3)**.

a). Introduction au Brésil

En février 2015, les autorités brésiliennes ont constaté des foyers de cas d'éruption cutanée dans l'État de Maranhão, dans le nord-est du Brésil. Les patients avaient développé une fièvre élevée, des douleurs musculaires et articulaires, des éruptions cutanées et des maux de tête, mais aucun cas grave n'avait été signalé. Les échantillons de 25 patients avaient été testés : 14 échantillons se sont révélés positifs pour DENV et tous les échantillons étaient négatifs pour les virus CHIKV, de la rubéole et de la rougeole. (PAHO 2016)

Les symptômes cliniques étant compatibles avec une infection par ZIKV, la présence de celui-ci dans les sérums des patients a été recherchée par RT-qPCR. Huit des 21 échantillons testés se sont révélés positifs. Malgré la similitude des symptômes cliniques, les autres échantillons ont donné des résultats négatifs en RT-PCR, probablement en raison de la courte (et faible) période de virémie (entre le 3e et le 5e jour après l'apparition des symptômes cliniques) (PAHO 2016). La comparaison des séquences de 2 échantillons positifs avec d'autres séquences connues de ZIKV a démontré une forte identité de séquence avec la lignée asiatique. (Zanluca et al. 2015)

En mai 2015, l'organisation panaméricaine de la santé a publié une alerte épidémiologique décrivant l'infection et donnant des recommandations pour tirer parti des systèmes de surveillance existants pour la dengue et le chikungunya afin d'accroître leur sensibilité pour détecter les cas possibles d'infection par ZIKV. L'alerte comprenait également des informations sur les tests de laboratoire, la gestion des cas, les mesures de prévention et de contrôle, ainsi que des recommandations aux voyageurs. (PAHO 2016)

L'épidémie a ensuite continué de se propager aux autres États du Brésil. En juillet 2015, ZIKV s'était répandu dans douze États : Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Roraima et São Paulo. (PAHO 2016)

En septembre 2015, le département de la santé de l'État de Bahia a rapporté 52 403 cas de ZIKV, correspondant à une incidence de 346 cas pour 100 000 habitants. (PAHO 2016)

b). Dissémination hors du Brésil

En octobre 2015, les autorités colombiennes ont confirmé à l'OMS les premiers cas de ZIKV dans le département de Bolivar. Neuf cas avaient été confirmés par le laboratoire national de référence de l'Institut national de la santé.

Le virus s'est ensuite propagé très rapidement aux pays voisins pendant les 3 mois suivants (Suriname, Salvador, Guatemala, Venezuela, etc), provoquant des épidémies considérables notamment dans les Antilles Françaises (i.e. Martinique et Guadeloupe). Un an après le premier signalement de dissémination de ZIKV en dehors du Brésil, le virus était endémique pour la quasi-totalité de l'Amérique centrale et du sud. **(Figure 3)**

Circulation du virus Zika de nos jours

En décembre 2021, 89 pays et territoires avaient des preuves documentées de la transmission autochtone de ZIKV par les moustiques. Depuis 2017, trois pays ont été ajoutés à la liste (l'Inde, la France et le Kenya (WHO 2022)), mais les Amériques restent le continent ayant la plus grande incidence de maladie à ZIKV dans le monde chaque année.

Inde - L'Inde a connu plusieurs épisodes épidémiques entre 2016 et 2018. Des cas d'infection ont été signalés dans les États du Gujarat en 2016, du Tamil Nadu en 2017 et du Rajasthan en 2018 (Yadav et al. 2019). En juillet 2021, l'Inde a signalé une nouvelle flambée de cas d'infection par ZIKV dans l'État du Kerala. Soixante-dix cas de ZIKV ont été confirmés par PCR en août 2021. Compte tenu de la large distribution du moustique vecteur, *Aedes aegypti*, et du vecteur de moindre compétence, *Aedes albopictus*, dans les États du Kerala et du Maharashtra, les conditions écologiques et épidémiologiques sont favorables à la transmission épidémique de ZIKV en Inde et à son endémicité potentielle. (WHO 2022)

France - Bien que de nombreux cas importés d'infections à ZIKV aient été signalés chez des voyageurs européens de 2015 à 2018, aucun cas autochtone n'a été documenté. En 2019, cependant, une transmission autochtone de ZIKV par les moustiques a été identifiée dans le département du Var, dans le sud-est de la France. En effet, le 9 octobre 2019, les autorités françaises ont signalé un cas de maladie autochtone de ZIKV à Hyères. Aucun antécédent de voyage dans des pays endémiques à ZIKV n'a été signalé pour le patient ou son partenaire. À la même période, deux autres cas probables de transmission autochtone de ZIKV ont été

identifiés dans la même région (l'apparition des symptômes pour les trois cas s'est déroulée 6 au 15 août 2019). Puisqu'il est probable que les trois cas résultent d'une transmission vectorielle de ZIKV fin juillet/début août, des activités de lutte antivectorielle et des enquêtes épidémiologiques ont été mises en place. Aucun autre cas d'infection par ZIKV n'a été signalé depuis. (WHO 2022)

Kenya - Des preuves de transmission de ZIKV ont été rapportées dans plusieurs pays d'Afrique. Cependant, les informations sur l'incidence actuelle et les tendances de la transmission de ZIKV restent limitées. Le seul pays où des preuves sérologiques de transmission autochtone ont été récemment obtenues est le Kenya. En effet, des études rétrospectives ont estimé la séroprévalence globale de ZIKV dans les comtés du Pokot occidental en 2016 et du Turkana en 2017 à 7,11 % et moins de 1 %, respectivement. (WHO 2022)

Amériques - L'épidémie de ZIKV dans les Amériques a atteint un pic au cours du premier semestre 2016. L'incidence a ensuite diminué dans la plupart des territoires entre 2017 et 2020 mais ceux-ci enregistrent toujours le plus grand nombre de cas de maladie à ZIKV dans le monde chaque année. En 2020, 22 885 cas de ZIKV ont été estimés en Amérique. Parmi ceux-ci, 2 742 (12 %) ont été confirmés en laboratoire. Certaines îles et territoires relativement petits semblent avoir interrompu la transmission. Cependant, la surveillance et la déclaration ne sont pas uniformes dans toute la région et ne sont pas toujours suffisamment sensibles pour détecter de faibles niveaux de transmission. Il est donc indispensable d'assurer une surveillance constante afin d'assurer la détection précoce d'une éventuelle réémergence de la transmission de ZIKV. (WHO 2022)

Risques d'émergence virale

ZIKV (ainsi que les arbovirus en général) circulait initialement dans un cycle sylvatique mais s'est adapté à un cycle urbain via des zones d'émergence, notamment en lisière de forêt (Weaver et al. 2010). Cette proximité de l'Homme et des forêts a conduit à une adaptation du virus à l'Homme et a donné lieu à des épidémies. Différents facteurs dus à la mondialisation ont favorisé l'émergence d'arbovirus, tels que la multiplication des voyages mondiaux, le changement climatique ou l'augmentation de la densité de population. En effet, la multiplication des échanges internationaux permet aussi bien l'expansion des virus (généralement par des voyageurs infectés) que de leurs vecteurs moustiques. Aujourd'hui, les

espèces *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* sont présentes dans la plupart des grandes villes d'Asie et sont très répandues en Amérique du Sud (Kraemer et al. 2015). Enfin, *Aedes albopictus* s'installe progressivement en Europe (ECDC 2021). Le changement climatique couplé à l'augmentation de la densité de population participe également à l'émergence d'arbovirus. En effet, la hausse des températures favorise la compétence vectorielle (Ciota et al. 2018) ainsi que l'installation des moustiques du genre *Aedes* dans de nouvelles régions (Carbajo et al. 2019). En effet, *Carbajo et al*. ont estimé que, d'ici 2030, l'aire de répartition d'*Aedes aegypti* pourrait doubler.

Le contexte mondial actuel semble donc de plus en plus propice à l'émergence de ZIKV, mais ce risque concerne également d'autres arbovirus tels que YFV.

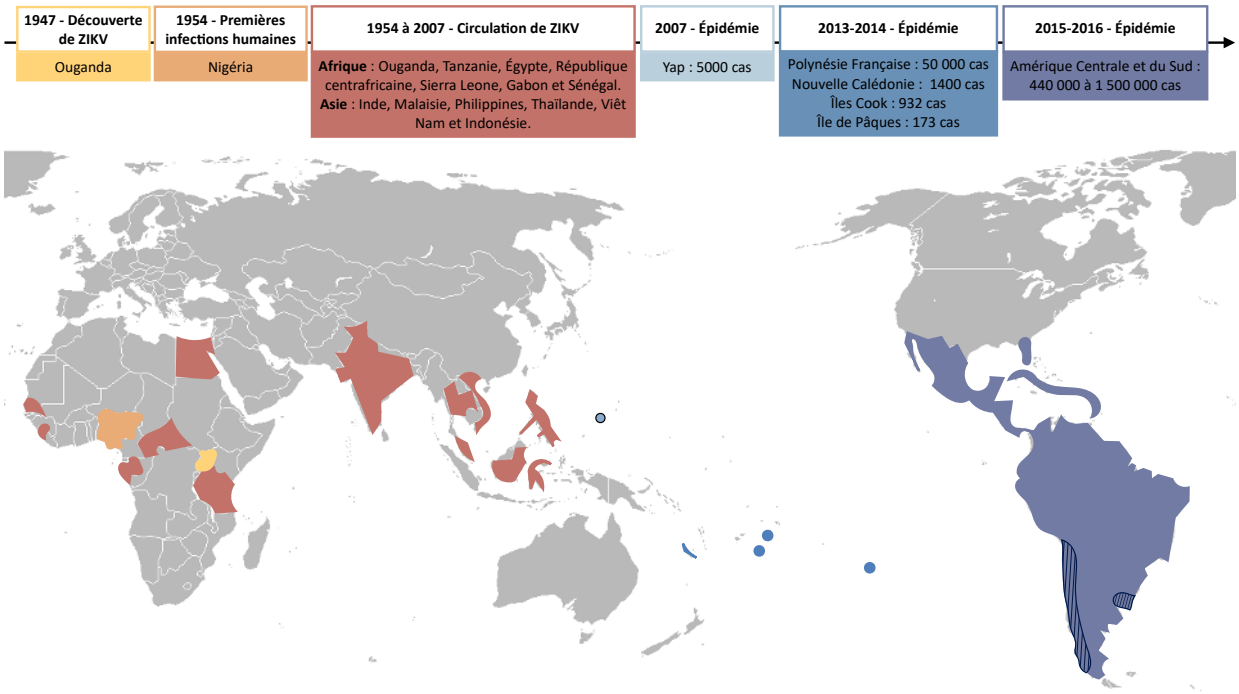


Figure 3 : Distribution géographique du virus Zika au cours du temps.
Cartographie représentant les pays ayant signalé une circulation active du virus Zika (ZIKV). Les dates clés sont indiquées, de la découverte du virus en 1947 à la dernière épidémie majeure en 2015-2016. Hachures : circulation suspectée. (*Composition originale*).

Le virus de la fièvre jaune

Physiopathologie du virus de la fièvre jaune

Après l'infection par YFV, une courte période d'incubation de 3 à 6 jours a lieu. Ensuite, la majorité des individus infectés restent asymptomatiques (55%) tandis que certains développent des symptômes cliniques modérés (33%) ou sévères (12%). (Johansson et al. 2014)

Chez l'Homme, la période symptomatique se divise en trois phases : la phase virémique, la phase de rémission et la phase d'intoxication. Pendant la phase virémique, les symptômes développés par les patients comprennent notamment de la fièvre, des frissons, des maux de tête, de la photophobie ou encore des nausées. Cette phase initiale peut être suivie d'une phase de rémission pendant laquelle ces symptômes disparaissent et la fièvre chute. Certains patients peuvent alors faire une forme abortive de la maladie et guérir à ce stade (33% des personnes infectées). Cependant, la phase d'intoxication concerne environ 12% des personnes infectées et conduit à une mortalité de 20% à 50% (Global Health CDC). Cette phase est caractérisée par le développement d'une fièvre hémorragique, aboutissant à un dysfonctionnement de multiples organes. (Monath et al. 2003)

Après inoculation de YFV au niveau de l'épiderme ou du derme, les canaux lymphatiques transportent les particules virales jusqu'aux ganglions lymphatiques. Le virus est alors relargué dans la circulation sanguine et dissémine à de nombreux organes tels que le foie, la rate, les reins, le cœur et le thymus (Monath et al. 2003). De nombreux types cellulaires sont permissifs à l'infection, notamment les hépatocytes, les cardiomyocites, les cellules épithéliales rénales, les fibroblastes, les cellules gliales et les neurones (Manso et al. 2015).

Développement de vaccins contre le virus de la fièvre jaune

La fièvre jaune provoquant des symptômes sévères et un taux de mortalité élevé, de nombreux pays ont tenté de mettre au point un vaccin efficace. Deux principaux vaccins ont été développés et utilisés au cours du XXème siècle : le vaccin développé par l'Institut Pasteur, qui s'est avéré neurotrope, et le vaccin actuel développé par Max Theiler et Hugh Smith. (Frierson et al. 2010)

En 1932, un vaccin vivant atténué a été mis au point par l'Institut Pasteur de Dakar, le « French Neurotropic Vaccine », par des passages successifs sur cerveau de souris. Bien que ce vaccin ait permis le déclin de la fièvre jaune dans de nombreux pays, celui-ci a provoqué l'apparition d'effets secondaires graves dont des encéphalites chez 1‰ personnes vaccinées. Une mortalité de 9% a été estimée chez les individus ayant développé une encéphalite post-vaccinale, provoquant l'arrêt de l'utilisation de ce vaccin. (Frierson et al. 2010)

Les vaccins utilisés aujourd'hui contre la fièvre jaune sont issus d'une souche virale atténuée (nommée 17D), développée en 1936 par M. Theiler et M. Smith. Ce vaccin 17D a été obtenu par 176 passages sur cellules de poulet, de souris et de singe. Deux souches dérivées du vaccin 17D sont utilisées de nos jours : la souche 17D-204 et la souche 17DD, obtenues après 235 et 287 passages sur embryon de poulet, respectivement. Ces deux souches présentent 99,9% d'identité de séquence et induisent une réponse immunitaire similaire chez les personnes vaccinées (Ferreira et al. 2018). Ces souches vaccinales confèrent une protection efficace et durable chez les personnes vaccinées. En effet, une dose unique du vaccin induit des titres élevés d'anticorps neutralisants spécifiques de YFV ainsi que des réponses cellulaires T mémoires robustes et durables, offrant une protection à vie (Ma et al. 2021).

Afin de comprendre les origines de l'atténuation, les séquences nucléotidiques des souches vaccinales et sauvages ont été comparées. Soixante-sept mutations ont été identifiées entre la souche sauvage Asibi et la souche vaccinale 17D-204. Les mutations responsables de l'atténuation sont probablement celles qui sont communes aux différentes souches vaccinales. La comparaison des séquences des souches vaccinales 17DD et 17D-204 a identifié 48 mutations communes (dont 22 mutations non-synonymes), notamment dans les gènes codant les protéines E, NS1 et NS3. Les origines de l'atténuation ont ainsi été associées notamment à la réponse humorale neutralisante, à la liaison des particules virales au récepteur cellulaire et à la fusion lors de l'entrée virale (Galler et al. 1997).

Modes de transmission du virus de la fièvre jaune

Le virus de la fièvre jaune est un arbovirus, majoritairement transmis par des moustiques du genre *Aedes*. Comme de nombreux arbovirus, il circule au sein d'un cycle sylvatique et d'un cycle urbain. Dans le cycle sylvatique, différentes espèces de moustiques assurent la transmission virale entre des primates non-humains (i.e. *Aedes africanus* en Afrique et les moustiques du genre *Haemogogus* et *Sabethes* en Amérique du Sud). Dans le cycle urbain, l'espèce de moustiques majoritairement impliquée dans la transmission interhumaine de YFV est *Aedes aegypti* (Yellow et al. 2022).

Seules les souches sauvages sont transmises par les moustiques. En effet, des tests de transmission de la souche 17D ont été réalisés en 1939 et ont révélé une compétence vectorielle nulle des moustiques pour la souche vaccinale (Whitman 1939). Depuis, il a été démontré que la souche 17D ne se réplique pas dans les intestins *d'Aedes aegypti* et n'atteint pas les glandes salivaires, empêchant sa transmission (Danet et al. 2019).
En revanche, la souche vaccinale peut être transmise de la mère à l'enfant par allaitement (Couto et al. 2010 ; Traiber et al. 2011 ; Kuhn et al. 2011). Plusieurs cas de transmission ont été rapportés en 2009, obligeant l'OMS à suspendre la vaccination des femmes allaitantes ne vivant pas dans des régions endémiques (CDC 2010). Ce mode de transmission de YFV sera détaillé dans la partie consacrée à la transmission virale par allaitement.

Épidémiologie du virus de la fièvre jaune

Origines de la fièvre jaune - L'origine de la fièvre jaune a longtemps été débattue, cependant, des études épidémiologiques et génétiques soutiennent l'hypothèse selon laquelle YFV aurait émergé en Afrique **(Figure 4)** (Bryant et al. 2007). La fièvre jaune aurait été rencontrée pour la première fois par des navigateurs européens dans les îles Canaries, du Cap vert, de São Tomé et dans le golfe du Benin. La fièvre jaune, ainsi que son vecteur, auraient été introduits en Amérique soit par Christophe Colomb en 1492, soit par le commerce d'esclaves de pays endémiques d'Afrique au XVIème siècle. En effet, une maladie pouvant correspondre à la fièvre jaune a affecté l'équipage de Christophe Colomb après la bataille de Vega Real en mars 1494 à Hispaniola (correspondant aujourd'hui à la République dominicaine), provoquant le décès d'un tiers des hommes (Gianchecchi et al. 2022). Par la suite, au XVIème siècle, des épidémies qualifiées de « vomito negro » (vomissements de sang), associées à un taux de

mortalité élevé, ont été décrites dans les îles des Caraïbes, ressemblant fortement aux symptômes hémorragiques provoqués par la fièvre jaune (Sabbatani et al. 2007).

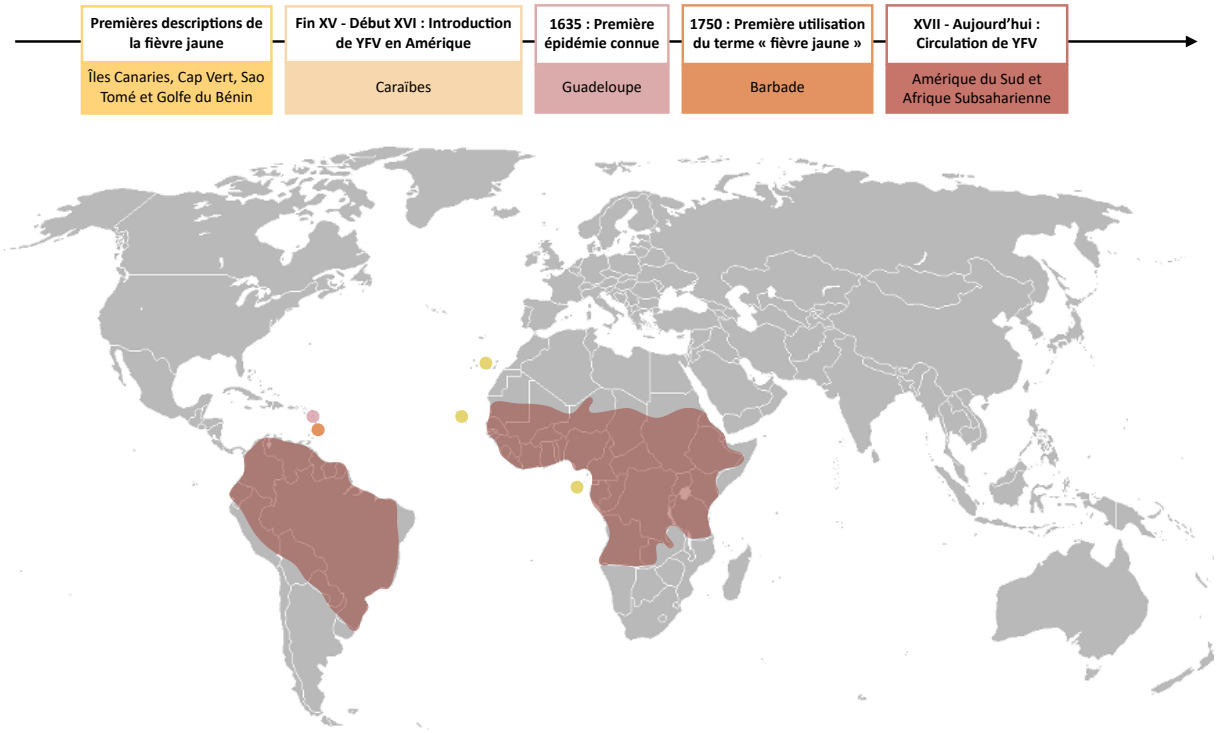


Figure 4 : Distribution géographique du virus de la fièvre jaune au cours du temps.
Cartographie des pays ayant signalé une circulation du virus de la fièvre jaune (YFV). Les dates clés sont indiquées, des premières descriptions de la maladie de la fièvre jaune à la circulation du virus de nos jours. (*Composition originale*).

Du XVIIème au XIXème siècle - La première épidémie connue a été décrite par Raymond Bréton en 1635 lorsqu'une épidémie eut lieu en Guadeloupe (Sabbatani et. al 2007). De nombreuses épidémies ont ensuite eu lieu, au cours des XVIIème et XVIIIème siècles, en Amérique (White et al. 1959). Au milieu du XVIIIème siècle, lors d'une épidémie à la Barbade, le nom « fièvre jaune » a été attribué à la maladie pour la première fois (Barrett et al. 2009). Par la suite, de grandes épidémies se sont produites tout au long des XVIIIème et XIXème siècles dans les îles des Caraïbes, aux États-Unis, en Afrique, en Europe, aux Antilles et en Amérique du Sud **(Figure 4)**. (Barrett et al. 2009)

Du XXème siècle à nos jours - Au XXème siècle, le développement de vaccins très efficaces dans les années 1930 ainsi que la mise en place de mesures de contrôle des moustiques ont permis l'éradication du virus en Europe et aux États-Unis. Cependant, depuis 2009, la fièvre jaune est considérée comme une maladie réémergente dans certaines régions d'Afrique

subsaharienne et d'Amérique du Sud tropicale, où l'accès à la vaccination reste faible. (Barrett et al. 2009)

De nos jours, les épidémies de fièvre jaune ont lieu plus fréquemment et de manière plus importante en Afrique qu'en Amérique du Sud. Récemment, des épidémies ont concerné les pays suivants (WHO Disease Outbreak News) :

- En 2020 : Ouganda, Sud-Soudan, Éthiopie, Guinée, Gabon, Sénégal et Togo.
- En 2021 : Cameroun, Tchad, République centrafricaine, Côte d'Ivoire, République démocratique du Congo, Ghana, Niger, Nigeria et République du Congo.
- En 2022 : Ouganda et Kenya.

Des épidémies ont également touché la Guyane française en 2020 et le Venezuela en 2021 (WHO Disease Outbreak News). L'OMS estime que YFV cause 200 000 cas d'infection par an dans le monde, dont 30 000 conduisent à un décès.

LA GLANDE MAMMAIRE

Anatomie et fonction de la glande mammaire

La glande mammaire est une glande alvéolaire exocrine dont la principale fonction biologique est de produire et d'excréter le lait maternel. La glande mammaire mature est composée d'une structure épithéliale enchâssée dans le tissu adipeux. Au niveau du mamelon, les canaux galactophores s'élargissent en sinus galactophores puis se ramifient, générant une vingtaine de lobes. Chaque lobe est composé de 20 à 40 lobules, contenant 10 à 100 alvéoles. Celles-ci constituent les unités sécrétrices de la glande mammaire **(Figure 5)**.

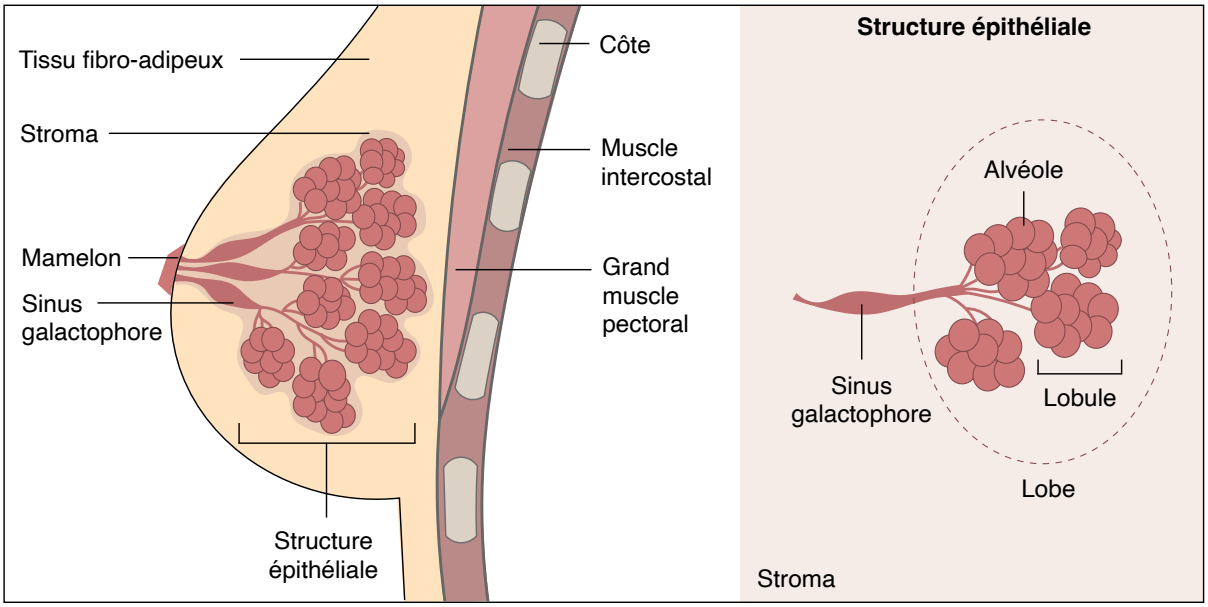


Figure 5 : Organisation générale de la glande mammaire humaine.
La glande mammaire mature est composée d'une structure épithéliale enchâssée dans le tissu fibro-adipeux. Au niveau du mamelon, les canaux galactophores s'élargissent en sinus galactophores puis se ramifient, générant une vingtaine de lobes. Chaque lobe est composé de 20 à 40 lobules, contenant 10 à 100 alvéoles. (*Composition originale*).

Développement de la glande mammaire

Contrairement à la plupart des autres organes, les glandes mammaires connaissent deux phases de développement, avant et après la naissance. La structure inachevée de la glande mammaire à la naissance reste à ce stade chez l'homme, tandis que chez la femme, d'importants changements hormonaux s'opèrent à la puberté puis lors de la gestation, entraînant une seconde phase de maturation, composée de 4 évènements : le développement du tissu épithélial mammaire (mammogénèse), la différenciation fonctionnelle de l'épithélium mammaire permettant le sécrétion de lait (lactogenèse), le maintien de la sécrétion de lait (galactopoïèse) et la régression de l'épithélium glandulaire après l'arrêt de l'allaitement (involution). En parallèle, le milieu intra-glandulaire joue un rôle important dans le contrôle du déroulement des événements liés à la morphogenèse de la glande mammaire. (Dzięgelewska et al. 2018)

Développement embryonnaire

Au cours de la période embryonnaire deux bourgeons mammaires se forment à partir de 4 semaines de gestation. Ils se développent par prolifération des cellules basales de l'épiderme ventral du fœtus, suite à la sécrétion de molécules par les cellules mésenchymateuses présentes dans le bourgeon mammaire (Dzięgelewska et al. 2018). Au 5ème mois de grossesse, ces bourgeons s'invaginent dans le mésoderme sous-jacent. Cette invagination initie le développement des canaux galactophores qui sont essentiels à la circulation du lait maternel. Au 8ème mois, ces canaux s'ouvrent et se différencient en profondeur en unités glandulaires.

Développement pubertaire

Au début de la puberté, l'hormone de croissance (GH) et les œstrogènes induisent la prolifération et la migration des cellules situées aux extrémités de la structure épithéliale des bourgeons mammaires, aboutissant à l'allongement et la ramification des canaux galactophores. La morphogenèse des canaux galactophores se produit de concert avec le début de la fonction ovarienne sous l'effet des hormones de reproduction. En effet, à chaque cycle d'œstrus, les alvéoles et les canaux galactophores subissent une expansion suivie d'une phase de régression lorsque les niveaux d'hormones ovariennes augmentent et diminuent, respectivement. (Dzięgelewska et al. 2018)

Développement gestationnel

Au début de la gestation, les niveaux de progestérone augmentent, provoquant l'expansion des branches épithéliales latérales et des bourgeons alvéolaires. Sous l'effet synergique de la progestérone et de la prolactine, les structures alvéolaires se différencient en structures lobulo-alvéolaires capables de produire du lait pendant la lactation.

Après le sevrage de la progéniture, la glande subit une régression post-lactation appelée involution. Celle-ci se déroule en deux étapes. La première phase de l'involution de la glande mammaire est réversible et la reprise de la tétée rétablit la production de lait maternel. Lors de cette première phase d'involution, l'accumulation de lait maternel dans les alvéoles mammaires entraîne l'apoptose de cellules luminales alvéolaires mais aucun changement morphologique majeur n'est induit (Macias et al. 2012). La seconde phase de l'involution est irréversible et débute au bout de 48h après l'arrêt de la tétée. Au cours de cette phase, une apoptose massive des cellules luminales alvéolaires se produit, ainsi que la dégradation de la membrane basale et la réduction des structures lobulo-alvéolaires développées en début de gestation. (Dzięgelewska et al. 2018)

L'épithélium mammaire

La glande mammaire est constituée de différents types cellulaires : des cellules souches, des cellules épithéliales, des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires, participant à la structure et à la fonction de l'organe.

La structure épithéliale est une bicouche qui compose les parois des canaux galactophores **(Figure 6)**. Celle-ci est composée de cellules luminales (également appelées « lactocytes ») dont le pôle apical est en contact avec la lumière des canaux, et de cellules myoépithéliales localisées au pôle basal des lactocytes. Les cellules luminales expriment les protéines EpCAM et CD24 (Phillips et al. 2014) ainsi que les kératines 8 et 18 (Ren et al. 2021), tandis que les cellules myoépithéliales expriment l'intégrine CD49f (Phillips et al. 2014) ainsi que les kératines 5 et 14, permettant leur identification par immunomarquage. Les cellules luminales se différencient à partir des cellules souches en progéniteurs luminaux immatures (exprimant EpCAM, CD24 et CD49f) (Phillips et al. 2014) puis en cellules luminales matures qui synthétisent et sécrètent le lait maternel dans les alvéoles. Celui-ci est ensuite éjecté des alvéoles vers les canaux galactophores sous l'effet de la contraction des cellules myoépithéliales (Inman et al. 2015). Ces dernières sont stimulées par l'ocytocine, une

hormone produite dans l'hypothalamus et sécrétée dans la circulation sanguine par la glande pituitaire (Lee et al. 2009).

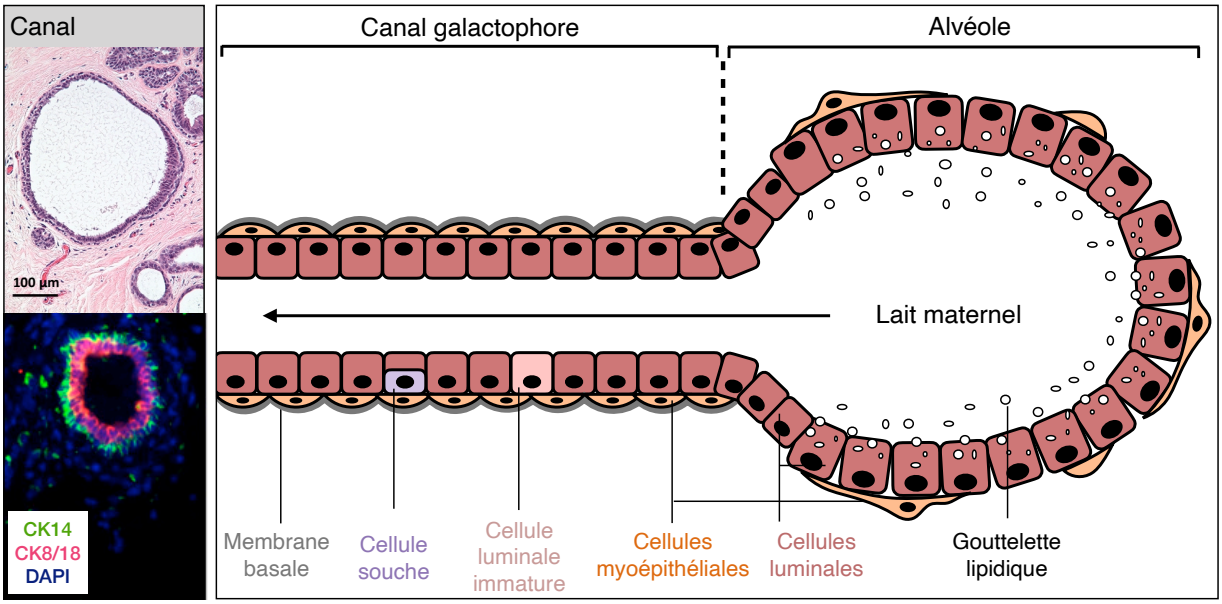


Figure 6 : Structure de l'épithélium mammaire.
L'épithélium mammaire est une bicouche composée de cellules luminales et de cellules myoépithéliales. Les cellules luminales se différencient à partir des cellules souches en progéniteurs luminaux immatures puis en cellules luminales matures qui synthétisent et sécrètent le lait maternel dans les alvéoles. Celui-ci est ensuite éjecté des alvéoles vers les canaux galactophores sous l'effet de la contraction des cellules myoépithéliales. Une coupe histologique de canal galactophore est observée (haut) (figure de *Pellacani et al., 2019*). Les cellules luminales et myoépithéliales peuvent être immunodétectées à l'aide d'anticorps spécifiques des cytokératines 8/18 et 14 respectivement, comme observé ici par immunofluorescence (bas) (figure de *Ren et al., 2021*). (*Composition originale*).

Comparaison des glandes mammaires humaines et murines

Les deux différences majeures entre les glandes mammaires humaines et murines sont leur nombre et leur morphologie. En effet, l'Homme possède une paire unique de glandes mammaires thoraciques tandis que la souris possède 5 paires de glandes mammaires, réparties le long d'un axe cranio-caudal : les glandes cervicales, 2 paires de glandes thoraciques, les glandes abdominales et les glandes inguinales (Veltmaat et al. 2013). Par ailleurs, la morphologie de la glande mammaire chez l'Homme est hémisphérique tandis que celle de la souris présente un aspect plutôt plan **(Figure 7)**. Cette différence morphologique est due à l'absence de lobes et lobules dans la structure épithéliale mammaire de la souris (Visvader et al. 2009). En effet, les canaux galactophores forment un arbre rudimentaire et peu ramifié, enchâssé dans le stroma mammaire. Plutôt fibreux chez l'Homme, le stroma mammaire murin est riche en adipocytes et contient peu de tissu conjonctif fibreux **(Figure 8)** (McNally et al. 2017).

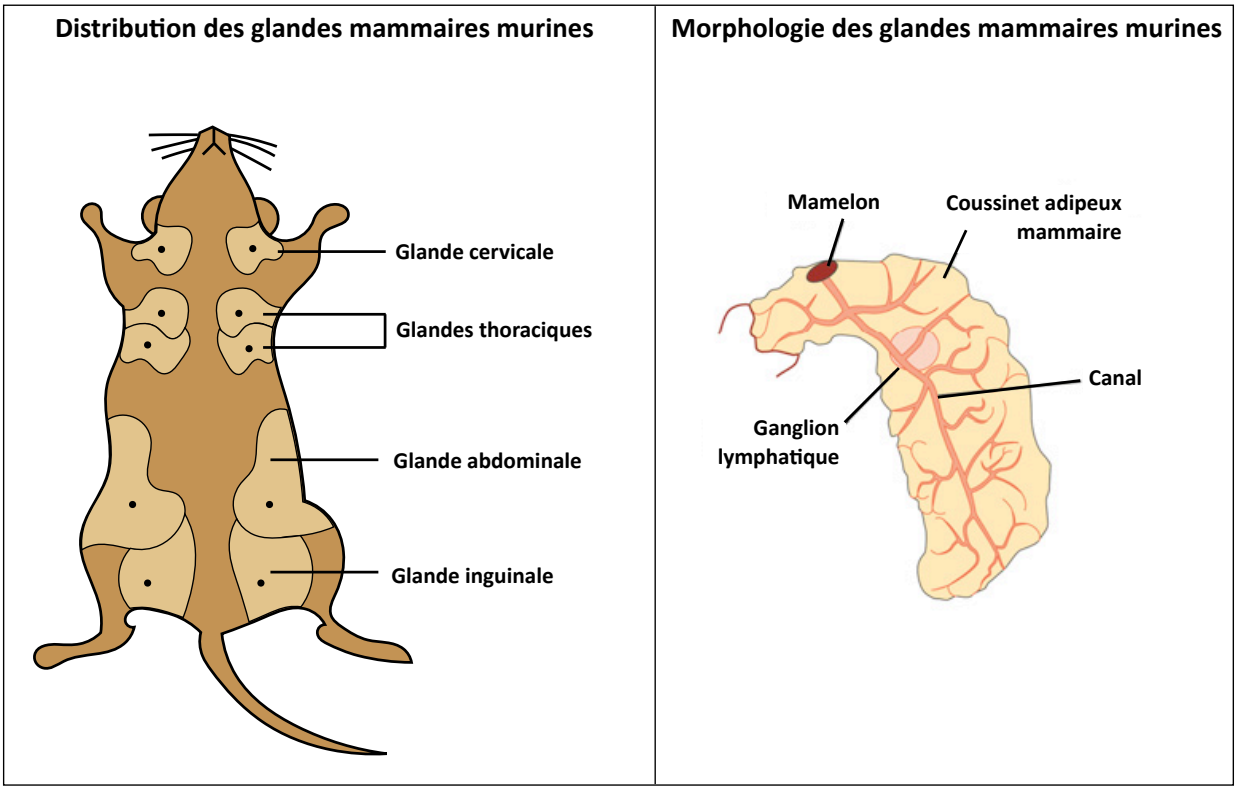


Figure 7 : Distribution et morphologie des glandes mammaires chez la souris.
La souris possède 5 paires de glandes mammaires, réparties le long d'un axe cranio-caudal : les glandes cervicales, 2 paires de glandes thoraciques, les glandes abdominales et les glandes inguinales. Contrairement aux glandes mammaires humaines qui sont hémisphériques, les glandes mammaires chez la souris présentent un aspect plutôt plan, dû à l'absence de lobes et lobules dans la structure épithéliale mammaire murine. Un ganglion lymphatique est présent au niveau des glandes mammaires abdominales. (Morphologie de la glande mammaire : *Visvader et al., 2009*) (*Composition originale*).

Cependant, de nombreux points communs existent entre les glandes mammaires de ces deux espèces. En effet, la structure générale de l'épithélium mammaire, la diversité et la fonction cellulaire, les étapes et les mécanismes de développement de la glande mammaire ainsi que les contrôles hormonaux sont très semblables (McNally et al. 2017). L'épithélium mammaire murin est également une bicouche composée de cellules luminales et myoépithéliales, impliquées dans la production et l'éjection du lait maternel, respectivement (McNally et al. 2017). Par ailleurs, ces deux types de cellules épithéliales expriment les mêmes marqueurs moléculaires que chez l'Homme (i.e. CD24, EpCAM, CD49f, etc…) permettant de les identifier par cytométrie en flux (Sleeman et al. 2006 ; Nguyen et al. 2019). Concernant le développement des glandes mammaires, bien qu'une partie du développement ait lieu pendant la période fœtale, la majeure partie de la maturation de la glande mammaire se produit après la naissance, sous le contrôle des hormones reproductives féminines. Ensuite, le même cycle de développement que chez l'humain se met en place à chaque gestation :

mammogénèse, lactogenèse puis involution après le sevrage de la progéniture (McNally et al. 2017).

Malgré les différences morphologiques entre les glandes mammaires humaines et murines, la diversité cellulaire ainsi que les mécanismes de développement et fonctionnement de la glande mammaire sont conservés entre les deux espèces, faisant du modèle murin un outil essentiel à l'étude de certains processus liés à la glande mammaire.

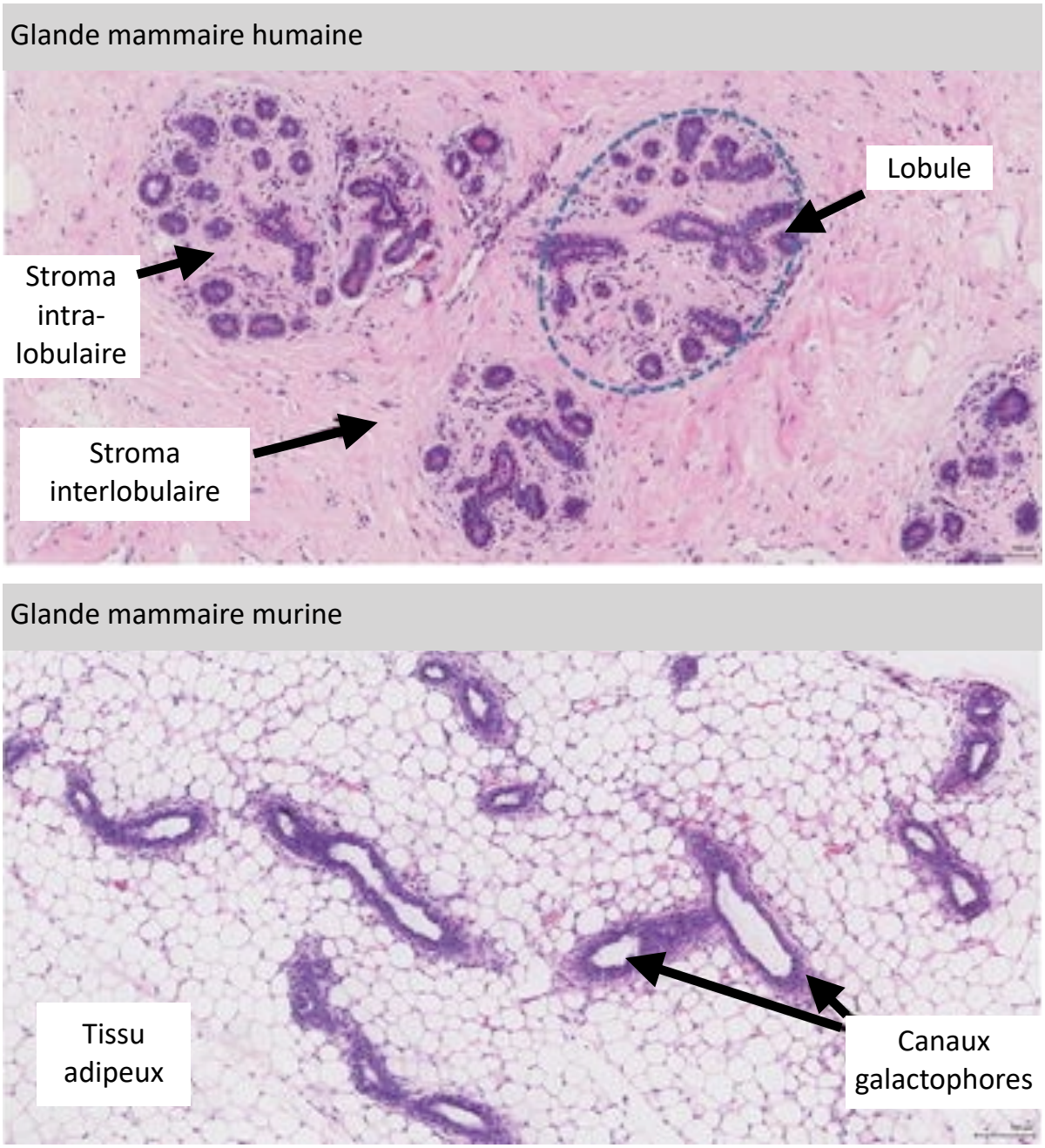


Figure 8 : Coupes histologiques de glandes mammaires humaine et murine.
Coupes colorées à l'hématoxyline et à l'éosine de glande mammaire humaine (en haut) et murine (en bas). Sur la coupe de glande mammaire humaine, des lobules épithéliaux ainsi qu'un stroma collagène intralobulaire et interlobulaire sont observés. Dans la glande mammaire de souris, les canaux épithéliaux de la glande mammaire sont entourés d'une gaine de collagène dans un tissu riche en adipocytes. (figure de *McNally et al., 2016*)

LE LAIT MATERNEL

L'allaitement : une pratique culturelle hétérogène

L'allaitement maternel permet de maintenir le lien entre la mère et son enfant après la naissance. Contrairement au lien mère-fœtus prénatal, assuré par les échanges sanguins à travers le placenta, le lien post-natal entre la mère et son nouveau-né lors de l'allaitement n'est pas systématique. Cette pratique culturelle est répartie de manière hétérogène dans le monde : selon l'UNICEF, 20% des enfants qui vivent dans les pays à hauts revenus ne reçoivent jamais de lait maternel, contre seulement 4% dans les pays à faibles et moyens revenus.
L'OMS recommande d'initier l'allaitement maternel après la naissance et de le maintenir exclusivement pendant les six premiers mois à un an de vie, en fonction des besoins du nouveau-né et de la mère. Il a été démontré que l'allaitement maternel présente de nombreux avantages pour les nouveau-nés. Non seulement il répond aux besoins nutritionnels du nourrisson en lui fournissant de l'énergie et des nutriments, il favorise également le développement cognitif et protège le nouveau-né contre certaines maladies infectieuses et chroniques (WHO Breastfeeding).

Composition du lait maternel

Le lait maternel est une émulsion de globules gras (crème) immergés dans une solution plasmatique. Les globules gras sont composés d'un cœur de triglycérides entouré d'une membrane lipidique tandis que la solution plasmatique (lait écrémé) est composée de micelles de caséine insolubles baignant dans le petit-lait (lactosérum). Ce dernier est particulièrement riche en glucides (lactose), en protéines (e.g. α-lactalbumine (LA), lactoferrine (LF), lysozyme, Ig, etc.), en sels minéraux et en vitamines. Le lait contient également des cellules maternelles (e.g. des cellules luminales, des cellules myoépithéliales, des progéniteurs luminaux, des cellules souches, des précurseurs myéloïdes, des granulocytes immatures et différentes cellules lymphoïdes (cellules T, ILC, MAIT…)) **(Figure 9)** (Witkowska-Zimny et al. 2017)(Molès et al. 2017). Les cellules immunitaires du lait maternel ont une origine mucosale et ont été activées avant de migrer à la glande mammaire (Molès et al. 2017a).

Bien que les principaux éléments constitutifs du lait soient communs à tous les mammifères, des variations dans la composition du lait maternel existent selon les espèces. La composition

du lait maternel varie également entre les individus d'une même espèce et dépend de différents facteurs tels que l'alimentation, la santé de la mère et du nouveau-né, ou encore, du stade de lactation (Rigourd et al. 2020)(Witkowska-Zimny et al. 2017). En effet, afin de répondre à l'évolution des besoins du nourrisson au cours de sa croissance, la composition du lait maternel évolue entre les premières heures et les premières semaines après l'accouchement. Le premier lait (1-2 jours post-partum), appelé colostrum, joue un rôle essentiel dans le transfert de l'immunité maternelle post-natale car celui-ci est riche en facteurs immuns maternels tels que les leucocytes. Au fur et à mesure que la composition du colostrum en lactose et en lipides augmente, le lait devient plus nutritif et est d'abord appelé "transitionnel" (8-12 jours post-partum), puis "mature" (26-30 jours post-partum) (Ballard et al. 2013). La concentration moyenne en lipides du lait à 6 semaines, 6 mois et 12 mois post-partum serait aux alentours de 35 mg/mL, 40 mg/mL et 52 mg/mL respectivement (Siziba et al. 2019). La teneur en matière grasse varie également selon de nombreux autres facteurs tels que l'alimentation de la mère, le moment de la journée, le début/la fin de la tétée, les conditions de conservation du lait maternel, etc… (Witkowska-Zimny et al. 2017) Concernant les cellules immunitaires du lait, des analyses par cytométrie en flux ont révélé que le colostrum contiendrait environ 146 000 leucocytes/mL tandis que le lait transitionnel et le lait mature contiendraient environ 27 500 et 23 650 leucocytes/mL respectivement (Trend et al. 2015). Ainsi, dans le lait mature, les leucocytes constitueraient une minorité des cellules du lait chez les femmes en bonne santé (<2%), tandis que les cellules les plus abondantes seraient des cellules épithéliales de glande mammaire (98%). (Witkowska-Zimny et al. 2017) **(Figure 9)**

Comme mentionné précédemment, l'expression différentielle de certains marqueurs de surface par les cellules de glande mammaire permet d'identifier ces types cellulaires par cytométrie en flux. En effet, les cellules épithéliales luminales expriment fortement le CD24 et faiblement le CD49f tandis que les cellules myoépithéliales expriment, à l'inverse, faiblement le CD24 et fortement le CD49f. Les cellules immunitaires expriment, quant à elles, le CD45. (Phillips et al. 2014)

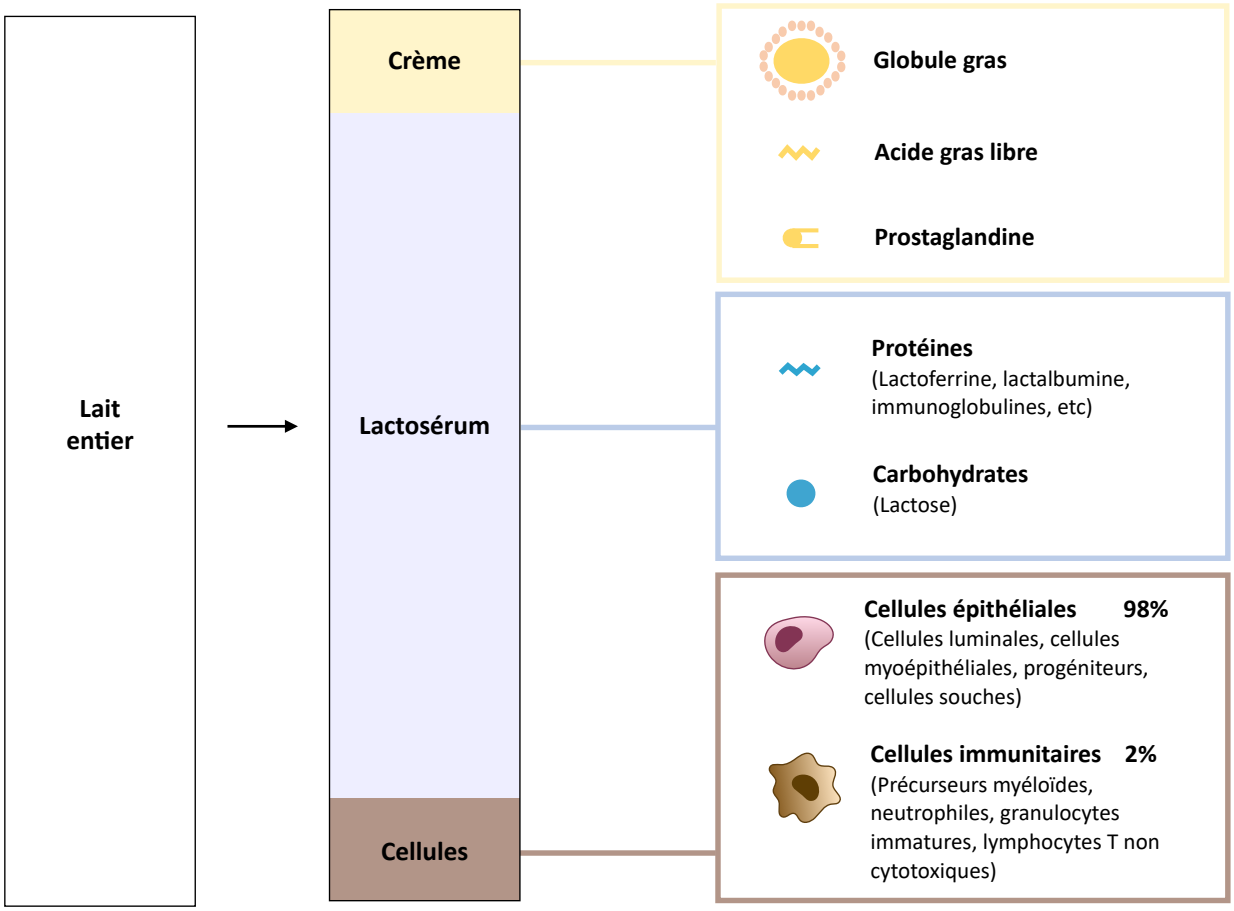


Figure 9 : Composition du lait maternel humain.
Le lait maternel entier peut être séparé, par centrifugation, en plusieurs fractions : la crème, le lactosérum et le culot cellulaire. La crème est composée de lipides tels que des globules gras, des acides gras libres et des prostaglandines. Le lactosérum est riche en protéines (lactoferrine, lactalbumine, immunoglobulines, etc) et en carbohydrates (lactose). Enfin, les cellules du lait maternel humain mature sont majoritairement des cellules épithéliales (luminales, myoépithéliales, progéniteurs et cellules souche) mais également des cellules immunitaires (précurseurs myéloïdes, neutrophiles, granulocytes immatures, lymphocytes T non cytotoxiques). (*Composition originale*).

LA BARRIÈRE INTESTINALE

Après l'ingestion de lait maternel infecté, le virus doit franchir une barrière épithéliale afin de se disséminer dans l'organisme de l'hôte (i.e. la barrière tonsillaire, la barrière intestinale, ou même la barrière respiratoire en début d'allaitement ou chez les nourrissons atteints de dysphagie). Bien que plusieurs barrières épithéliales se trouvent sur le trajet du lait infecté dans l'organisme du nourrisson, la dissémination virale se fait très probablement à travers la barrière intestinale, notamment en raison de sa grande surface d'échange et de ses capacités d'adsorption.

Anatomie du système digestif

Le système digestif permet de décomposer les aliments ingérés afin d'absorber les nutriments qui les composent. L'appareil digestif est composé du tube digestif ainsi que de glandes accessoires qui facilitent la digestion **(Figure 10)**. Malgré leur nom, ces organes digestifs accessoires sont essentiels au fonctionnement de l'appareil digestif (i.e. glandes salivaires, foie, vésicule biliaire et pancréas). Le tube digestif est unidirectionnel et mesure environ 7,6 mètres de long. Il débute à la cavité buccale et se poursuit en pharynx, œsophage, estomac, intestin grêle et gros intestin pour répondre aux besoins fonctionnels du corps, avant d'atteindre l'anus. Chaque organe digestif accessoire contribue à la décomposition des aliments. Dans la bouche, les dents et la langue entament la digestion mécanique, tandis que les glandes salivaires initient la digestion chimique. Une fois dans l'intestin grêle, la digestion du bol alimentaire se poursuit grâce aux sécrétions enzymatiques de la vésicule biliaire, du foie et du pancréas. (Université de Californie - Medicine LibreTexts)

Structure et fonction de la barrière intestinale

La barrière intestinale constitue l'interface entre le milieu extérieur et le milieu intérieur de l'organisme. Une barrière intestinale fonctionnelle permet l'absorption des nutriments et des liquides mais empêche le passage de substances nocives telles que les toxines ou certains agents pathogènes. La dysfonction de la fonction de barrière a été impliquée dans de nombreuses pathologies telles que des allergies alimentaires (Perrier et al. 2011) ou le syndrome du côlon irritable (Zhou et al. 2009). L'épithélium intestinal est une vaste surface d'échanges d'environ 300m^2 composée de trois niveaux de compaction : les plis de Kerckring

(plis transversaux des parois intestinales), les villosités et les cryptes intestinales (invaginations de l'épithélium intestinal dans le lumen) et les microvillosités (localisées sur la surface des cellules épithéliales).

Les différents types cellulaires qui composent l'épithélium intestinal permettent à la barrière d'exercer ses fonctions mécaniques, chimiques et immunologiques.

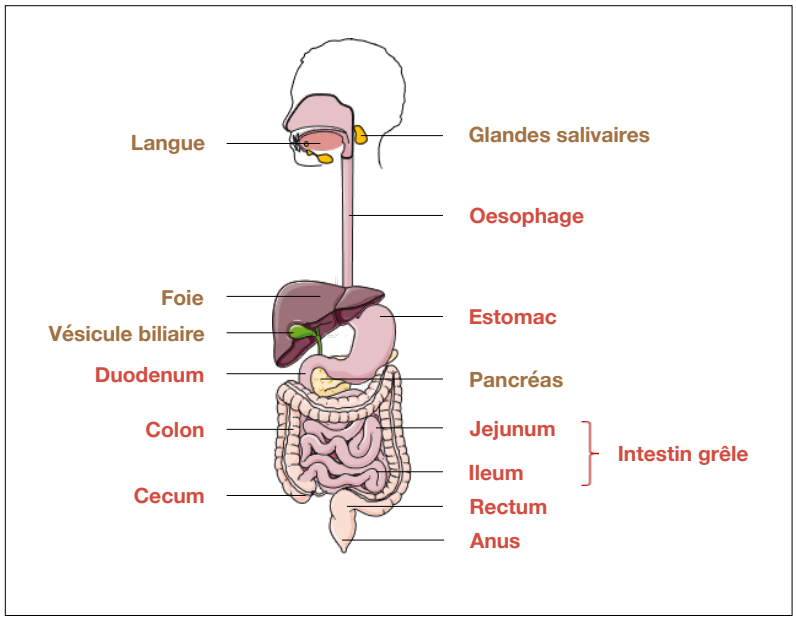


Figure 10 : L'appareil digestif chez l'Homme.
Le système digestif humain est composé du tube digestif (texte en rose) ainsi que de glandes accessoires qui facilitent la digestion (texte en marron). Le tube digestif commence à la bouche et se transforme en œsophage, en estomac, en intestin grêle et en gros intestin pour répondre aux besoins fonctionnels du corps, avant d'atteindre l'anus. Les organes digestifs accessoires sont la langue, les glandes salivaires, la vésicule biliaire, le foie et le pancréas. (*Composition originale*).

L'épithélium intestinal

La muqueuse intestinale représente une vaste surface d'échange et est composée de plusieurs niveaux de compaction : les invaginations, les cryptes et les villosités, ainsi que les microvillosités à la surface de l'épithélium. L'épithélium intestinal est monostratifié et polarisé. En effet, le pôle apical de l'épithélium est en contact avec le lumen intestinal tandis que le pôle basolatéral est en contact avec la lamina propria. Des cellules souches intestinales résident à la base ou à proximité des cryptes intestinales et génèrent continuellement les différents types cellulaires qui composent l'épithélium intestinal. Les types de cellules différenciées sont soit absorbants (les entérocytes et les cellules Microfold (cellules M)), soit sécrétoires (les cellules caliciformes sécrétant du mucus, les cellules de Paneth sécrétant des substances antimicrobiennes, les cellules entéroendocrines sécrétant des hormones et les cellules "Tuft" sécrétant des cytokines chimiosensibles/immunomodulatrices). Ces cellules différenciées migrent vers l'extrémité de la villosité à l'exception des cellules de Paneth qui s'enfoncent plus loin dans la crypte à mesure de leur maturation **(Figure 11)**.

Les entérocytes

Les entérocytes sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium intestinal. En effet, dans l'intestin grêle, ils représentent environ 80 % des cellules de l'épithélium. Ils assurent l'étanchéité de la barrière intestinale et permettent le transport de molécules du lumen vers le tissu conjonctif et les vaisseaux sanguins (Atlas of plant and animal histology 2022).

À leur surface apicale, les entérocytes possèdent des microvillosités permettant d'augmenter la surface d'échange avec le lumen intestinal. Plusieurs mécanismes permettent aux molécules de la lumière intestinale de franchir la monocouche entérocytaire : par diffusion passive libre, par diffusion passive facilitée, par transport actif, par transcytose ou par voie paracellulaire. (Atlas of plant and animal histology 2022)

L'éthanol et de nombreux lipides traversent les entérocytes par diffusion passive libre tandis que le glucose, certains lipides et les acides aminés franchissent les entérocytes par transport passif facilité ou par transport actif. En effet, le glucose franchit la membrane apicale de l'entérocyte par co-transport couplé à un gradient de sodium (permettant au glucose de pénétrer dans la cellule contre le gradient de concentration en glucose) via le transporteur de glucose sodique SGLT. Il est ensuite libéré de la cellule au niveau de la membrane basale via le transporteur GLUT2. (Atlas of plant and animal histology 2022)

Certaines molécules, telles que les immunoglobulines, pénètrent dans les entérocytes par endocytose récepteur-dépendante et sont transportées vers les domaines membranaires basolatéraux par transcytose. La transcytose débute par la formation de vésicules à la base des microvillosités qui fusionnent ensuite avec des endosomes. Ces derniers libèrent de nouvelles vésicules qui fusionnent avec les membranes basolatérales par exocytose. De cette façon, les molécules échappent à la voie de dégradation lysosomale (Atlas of plant and animal histology 2022). La transcytose peut également avoir lieu dans le sens inverse, de la sous-muqueuse vers le lumen, notamment pour le transport des IgA du compartiment vasculaire.

Enfin, l'eau et les ions franchissent l'épithélium intestinal par la voie paracellulaire.

Les cellules Microfold (« cellules M »)

Les cellules M sont majoritairement localisées dans l'épithélium recouvrant les follicules lymphoïdes intestinaux ("follicle-associated epithelium", FAE). Les cellules M assurent le transport de microbes luminaux par transcytose et participent ainsi à la surveillance immunitaire des muqueuses en fournissant les bactéries ainsi transportées aux cellules immunitaires sous-jacentes (Dillon et al. 2019). Les cellules M intestinales se distinguent

morphologiquement des entérocytes adjacents d'une part par l'absence de microvillosités sur leur surface apicale et d'autre part par la présence d'une poche intra-épithéliale à leur surface basolatérale qui contient des lymphocytes B et T et occasionnellement des cellules dendritiques (Kucharzik et al. 2000). Par leur capacité de transcytose accrue, les cellules M participent également à l'éducation du système immunitaire.

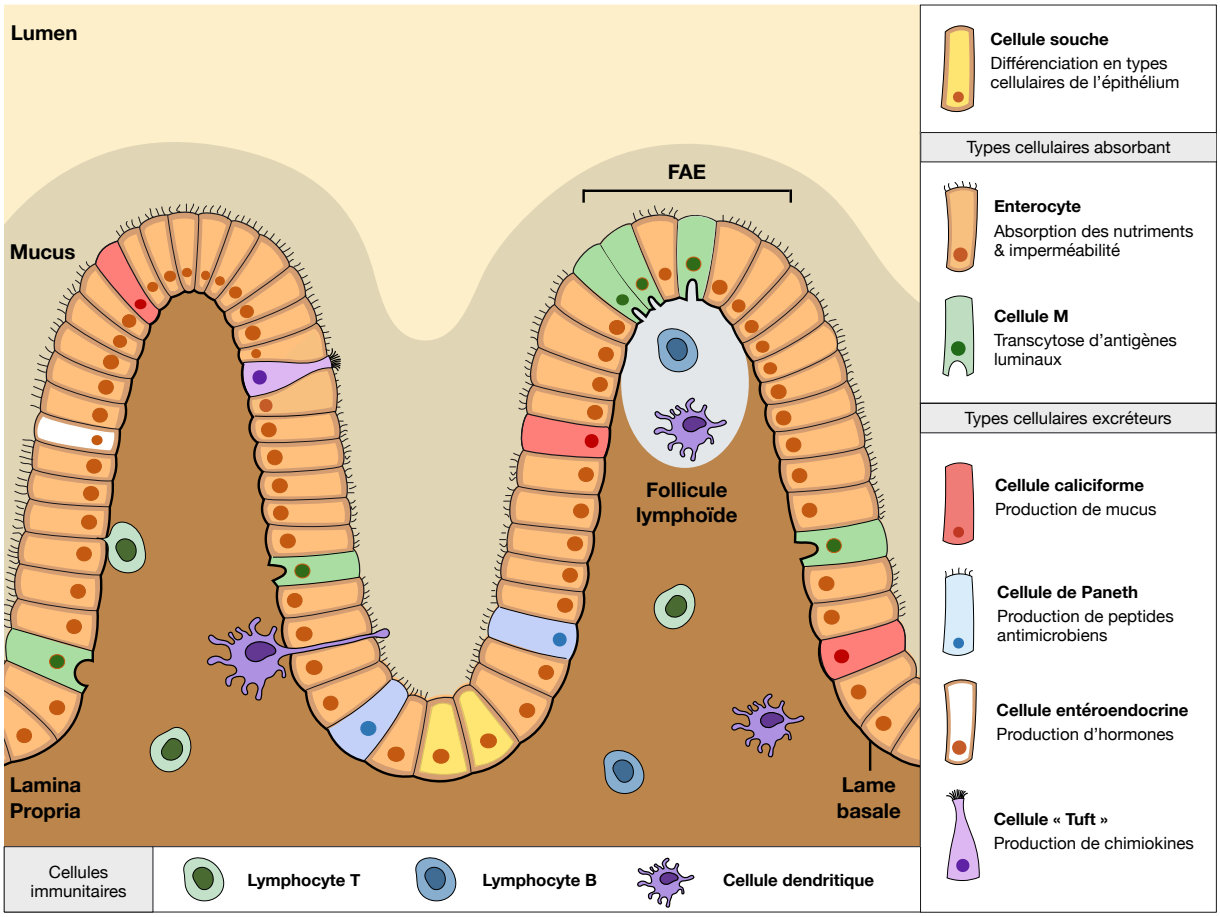


Figure 11 : Structure de l'épithélium intestinal.
L'épithélium intestinal est composé de différents types cellulaires qui sont soit absorbants (les entérocytes et les cellules Microfold (cellules M)), soit sécrétoires (les cellules caliciformes, les cellules de Paneth, les cellules entéroendocrines et les cellules "Tuft"). Les cellules caliciformes sécrètent du mucus, les cellules de Paneth sécrètent des substances antimicrobiennes, les cellules entéroendocrines sécrètent des hormones et les cellules "Tuft" sécrètent des cytokines chimiosensibles/immunomodulatrices. Tous ces types cellulaires se différencient à partir de cellules souches intestinales résidant à la base ou à proximité des cryptes intestinales. Des cellules immunitaires sont présentes sous l'épithélium intestinal. Elles sont soit directement ancrées dans l'épithélium, soit libres dans la lamina propria ou encore, regroupées en amas appelés follicules lymphoïdes. L'épithélium situé au niveau de ces follicules lymphoïdes (FAE, « follicle-associated epithelium ») est enrichi en cellules M. (*Composition originale*).

Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes assurent la production du mucus intestinal. Elles sécrètent des glycoprotéines de mucine, principaux composants macromoléculaires du mucus. Différents

types de cellules caliciformes peuvent être identifiés en fonction de leur emplacement et de leur fonction. En effet, les cellules caliciformes de la crypte colique et de l'intestin grêle sécrètent en cas de stimulation (e.g. par l'acétylcholine) tandis que les cellules caliciformes coliques superficielles sécrètent constamment pour maintenir la couche de mucus interne (Dao et al. 2022).

Les cellules de Paneth

Contrairement aux autres types cellulaires de l'épithélium intestinal, après leur différenciation, les cellules de Paneth s'enfoncent plus en profondeur dans la crypte à mesure de leur maturation. Elles peuvent alors être distinguées des cellules souches intestinales par leur aspect morphologique colonnaire et par la présence de granules éosinophiles dans leur cytoplasme. Ces granules contiennent de nombreuses protéines et peptides qui, après sécrétion, permettent de moduler le microbiome intestinal et agir sur la réponse inflammatoire (e.g. α-défensines, lysozyme, TNF, IL-1β, etc). Ces composants sont assemblés en granules et conditionnés par un vaste réseau de réticulum endoplasmique et d'appareil de Golgi. Certains composants des granules ne sont pas produits directement par les cellules de Paneth mais y sont collectés et ajoutés aux granules. Par exemple, les IgA sont produites par les plasmocytes de la lamina propria puis sont accumulées et ajoutées aux granules des cellules de Paneth. Les granules sont ensuite libérés dans la lumière intestinale par la surface apicale de la cellule de Paneth et exercent un rôle microbiocide contre les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus enveloppés. Les granules des cellules de Paneth sont sécrétés à la fois de manière constitutive et en réponse à une exposition à un agent pathogène (Lueschow et al. 2020).
Par ailleurs, alors que la plupart des cellules épithéliales sont rapidement remplacées en quelques jours, les cellules de Paneth peuvent persister pendant près d'un mois dans l'épithélium (Lueschow et al. 2020).

Les cellules entéroendocrines

Les cellules entéroendocrines sont les cellules endocrines les plus abondantes dans l'organisme mais ne représentent que 1 % des cellules de l'épithélium intestinal (Worthington et al. 2015). Elles produisent et sécrètent des peptides en réponse aux stimuli des nutriments présents dans la lumière intestinale. En fonction de leur emplacement dans l'intestin, elles libèrent une série d'hormones peptidiques qui agissent soit localement sur les terminaisons

nerveuses et les cellules de la paroi intestinale, soit sur des organes à distance (e.g. pancréas) après libération dans la circulation sanguine. Outre leur rôle dans la détection des nutriments, les cellules entéroendocrines peuvent également reconnaître les agents pathogènes. Elles expriment des récepteurs de type Toll (« Toll-Like Receptors ») ainsi que des récepteurs spécifiques aux métabolites produits par certaines bactéries commensales de l'intestin. Suite à la détection d'agents pathogènes, ces cellules stimulent les cellules immunitaires voisines par la production d'hormones et de cytokines (Worthington et al. 2015).

Les cellules « Tuft »

Les cellules "Tuft" sont présentes dans de nombreux tissus tels que les voies respiratoires, la vésicule biliaire, le thymus, le pancréas, l'urètre et le tube digestif. Le nom "Tuft" (en français "touffe") provient de la morphologie en brosse de sa bordure apicale. Les cellules "Tuft" ont un corps cellulaire en forme de bouteille et possèdent un col apical étroit à partir duquel une touffe de microvillosités s'étend dans la lumière intestinale. Ces microvillosités sont plus longues et plus compactes que celles des entérocytes et sont connectées au réseau de microfilaments et de microtubules. Certaines cellules "Tuft" possèdent des projections latérales de leur membrane plasmique qui pénètrent dans les cellules adjacentes et atteignent leur noyau. Celles-ci pourraient servir de voie de transport de cargos moléculaires entre la cellule « Tuft » et les cellules adjacentes. De plus, des protubérances membranaires semblables à des neuropodes s'étendent le long de la lame basale et participent à la signalisation paracrine. (Hendel et al. 2022)

Systèmes de défense du tube digestif

La lumière de tube digestif étant en contact avec le milieu extérieur, plusieurs niveaux de défenses existent dans l'appareil digestif afin de prévenir le passage de substances nocives dans l'organisme. Dans la lumière de l'intestin, les sucs biliaires ainsi que les acides gastriques et pancréatiques dégradent les antigènes et bactéries pathogènes. Dans l'intestin, quatre acteurs majeurs assurent la fonction de barrière : le microbiote intestinal, le mucus et les sécrétions de peptides antimicrobiens, l'épithélium intestinal et le tissu lymphoïde associé aux intestins (« gut-associated lymphoid tissue », GALT) **(Figure 12)**.

La barrière microbiologique (le microbiote intestinal)

La flore commensale est continuellement en contact avec l'épithélium intestinal et inhibe la colonisation des agents pathogènes par différents mécanismes (e.g. par production de bactériocines, par modification du pH luminal, par compétition pour les nutriments nécessaires à la croissance des bactéries pathogènes).

La barrière chimique (le mucus et les peptides antimicrobiens)

Le mécanisme de défense suivant est la couche de mucus. Celui-ci est composé de mucines sécrétées par les cellules caliciformes et protège la flore commensale. Le mucus contient également des IgA qui permettent la neutralisation des agents pathogènes et favorisent le maintien de la flore commensale. Les peptides antimicrobiens produits par les cellules de Paneth génèrent un gradient dans la couche de mucus et contribuent à l'élimination des bactéries pathogènes.

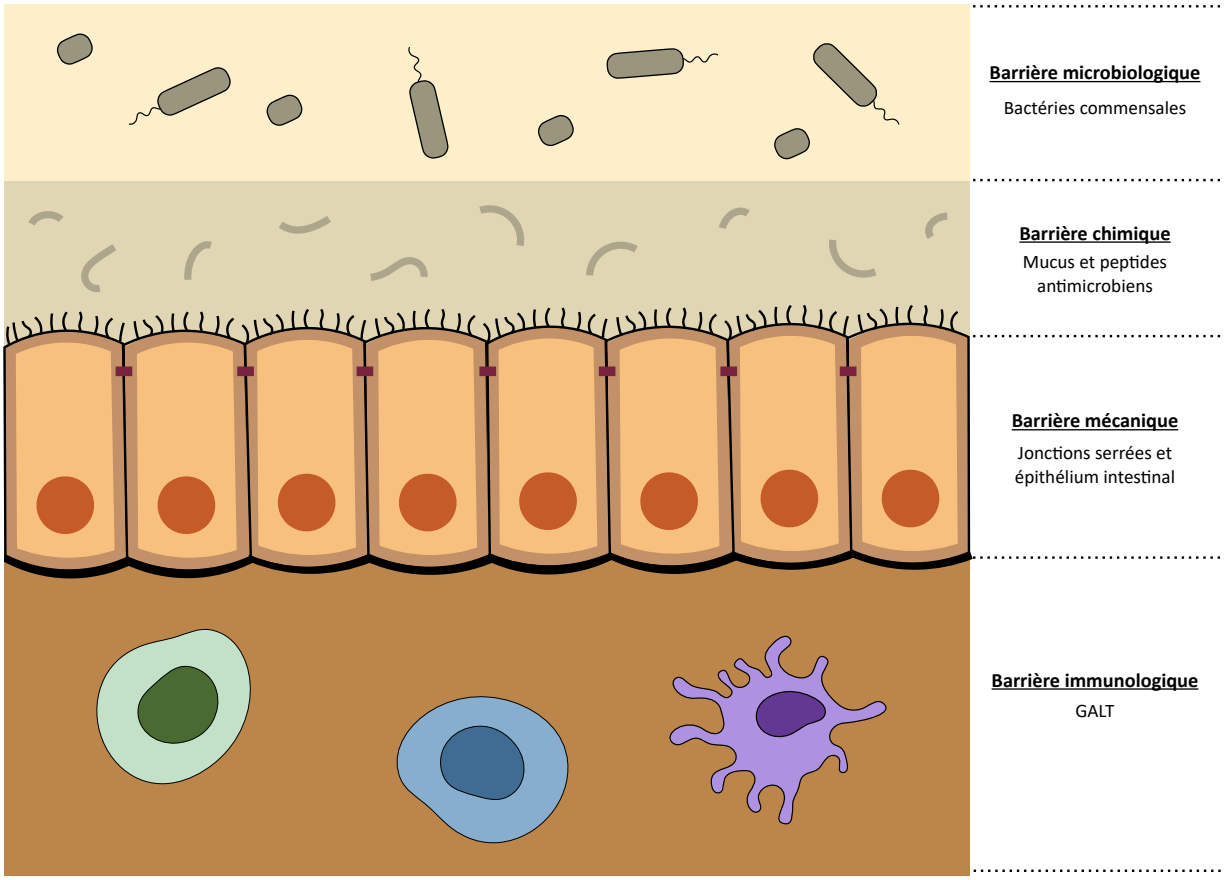


Figure 12 : Systèmes de défenses dans le tube digestif.
Le système de défense dans le tube digestif est constitué de 4 acteurs majeurs : le microbiote intestinal (barrière microbiologique), le mucus et les peptides antimicrobiens (barrière chimique), l'épithélium intestinal (barrière mécanique), et le tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT, « gut-associated lymphoid tissue ») (barrière immunologique). (*Composition originale*).

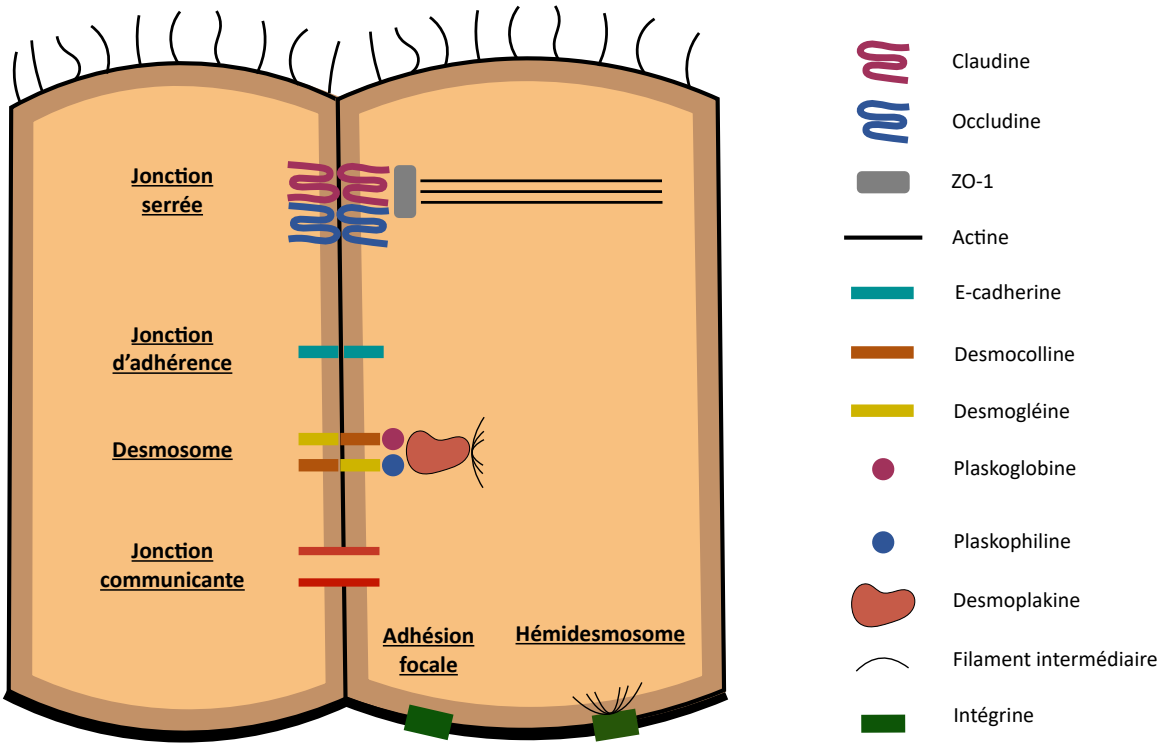


Figure 13 : Les jonctions intercellulaires de la barrière intestinale.
Des complexes jonctionnels entre les cellules épithéliales de la barrière intestinale assurent sa fonction de barrière. Six grands types de jonctions cellulaires existent : les jonctions serrées, les jonctions d'adhérence, les desmosomes, les jonctions communicantes, les adhésions focales et les hémidesmosomes. Les jonctions serrées sont composées de claudines et d'occludines, liées à la protéine zonula occludens 1 (ZO-1) qui assure la liaison avec le cytosquelette d'actine. Les jonctions d'adhérence sont composées d'E-cadherines. Les desmosomes sont composés de desmogleine, de desmocolline, de plakoglobine, de plakophiline et de desmoplakine, qui assurent la liaison aux filaments intermédiaires du cytosquelette. Les jonctions communicantes servent de ponts cytoplasmiques entre les cellules adjacentes et permettent le transport de petites molécules. Les adhésions focales et les hémidesmosomes sont composés d'intégrines et permettent l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. (*Composition originale*).

La barrière mécanique (l'épithélium intestinal)

La fonction de barrière mécanique est assurée par la présence de complexes jonctionnels entre les cellules épithéliales. Six grands types de jonctions cellulaires existent dans l'épithélium intestinal : les jonctions serrées, les jonctions d'adhérence, les desmosomes, les jonctions communicantes, les adhésions focales et les hémidesmosomes **(Figure 13)**.

Les complexes jonctionnels apicaux sont constitués d'un réseau de protéines de jonction serrée (les claudines et les occludines). Ils sont ancrés dans la cellule via le cytosquelette d'actine filamenteux. Les protéines de zonula occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) assurent la liaison des protéines de jonction serrée transmembranaires avec le cytosquelette cellulaire.

Les jonctions d'adhérence (composées de protéines E-cadherine) interagissent avec le cytosquelette d'actine via les cadhérines afin de favoriser l'adhésion cellule-cellule.

De même, les desmosomes permettent l'adhésion aux cellules voisines via l'interaction des protéines de desmosomes (desmogleine, desmocolline, plakoglobine, plakophiline et desmoplakine) avec les filaments intermédiaires du cytosquelette.
Les jonctions communicantes servent de ponts cytoplasmiques entre les cellules adjacentes et sont essentielles à la communication et au transport de petites molécules.
Les adhésions focales et les hémidesmosomes favorisent l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire par l'interaction des intégrines avec les filaments d'actine ou avec les filaments intermédiaires, respectivement.
Ces six grandes jonctions jouent un rôle central dans l'adhésion et la communication épithéliales ainsi que dans la perméabilité intestinale. (Orr et al. 2019)

La barrière immunologique (le tissu lymphoïde associé aux intestins)

Au niveau des muqueuses de l'organisme, le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (« mucosa-associated lymphoid tissue », MALT) joue un rôle essentiel dans l'activation de la réponse immunitaire. Au niveau du tube digestif, l'ultime système de défense de la barrière intestinale est le tissu lymphoïde associé aux intestins (« gut-associated lymphoid tissue », GALT) composé de nombreuses cellules immunitaires. Celles-ci sont soit directement résidantes dans l'épithélium intestinal (e.g. lymphocytes intra-épithéliaux, cellules dendritiques envoyant des projections vers la lumière intestinale), soit libres dans la lamina propria (e.g. macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes), ou encore, regroupées en amas appelés follicules lymphoïdes (e.g. plaques de Peyer).

Les lymphocytes intra-épithéliaux sont directement enchâssés dans l'épithélium intestinal. Leur phénotype étant similaire à celui des lymphocytes T cytotoxiques, ils libèrent des cytokines lorsqu'ils rencontrent des antigènes et provoquent ainsi la mort des cellules cibles infectées. Les lymphocytes intra-épithéliaux comprennent essentiellement des lymphocytes T activés appartenant à deux groupes principaux : ceux exprimant un récepteur T αβ (TCR) ou un TCR γδ (Sheridan et al. 2010). Des cellules dendritiques sont également enchâssées dans l'épithélium intestinal et émettent des projections à travers la monocouche, leur permettant de reconnaître des antigènes directement dans la lumière intestinale. (Coombes et al. 2008)

Plusieurs types de cellules immunitaires résident dans la lamina propria : des granulocytes, des mastocytes, des cellules dendritiques, des macrophages, des plasmocytes, des

lymphocytes B et des lymphocytes T (Hunyady et al. 2000). Certaines cellules dendritiques de la lamina propria émettent des extensions dendritiques à travers l'épithélium et détectent ainsi le contenu bactérien de la lumière intestinale afin de les transmettre aux lymphocytes T présents dans la lamina propria (Farache et al. 2013). Ces lymphocytes T sont déjà activés et prêts à mettre en place une réponse immunitaire adaptative. (Newberry et al. 2016)

Dans la lamina propria, certaines cellules immunitaires se regroupent et forment des follicules lymphoïdes. Ceux-ci peuvent être isolés au sein de la lamina propria ou situés directement sous l'épithélium, tels que les plaques de Peyer. Les plaques de Peyer sont en contact avec le FAE, riche en cellules M, et permettent ainsi la surveillance des antigènes transportés par transcytose par les cellules M. Dans les plaques de Peyer, des phagocytes mononucléaires, tels que les cellules dendritiques et les macrophages, ainsi que des lymphocytes B déclenchent des réponses immunitaires spécifiques de l'antigène rencontré (Kobayashi et al. 2019). Les plaques de Peyer jouent un rôle essentiel dans l'immunité intestinale et sont présentes au nombre d'environ 200 dans l'intestin grêle humain, chez l'adulte. Près de la moitié des plaques de Peyer sont concentrées dans les 25 cm distaux de l'ileum. (Kobayashi et al. 2019)

Bien que plusieurs niveaux de défense existent dans l'intestin, certains virus ont développé des mécanismes leur permettant de franchir la barrière intestinale.

TRANSMISSION DE VIRUS PAR ALLAITEMENT

Les trois principaux virus humains transmis par allaitement

De nombreuses études ont fait état des avantages de l'allaitement maternel, tels que la protection contre les infections respiratoires, l'obésité et le syndrome de mort subite du nourrisson (Uwaezuoke et al. 2017). Cependant, bien que l'allaitement soit bénéfique pour le nourrisson, il peut également transmettre des agents chimiques provenant de la circulation sanguine maternelle, tels que la nicotine (Primo et al. 2013), l'alcool (May et al. 2016) ou des drogues (Bartu et al. 2016), ainsi que des agents pathogènes (Lawrence et al. 2004). Historiquement, le premier virus identifié comme étant transmis par le lait (par J.J. Bittner en 1936) était le virus de la tumeur mammaire de la souris (« mouse mammary tumor virus », MMTV) (Andervont et al. 1946). Depuis, trois virus humains ont été reconnus comme étant efficacement transmis de la mère à l'enfant pendant l'allaitement, entraînant une infection chronique chez le nouveau-né : le cytomégalovirus (CMV), le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et le virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) (Lawrence et al. 2004 ; Van de Perre et al. 2021).

Le taux de transmission du VIH au nourrisson par l'allaitement a été estimé à 14%. Différents facteurs de risques ont été identifiés et comprennent notamment la charge virale dans le lait, la durée de l'allaitement, la gravité de l'immunodéficience maternelle et la réponse immunitaire de la mère au VIH. (Prendergast et al. 2019)

Concernant le virus HTLV-1, la transmission par allaitement se produit chez 10 à 25 % des nourrissons allaités. D'après des données épidémiologiques, virologiques et expérimentales, différents facteurs de risque sont associés à une transmission accrue du virus. En effet, il a été montré que la transmission du virus HTLV-1 augmente avec la durée de l'allaitement, la charge provirale dans le sang et dans le lait maternel, ainsi qu'avec les titres d'anticorps dans le sang maternel. (Prendergast et al. 2019)

Enfin, le CMV est détecté dans le lait maternel de plus de 80 % des femmes séropositives. L'ADN viral augmente au cours de la lactation et atteint un pic à 4-8 semaines de lactation. Des facteurs de risque de la transmission du CMV par allaitement ont été identifiés tels que

l'excrétion précoce du virus infectieux, la charge virale et la durée d'excrétion dans le lait maternel. (Prendergast et al. 2019)

Ces trois virus peuvent être transmis sous forme de particules virales libres, comme le VIH-1 (Koulinska et al. 2006) et le CMV (Clarke et al. 2000), ou sous une forme associée aux cellules, comme le VIH-1 (Koulinska et al. 2006) et l'HTLV-1 (pour revue : Percher et al. 2016). On ne peut pas exclure que ces virus pourraient être transmis par des vésicules extracellulaires, puisqu'il a été démontré que des cellules infectées par le VIH-1 (monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes T) et l'HTLV-1 (lymphocytes T) produisent des vésicules contenant des entités virales. (Sharif et al. 2020)

Transmission des arbovirus par allaitement

L'excrétion virale dans le lait maternel a été décrite pour plusieurs arbovirus. Dans la plupart des cas, seul le génome viral a été détecté, mais l'isolement de particules infectieuses dans certains échantillons soulève d'importantes questions quant au risque de transmission au nourrisson par l'allaitement. À ce jour, la présence de quatre flavivirus (WNV, DENV, YFV, ZIKV) et d'un alphavirus (CHIKV) a été rapportée dans le colostrum et/ou le lait maternel humain **(Tableau 2)**.

Le virus chikungunya

De retour d'une région endémique pour CHIKV, DENV et ZIKV, une femme allaitante de 28 ans a présenté des symptômes non spécifiques tels que des céphalées légères, une asthénie et des éruptions cutanées (Campos et al. 2017). Trois jours après l'apparition des symptômes, seule l'infection par CHIKV a été confirmée par RT-PCR. Le génome viral de CHIKV a également été détecté dans le lait maternel jusqu'à 23 jours après l'apparition des symptômes, y compris après la clairance virale de la circulation sanguine. L'absence de génome viral dans l'urine, le sérum et la salive du nourrisson à 5 et 15 jours après l'apparition des symptômes de la mère suggère que la transmission du virus par allaitement n'a pas eu lieu.

Le virus de la dengue

La présence du génome viral de DENV a été recherchée dans le lait maternel de 12 mères allaitantes infectées. Sur les 12 échantillons testés, l'ARNv a été détecté dans 9 d'entre eux

(75%) avec des charges virales allant jusqu'à $2,5 \times 10^4$ copies d'ARNv/mL (Arragain et al. 2017). Dans le lait maternel, contrairement au sérum, la cinétique de présence de DENV était caractérisée par une détection prolongée du génome viral allant jusqu'à 14 jours après l'apparition des symptômes. (Arragain et al. 2017)

Une autre étude rapporte le cas d'une femme enceinte infectée par DENV-1 s'étant présentée à l'hôpital de Nouméa (Nouvelle-Calédonie) en juillet 2012. Quatre jours après la naissance du nourrisson, celui-ci a développé de la fièvre et son infection a été confirmée par RT-qPCR. Bien qu'une transmission *in utero* soit probable, plusieurs arguments soulèvent des questions quant à une transmission après la naissance de l'enfant. En effet, le sang du cordon ombilical prélevé le jour de l'accouchement était négatif en RT-qPCR et le nourrisson ne présentait pas de virémie les deux premiers jours suivant sa naissance. Celle-ci a été mise en évidence à partir du 4ème jour de l'enfant. Le travail ayant débuté 2 jours après l'apparition des symptômes de la mère, il est difficile d'identifier précisément le mode de transmission mère-enfant. Par ailleurs, la présence de génome viral a été mise en évidence dans le lait maternel à J4 et J6 post-partum, avec des charges virales comparables entre le lait et le sang au même jour (J4 : $>10^3$ copies/mL, J6 : $>10^2$ copies/mL). Enfin, la culture du lait a permis de mettre en évidence la présence de particules infectieuses de DENV. (Barthel et al. 2013)

Le virus West Nile

En septembre 2002, la première transmission possible de WNV par le lait maternel a été signalée par le Centre de contrôle et de prévention des maladies aux États-Unis (« Center for Disease Control and Prevention », CDC). Une femme de 40 ans a été transfusée après l'accouchement par du sang d'un donneur diagnostiqué ultérieurement comme infecté par WNV. Au 16e jour après la transfusion, le génome de WNV a été détecté dans son lait maternel. L'allaitement ayant débuté le jour de la naissance, des tests de diagnostic moléculaire et sérologique ont été effectués sur le nourrisson afin d'évaluer la transmission mais aucun ARNv n'a été détecté (CDC 2002). Le génome viral de WNV a également été détecté dans le colostrum de femmes infectées avant l'accouchement (jusqu'à 70 jours après l'apparition des symptômes) montrant la capacité du virus à persister dans le lait maternel (Hinckley et al. 2007).

Le virus de la fièvre jaune

Suite à la vaccination post-partum contre la fièvre jaune, trois cas de transmission mère-enfant de la souche vaccinale YFV 17DD via l'allaitement ont été suspectés (T. Z. Mann et al. 2018), dont un cas a été confirmé (CDC 2009). Deux semaines après son accouchement, une femme de 22 ans a été vaccinée avec la souche vaccinale 17DD de YFV en raison du contexte endémique de la fièvre jaune au Brésil. Cinq jours après vaccination, celle-ci a développé des symptômes légers (maux de tête, faible fièvre, etc). Trois jours après, soit 23 jours après l'accouchement, le nourrisson allaité a développé une fièvre accompagnée de convulsions de plus en plus fréquentes et intenses. L'infection du nourrisson par la souche 17DD a été confirmée suite à la détection d'ARNv dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de l'enfant. La transmission de la souche vaccinale 17DD par l'allaitement a été confirmée après séquençage de l'isolat du LCR du nourrisson. Comme la souche 17DD peut infecter l'intestin d'*Aedes aegypti* mais ne dissémine pas dans les glandes salivaires, celle-ci ne peut pas être transmise par le moustique à un nouvel hôte (Whitman 1939). La transmission mère-enfant de la souche vaccinale suite à une vaccination post-partum démontre donc la transmission par allaitement. Cette transmission étant accompagnée d'une pathogénicité neurologique sévère, le CDC a recommandé de suspendre la vaccination contre la fièvre jaune des femmes allaitantes depuis 2009 (CDC 2010). Enfin, l'ARNv de la souche vaccinale 17DD a récemment été détecté dans le lait maternel de femmes vaccinées (Hassan et al. 2022).

Concernant les souches sauvages de YFV, aucun cas de transmission par allaitement n'a été rapporté à ce jour. Cependant, l'absence de cas documentés ne reflète pas l'inexistence de cette voie de transmission. En effet, celle-ci est difficile à démontrer chez l'Homme et surviendrait dans des régions reculées d'Afrique et d'Amérique intertropicale où aucun suivi de cette voie de transmission n'est en place. Cependant, une étude menée au Brésil a constaté la présence du génome viral d'une souche sauvage de YFV dans le lait maternel quatre jours après l'apparition des symptômes (Ribeiro et al. 2020).

Le virus Zika

En raison de l'amplitude des récentes épidémies de ZIKV, notamment en Amérique latine en 2015-2016, l'OMS a déclaré une urgence de santé publique de portée internationale et de nombreuses études ont été menées sur ZIKV. Le génome de ZIKV a été détecté dans le lait maternel de plusieurs femmes infectées (Sotelo et al. 2017 ; T. Z. Mann et al. 2018 ; Blohm et

al. 2017 ; Dupont-Rouzeyrol et al. 2016 ; Besnard et al. 2014 ; Cavalcanti et al. 2017 ; Centeno-Tablante et al. 2021 ; Giovanetti et al. 2018 ; Siqueira Mello et al. 2019 ; Hemachudha et al. 2019). Cette détection a été quantifiée dans plusieurs études, révélant des charges virales importantes (de $2{,}9.10^4$ à $2{,}4.10^6$ copies/mL) (Sotelo et al. 2017 ; Dupont-Rouzeyrol et al. 2016 ; Besnard et al. 2014), significativement plus élevées que celles détectées dans la circulation sanguine (de 0 à $7{,}0.10^4$ copies/mL) (Mann et al. 2018). Les charges virales importantes ont été détectées dans le lait maternel principalement entre 3 et 5 jours après l'apparition des symptômes mais celles-ci peuvent également persister bien plus longtemps (Sotelo et al. 2017 ; Giovanetti et al. 2018), même après clairance virale de la circulation sanguine (Besnard et al. 2014 ; Sotelo et al. 2017). Ainsi, *Sotelo et al*. ont détecté une excrétion virale de ZIKV dans le lait maternel 14 jours ($2{,}4.10^6$ copies/mL), 23 jours, et plus de 30 jours ($2{,}2.10^5$ copies/mL) après l'apparition des symptômes, démontrant la capacité de ZIKV à persister dans ce fluide biologique (Sotelo et al. 2017). La présence de particules infectieuses dans le lait maternel a également été démontrée à plusieurs reprises, aussi bien dans le colostrum que dans le lait maternel mature (Sotelo et al. 2017 ; Blohm et al. 2017 ; Dupont-Rouzeyrol et al. 2016 ; Cavalcanti et al. 2017). Cependant, à notre connaissance, le titre viral n'a jamais été déterminé. Parmi les études rapportant la présence du génome viral et/ou de particules infectieuses dans le lait maternel, quatre cas de transmission probable de ZIKV de la mère au nourrisson par le lait maternel ont été rapportés (Blohm et al. 2017 ; Besnard et al. 2014 ; Siqueira Mello et al. 2019). Les infections des nouveau-nés ont été démontrées soit par une RT-qPCR positive dans des échantillons de sérum et d'urine/salive, soit par le développement d'une microcéphalie secondaire (microcéphalie post-natale) chez un enfant (Siqueira Mello et al. 2019). Bien que la transmission par vecteur ne puisse jamais être exclue, un cas de transmission de ZIKV à un nouveau-né (Blohm et al. 2018) suggère fortement une transmission pendant l'allaitement car celui-ci était à l'abri des vecteurs potentiels (logement confiné et climatisé) et les ARNv extraits du lait maternel et de l'urine du nourrisson présentaient une identité de séquence de 99 % (Blohm et al. 2017 ; Blohm et al. 2018). De plus, l'âge avancé du nourrisson (5 mois) permet d'exclure une potentielle transmission *in utero* et renforce la plausibilité de ce mode de transmission. La transmission virale au cours de l'allaitement pourrait donc avoir été impliquée dans l'augmentation du nombre de nourrissons infectés lors de l'épidémie de ZIKV en Amérique latine (2015-2016), bien que toute quantification soit impossible en raison de l'omniprésence des moustiques vecteurs.

Ainsi, la transmission par allaitement des arbovirus, bien que difficile à démontrer, a jusqu'à présent été confirmée pour YFV et fortement suggérée pour ZIKV. L'allaitement maternel étant essentiel pour le développement et la survie des nourrissons dans de nombreux pays à faibles revenus, l'abstinence de cette pratique en raison d'une infection virale maternelle peut être fatale pour le nourrisson. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la transmission de ces virus pendant l'allaitement afin de proposer des stratégies thérapeutiques appropriées tout en maintenant le processus d'allaitement.

Virus	Genre	Caractéristiques de potentielles transmissions d'arbovirus par allaitement	Référence
CHIKV	*Alphavirus*	• Détection du génome viral dans le lait maternel à J3 et J23 après l'apparition des symptômes.	Campos 2017
		• Persistance virale dans le lait après clairance virale de la circulation sanguine.	
DENV	*Flavivirus*	• Détection du génome viral dans le lait à J1 et J14 après l'apparition des symptômes.	Arragain 2017
		• Persistance du génome viral dans le lait.	
		• Infection du nourrisson allaité mais absence de virémie dans le sang de cordon ombilical.	
		• Détection du génome viral et de particules infectieuses dans le lait.	Barthel 2013
		• Infection de nourrissons allaités (absence de viremie dans le sang de cordon ombilical pour l'un d'entre eux).	
WNV	*Flavivirus*	• Détection du génome viral dans le lait 16 jours après transfusion.	CDC 2002
		• Détection du génome viral dans le colostrum.	Hinckley 2007
YFV	*Flavivirus*	• La vaccination de femmes post-partum a conduit à la présence de génome viral dans le LCR de leur enfant.	Couto 2010, Mann 2018
		• La vaccination de femmes post-partum a conduit au développement d'une méningoencéphalite par un nourrisson allaité.	Traiber 2011, Kuhn 2011
		• Détection du génome viral d'une souche sauvage dans le lait maternel.	Ribeiro 2020
		• Détection du génome viral d'une souche vaccinale dans le lait maternel.	Hassan 2022
ZIKV	*Flavivirus*	• Détection du génome viral et de particules infectieuses dans le lait.	Sotelo 2017
		• Persistance jusqu'à J33 après l'apparition des symptômes.	
		• Persistance après clairance virale de la circulation sanguine.	
		• Pas de transmission au nourrisson car allaitement suspendu.	
		• Détection du génome viral et de particules infectieuses dans le lait.	Dupont-Rouzeyrol 2016
		• Transmission ? (résultat ambigu pour le seul échantillon sanguin testé)	
		• Détection du génome viral et de particules infectieuses dans le lait.	Blohm 2017 & 2018
		• Transmission au nourrisson (RT-qPCR+: serum et urine).	
		• Contact du nourrisson limité avec l'extérieur. Maison climatisée.	
		• 99% d'identité de séquence entre les isolats du lait de la mère et de l'urine du nourrisson.	
		Cas 1 :	Besnard 2014 & 2017
		• Détection de génome viral dans le lait mais pas de particules infectieuses (J5 après l'apparition des symptômes).	
		• Transmission au nourrisson (RT-qPCR+: serum et salive).	
		Cas 2 :	
		• Détection de génome viral dans le lait mais pas de particules infectieuses (J5 après l'apparition des symptômes).	
		• Persistance après clairance virale de la circulation sanguine.	
		• Transmission au nourrisson (RT-qPCR+: serum et urine).	
		Cas 1 :	Cavalcanti 2017
		• Détection de génome viral et de particules infectieuses dans le lait.	
		• Pas de transmission au nourrisson (RT-qPCR- : urine)	
		Cas 2-3-4 :	
		• Pas de génome viral détecté dans le lait.	
		• Détection de génome viral dans le lait.	Giovanetti 2018
		• Persistance ? Apparition des symptômes de la mère à 9 semaines de gestation mais détection du génome viral dans le lait à J2 post-partum.	
		• Proximité phylogénique des isolats du lait de la mère et de l'urine du nourrisson.	
		• Détection de génome viral dans le lait.	Siqueira Mello 2019
		• Transmission au nourrisson ? (developpement d'une microcéphalie secondaire mais RT-qPCR- : serum)	
		• Détection de génome viral dans le lait.	Hemachudha 2019
		• Pas de transmission au nourrisson (RT-qPCR- : urine)	

Tableau 2 : Arguments épidémiologiques et cliniques de la transmission des arbovirus par allaitement.
Abréviations : Virus chikungunya (CHIKV), virus de la dengue (DENV), virus West Nile (WNV), virus de la fièvre jaune (YFV), virus Zika (ZIKV), Liquide céphalo-rachidien (LCR).

Mécanismes de franchissement viral de l'épithélium mammaire de la mère

Franchissement de l'épithélium mammaire par les trois principaux virus transmis par allaitement

L'excrétion de particules virales dans le lait maternel nécessite une propagation virale de la circulation sanguine vers les glandes mammaires. Les alvéoles mammaires sont entourées d'un réseau de capillaires sanguins qui permettent les échanges de nutriments, d'oxygène, mais aussi d'agents pathogènes entre la circulation sanguine et les cellules épithéliales mammaires. Pour être excrétés dans le lait maternel, les virus doivent franchir une barrière (e.g. la barrière sang-lait). Différents mécanismes de franchissement viral de l'épithélium mammaire peuvent être proposés **(Figure 14)**. Le virus pourrait franchir l'épithélium mammaire par infection successive des cellules myoépithéliales puis des cellules luminales, conduisant à la libération de particules virales dans le lait maternel. Le virus pourrait également franchir l'épithélium mammaire par transcytose à travers les cellules myoépithéliales puis luminales. Par ailleurs, des cellules luminales infectées pourraient desquamer de l'épithélium mammaire, introduisant ainsi des cellules infectées dans le lait. Un autre mécanisme possible de franchissement de l'épithélium mammaire est le mécanisme appelé « cheval de Troie ». Ce mécanisme est caractérisé par une transmigration de cellules infectées à travers l'épithélium mammaire depuis la circulation sanguine. Les cellules infectées ayant transmigré pourraient alors produire des particules virales localement dans le lait maternel. Ces particules virales pourraient ensuite infecter les cellules luminales par leur pôle basal. Par ailleurs, les cellules luminales pourraient produire des vésicules contenant des particules virales. Enfin, le virus pourrait induire une rupture de l'intégrité de la barrière épithéliale, permettant un passage des particules virales par voie paracellulaire **(Figure 14)**.

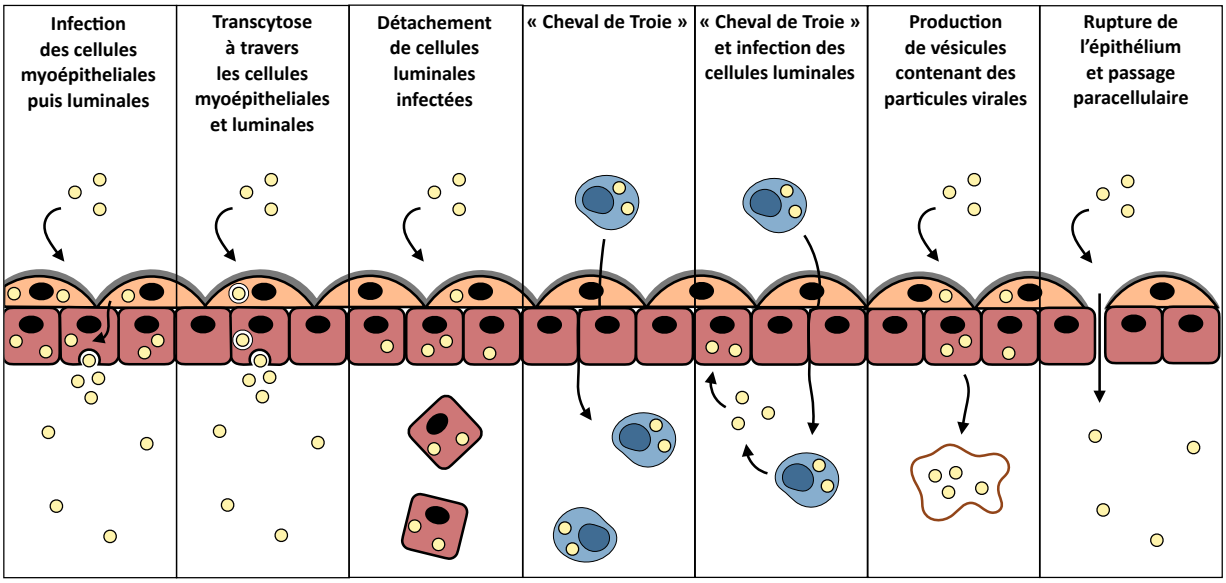


Figure 14 : Mécanismes hypothétiques de franchissement viral de l'épithélium mammaire.
Différents mécanismes de franchissement viral de l'épithélium mammaire peuvent exister. Le virus pourrait infecter ou être transporté par transcytose par des cellules myoépithéliales puis des cellules luminales, conduisant à la libération de particules virales dans le lait maternel. Des cellules luminales infectées pourraient se détacher de l'épithélium mammaire. Des cellules immunitaires infectées pourraient transmigrer à travers l'épithélium mammaire depuis la circulation sanguine, par un mécanisme appelé « cheval de Troie ». Les cellules infectées ayant transmigré pourraient alors produire des particules virales localement dans le lait maternel. Ces particules virales pourraient ensuite infecter les cellules luminales par leur pôle basal. Par ailleurs, les cellules luminales pourraient produire des vésicules contenant des particules virales. Enfin, les particules virales pourraient franchir l'épithélium par voie paracellulaire suite à la rupture de la barrière mammaire. (*Composition originale*).

Dans le cas du VIH, le passage de la barrière mammaire ne se fait pas par infection directe de l'épithélium, car les cellules épithéliales mammaires n'expriment pas le récepteur CD4 à leur surface et ne sont pas sensibles à l'infection par le VIH-1 (Dorosko et al. 2010). En effet, l'analyse de l'expression du récepteur CD4 et des co-récepteurs CCR5 et CXCR4 dans des cellules épithéliales primaires de glande mammaire a démontré une localisation cytoplasmique des co-récepteurs. Selon les échantillons, la protéine CD4 était soit non-exprimée soit détectée dans le noyau (Dorosko et al. 2010). Les particules virales présentes dans le lait maternel pourraient être produites par les cellules immunitaires locales ou avoir franchi l'épithélium mammaire par transcytose comme le suggèrent les observations en microscopie électronique dans les cellules épithéliales mammaires primaires (Dorosko et al.2010).

Pour le virus HTLV-1, un contact cellulaire est nécessaire pour une transmission virale efficace de la cellule infectée à la cellule cible (pour revue : Percher et al. 2016), sauf pour les cellules dendritiques qui peuvent être infectées directement par des virions libres (Jones et al. 2008). Jusqu'à présent, aucune étude n'a détecté de virions libres dans le lait maternel des femmes

infectées (Millen et al. 2022). La source potentielle d'infection dans le lait maternel serait donc les cellules infectées. En effet, des cellules mononucléaires infectées par l'HTLV-1 ont été détectées dans le lait de mères séropositives au début de la lactation (Kinoshita et al. 1984). Comme il a été estimé qu'un enfant allaité ingère en moyenne 10^8 leucocytes par jour, les lymphocytes infectés pourraient constituer une source importante de transmission de l'HTLV-1 par allaitement (Percher et al. 2016). Par ailleurs, les cellules myoépithéliales mammaires sont permissives à l'infection par l'HTLV-1 et sont capables de transférer l'infection aux lymphocytes du sang périphérique (LeVasseur et al. 1998). Les cellules luminales de glande mammaire, isolées à partir du lait maternel, sont sensibles à l'infection par l'HTLV-1 (Southern et al. 1998). De plus, la biopsie mammaire d'un homme infecté (atteint de gynécomastie, un développement anormal de la glande mammaire chez l'Homme), a révélé la présence de cellules épithéliales mammaires infectées par l'HTLV-1 (Loureiro et al. 2000). Ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle les cellules myoépithéliales et/ou luminales peuvent constituer un réservoir et un mode de transmission de l'HTLV-1 par le lait.

Dans le cas du CMV, chez des femmes porteuses d'une infection latente, une réactivation du virus se produit dans la glande mammaire durant la lactation et entraîne l'excrétion du CMV dans le lait maternel. Par ailleurs, des leucocytes infectés par le cytomégalovirus murin (MCMV) ont été détectés dans le lait maternel murin, prélevé chez des souris présentant une infection aigüe ou latente. De plus, l'injection intrapéritonéale de ce lait maternel entraîne une transmission du MCMV aux souriceaux et une dissémination de particules infectieuses dans différents organes, dont le cerveau. L'identification de la nature des entités virales dans le lait maternel permettrait de mieux comprendre les mécanismes de franchissement de la barrière mammaire par le CMV et sa transmission par allaitement. (Wu et al. 2011)

En plus de ces 3 virus humains efficacement transmis par allaitement, la transmission de certains arbovirus est débattue depuis quelques années.

Franchissement de l'épithélium mammaire par les arbovirus

À ce jour, la dissémination des arbovirus dans les glandes mammaires et leur excrétion dans le lait maternel ont été très peu étudiées. Seul l'exemple de ZIKV a été étudié par notre équipe (Hubert et al. 2019) et par Regla-Nava et al. (Regla-Nava et al. 2019).

Nous avons montré que ZIKV dissémine dans les glandes mammaires de souris 129S2/SvPas-Ifnar1tm1Agt (A129) après inoculation intra-péritonéale ou sous-cutanée (Hubert et al. 2019). Chez l'Homme, les cellules épithéliales mammaires primaires sont permissives à l'infection par ZIKV, ce qui suggère que l'épithélium mammaire humain pourrait être la source des particules virales détectées dans le lait maternel des mères infectées. Comme l'épithélium mammaire est composé de deux types de cellules épithéliales, nous avons évalué si les cellules myoépithéliales et/ou les cellules luminales sont permissives à l'infection. En utilisant des lignées cellulaires de phénotype luminal (MCF-7) ou myoépithélial (MDA-MB-231), nous avons montré que les deux types cellulaires sont infectés de manière productive par ZIKV (Hubert et al. 2019). Les cellules myoépithéliales ont également été décrites comme étant infectées *in vivo* après une infection retro-orbitale de souris AG129 (Regla-Nava et al. 2019), confirmant nos résultats.

Les cellules luminales étant spécialisées dans l'excrétion de diverses molécules (e.g. protéines, lipides, lactose, etc.) dans le lait maternel, leurs mécanismes de sécrétion pourraient être exploités par ZIKV pour l'excrétion de particules virales dans le lait maternel. Par ailleurs, l'ARNv a été détecté dans le lait maternel d'une femme infectée jusqu'à 33 jours après l'apparition des symptômes, après clairance virale de la circulation sanguine. Il serait donc intéressant de réaliser une étude à long terme pour déterminer la durée de détection de ZIKV dans les glandes mammaires car celles-ci pourraient jouer un rôle de réservoir viral et expliquer la persistance du virus dans le lait maternel.

De plus, les expériences de notre laboratoire ont été réalisées sur des souris non allaitantes, il serait donc intéressant d'étudier la dissémination virale dans les glandes mammaires à d'autres stades de son développement (i.e. pendant la gestation ou la lactation), car d'importants changements structurels et métaboliques se produisent. L'effet de la lactation a été étudié par *Regla-Nava et al*. qui ont observé des charges virales élevées dans les glandes mammaires de souris lactantes de 5 à au moins 11 jours après l'infection. La prolifération des cellules épithéliales mammaires pendant la lactation pourrait contribuer au rôle de réservoir des glandes mammaires en lactation. De plus, les changements phénotypiques induits par la différenciation cellulaire, survenant pendant la phase de lactation, pourraient augmenter la sensibilité des cellules épithéliales alvéolaires luminales à l'infection par ZIKV.

L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de l'épithélium mammaire dans la production et l'excrétion des particules virales dans le lait maternel. Nous ne pouvons pas exclure que les leucocytes infectés par ZIKV (e.g. monocytes, lymphocytes, etc.) puissent contribuer à l'entrée de ZIKV dans le compartiment lactifère lors de leur transmigration de la circulation sanguine vers le lait maternel, par le mécanisme de " cheval de Troie ". Par ailleurs, la persistance de l'ARNv dans le lait maternel suggère l'existence d'un réservoir au sein de la glande mammaire. Les cellules immunitaires infectées pourraient migrer à travers l'épithélium mammaire pendant l'état virémique, puis des particules virales nouvellement produites pourraient infecter les cellules luminales, servant de réservoir viral pendant la lactation. Comme la nature des entités virales infectieuses dans le lait maternel (particules libres, associées aux cellules ou enveloppées de vésicules) est inconnue, ces trois mécanismes sont plausibles à ce jour.

Effet du lait maternel sur l'infectiosité virale

Effet du lait entier

La stabilité du virus dans le lait est indispensable à sa transmission par allaitement. L'effet du lait maternel humain sur l'infectiosité virale a été recherché dans plusieurs études, sur les trois principaux virus transmis par le lait : le VIH-1, le CMV et l'HTLV-1.

Il a été démontré, *in vivo* et *in vitro*, que le lait maternel humain induit une diminution de l'infectiosité du VIH-1. La pré-incubation du VIH-1 avec du lait maternel humain conduit à une réduction dose-dépendante de l'infectiosité de celui-ci *in vitro*, et à une diminution de la transmission orale à un modèle murin *in vivo* (Wahl et al. 2012). Un mécanisme antiviral a été suggéré par *Mabuka et al*, qui ont montré que des anticorps spécifiques du VIH capables de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) sont courants dans le lait maternel et sont associés à un risque réduit de transmission chez les femmes ayant une charge virale élevée (Mabuka et al. 2012). Par ailleurs, il a été démontré qu'un autre composant du lait maternel, la LF, interfère avec l'infection par le VIH-1 (Puddu et al. 1998 ; Campbell et al. 1995), probablement en inhibant l'adsorption virale.

Concernant la transmission du CMV pendant l'allaitement, il a été montré que différents composants du lait maternel ont des effets opposés sur la transmission virale. *Clarke et al.* ont montré que la vitamine A, la monolaurine et la LF ont un effet antiviral, tandis que les prostaglandines PGE2 et PGF2α favorisent la réplication virale (Clarke et al. 2000). Ils ont également constaté que des formes solubles du récepteur viral ICAM-1 sont présentes dans

le lait maternel et pourraient entrer en compétition avec les récepteurs cellulaires pour la liaison du CMV, ce qui entraînerait une réduction de l'adsorption des particules virales sur la membrane de la cellule cible.

Enfin, il a été largement déterminé que l'allaitement maternel de plus de 6 mois est associé à la transmission mère-enfant de l'HTLV-1 par allaitement (Wiktor et al. 1997). L'effet du lait maternel ou de ses composants sur l'infectiosité de l'HTLV-1 n'a pas encore été étudié mais, les concentrations des composants variant au cours de l'allaitement, il est plausible que certains d'entre eux aient un effet sur la transmission de l'HTLV-1.

Effet de la lactoferrine

La diminution de l'infectiosité virale dans le lait maternel a souvent été associée à la présence de la LF (mentionnée ci-dessus), une protéine du lait liant le fer **(Figure 15)**. En effet, il est largement admis depuis les années 1990 que la LF inhibe la réplication virale en interférant avec l'adsorption à la membrane cellulaire de virus tels que le virus de l'hépatite C (HCV) (Ikeda et al. 1998 ; Ikeda et al. 2000), le rotavirus (Superti et al. 1997), le poliovirus (Marchetti et al. 1999 ; Seganti et al. 2004), le VIH-1 (Puddu et al. 1998 ; Campbell et al. 1995 ; Moriuchi and Moriuchi 2001 ; Berkhout et al. 2004), le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) (Hammer et al.2000 ; Marchetti et al. 1996 ; Marchetti et al. 1998 ; Siciliano et al. 1999 ; Hasegawa et al. 1994), le virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV-2) (Hammer et al. 2000 ; Marchetti et al. 1998), et le CMV (Clarke et al. 2000 ; Campbell et al. 1995 ; Swart et al. 1999a ; Swart et al. 1999b ; Beljaars et al. 2004). Plusieurs mécanismes ont été décrits à différentes étapes du cycle viral. La LF inhibe très probablement l'entrée du virus en se liant soit aux particules virales, soit aux cellules cibles, empêchant ainsi leur interaction. En effet, il a été démontré que la LF est capable de se lier aux protéines d'enveloppe virale telles que E1 et E2 de HCV (Yi et al. 1997) ou gp120 du VIH-1 (Swart et al. 1996), ainsi qu'aux héparines membranaires pendant l'infection par le CMV (Damiens et al. 1998 ; Mann et al. 1994 ; Van Berkel et al. 1997 ; Zou et al. 1992). D'autres équipes ont également découvert que la LF pouvait agir au cours des étapes ultérieures du cycle viral. *Superti et al*. ont suggéré que la LF interfère non seulement avec l'entrée du virus, mais également avec la synthèse d'antigènes viraux au cours de l'infection par le rotavirus (Superti et al. 1997). Enfin, *Ng et al*. ont suggéré que la LF inhibe la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase du VIH-1 (T. B. Ng et al. 2001).

D'autre part, il a également été démontré que la LF exerce un effet proviral sur la réplication de l'HTLV-1. La LF augmente l'activité du promoteur LTR (Long Terminal Repeat) de l'HTLV-1,

entraînant une expression virale accrue (Moriuchi et al. 2001). *Moriuchi et al*. ont également découvert que la protéine virale Tax trans-active le promoteur du gène codant la LF dans les cellules myéloïdes différenciées (HL-60) ou les cellules épithéliales mammaires (MCF-7), induisant l'expression de la LF et facilitant ainsi la transmission de l'HTLV-1 par le lait (Moriuchi et al. 2006).

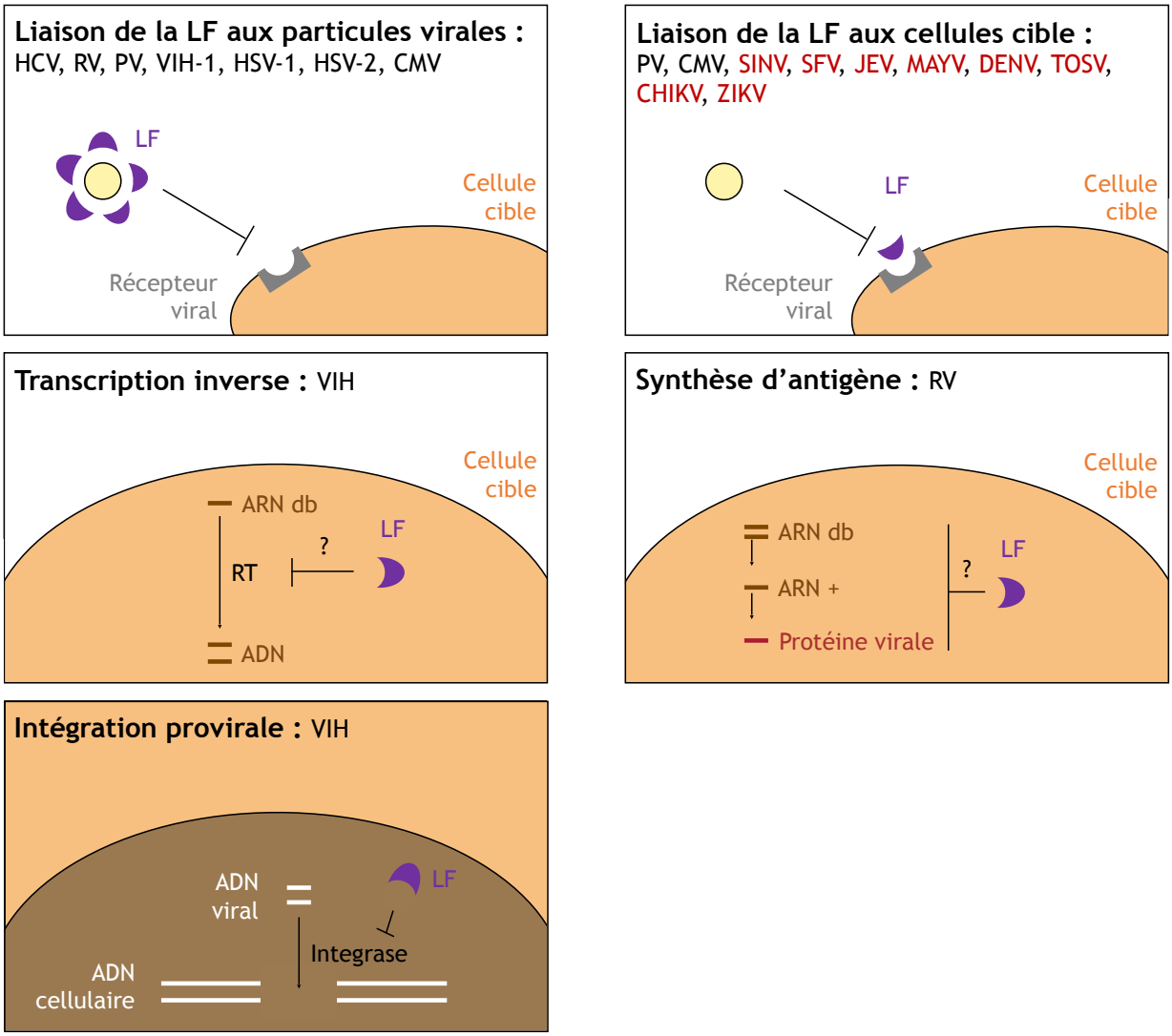


Figure 15 : Mécanismes d'inhibition de l'infectiosité virale par la lactoferrine.
La lactoferrine (LF) inhibe l'entrée virale en se liant soit aux particules virales, soit aux cellules cibles. La LF se lie aux particules virales du virus de l'hépatite C (HCV), du rotavirus (RV), du poliovirus (PV), du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (V-1), du virus de l'herpès simplex type 1 (HSV-1), du virus de l'herpès simplex type 2 (HSV-2) ou du cytomégalovirus (CMV). La LF se lie aux cellules cibles, inhibant l'infection par le PV, le CMV et des arbovirus (en rouge) tels que le virus Sindbis (SINV), le virus Semliki forest (SFV), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), le virus Mayaro (MAYV), le virus de la dengue (DENV), le virus Toscana (TOSV), le virus du Chikungunya (CHIKV) ou le virus Zika (ZIKV). La LF inhiberait également des étapes intracellulaires du cycle viral comme la transcription inverse (RT), la synthèse des protéines virales ou l'intégration provirale dans le génome de la cellule hôte par des mécanismes encore inconnus. (*Composition originale*).

Effet des acides gras libres

La réduction de l'infectiosité virale peut également être associée à une activité antivirale des lipides du lait maternel **(Figure 16)**. *Welsh et al*. ont montré que les acides gras insaturés et les monoglycérides présents dans le lait maternel inactivent les virus enveloppés mais pas les virus non enveloppés (Welsh et al. 1978), ce qui suggère un effet des lipides du lait maternel sur l'enveloppe virale de nature lipidique. *Thormar et al*. ont confirmé ces résultats, mais ont également constaté que les lipides acquièrent des propriétés antivirales après le stockage du lait maternel à 4 °C et dans l'estomac des nourrissons dans l'heure qui suit l'alimentation (Thormar et al. 1987). *Pfaender et al*. ont montré qu'après un stockage à 4 °C, les concentrations en acides gras libres dans le lait maternel augmentent, ce qui pourrait expliquer l'effet antiviral observé. Ils ont suggéré qu'après réfrigération ou congélation du lait, les membranes des globules gras seraient altérées, exposant ainsi le cœur de triglycérides aux lipases présentes dans le lait. La dégradation des triglycérides par les lipases expliquerait donc l'augmentation des acides gras libres (Pfaender et al. 2013)(Isaacs et al. 1986).

La pré-incubation des virus enveloppés avec des acides gras libres altère l'intégrité de l'enveloppe virale (Thormar et al. 1987 ; Kohn et al. 1980), confirmant leur rôle antiviral. Les virus enveloppés testés étaient le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), l'HSV-1, le virus Maëdi-Visna (MVV) (Thormar et al. 1987), le virus Sendaï (SeV), le virus de la maladie de Newcastle (NDV), le virus de l'influenza de type A (IAV), le virus Sindbis (SINV) et WNV (Kohn et al. 1980). Une autre observation confirmant ce modèle a été faite par *Thormar et al*. qui ont observé que le lait écrémé est nécessaire pour que les lipides deviennent antiviraux, ce qui suggère que les lipases présentes dans la fraction écrémée dégraderaient les triglycérides des globules gras présents dans la fraction crème.

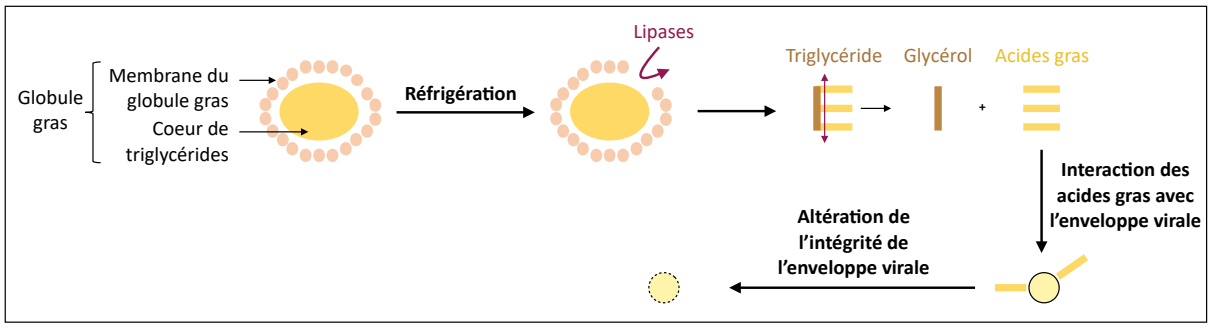


Figure 16 : Mécanisme hypothétique d'inhibition de l'infectiosité virale par le lait conservé à 4°C.
Les globules gras contenus dans le lait maternel sont composés d'un cœur de triglycérides recouvert d'une membrane. La réfrigération du lait maternel entraînerait une altération de l'intégrité de la membrane des globules gras, rendant les triglycérides accessibles aux lipases contenues dans le lait. Les lipases digèreraient les triglycérides en glycérol et en acides gras libres, qui interagiraient avec l'enveloppe des particules virales. (*Composition originale, inspirée de Pfaender et al. 2013*).

Effet du lait maternel sur les arbovirus

L'effet du lait maternel sur l'infectiosité des arbovirus a été étudié pour la première fois en 1977 par *Welsh et al*. qui ont montré que le lait maternel avait une activité antivirale sur la réplication du virus Getah (GETV), du virus Ross river (RRV), du virus Semliki forest (SFV), SINV et du virus Bebaru (BEBV) **(Tableau 3)**. Ils ont identifié l'origine de l'activité antivirale comme étant la neutralisation par les IgA pour GETV, RRV et SFV (mais aucune n'a été observée pour SINV ou BEBV) et la fraction crème pour le SFV (Welsh et al. 1978). Puis, en 1980, *Kohn et al*. ont identifié les acides gras libres comme étant responsables de l'inhibition de SINV et de WNV (Kohn et al. 1980). Les acides gras libres interagissent également avec le virus HCV, comme l'ont constaté *Pfaender et al*. Bien que HCV ne soit pas un arbovirus, il fait partie de la famille des *Flaviviridae* et présente de nombreuses similitudes avec les arbovirus appartenant au genre *Flavivirus*, tels que ZIKV, YFV et DENV. Il a été démontré que la conservation du lait maternel à 4 °C était responsable des activités anti-HCV (Pfaender et al. 2013) et anti-ZIKV (Pfaender et al. 2017). Enfin, il a récemment été démontré que la fraction crème est responsable de l'activité anti-ZIKV du lait maternel humain stocké à -20 °C, +4 °C, +22 °C ou +37 °C car celle-ci entraîne une altération de l'intégrité des particules virales (Conzelmann et al. 2019). Ces résultats suggèrent que les acides gras libres pourraient avoir un effet antiviral sur ZIKV.

Par ailleurs, il a été démontré que la LF avait un effet antiviral sur les arbovirus tels que SINV (Waarts et al. 2005), SFV (Waarts et al. 2005), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) (Chien et al. 2008), le virus Mayaro (MAYV) (Carvalho et al. 2014), DENV (Chen et al. 2017), le virus Toscana (TOSV) (Pietrantoni et al. 2015), CHIKV (Carvalho et al. 2017) et ZIKV (Carvalho et al. 2017). La LF interfère principalement avec l'entrée virale en interagissant avec les HSPG qui sont liés par les flavivirus avant l'interaction avec leurs récepteurs cellulaires (Kim et al. 2017). Enfin, il a récemment été suggéré que certains composants de la fraction lactosérum peuvent également être antiviraux. Les vésicules extracellulaires et les glycosaminoglycanes contenus dans le lait maternel empêchent l'adsorption virale de ZIKV et du virus Usutu (USUV) à la surface cellulaire (Francese et al. 2020).

Il est essentiel d'étudier l'effet du lait maternel sur la stabilité et l'infectiosité des arbovirus car des charges virales élevées sont présentes et persistent dans le lait maternel des mères infectées, représentant un risque de transmission au nouveau-né et de développement de symptômes graves. Bien que l'effet du lait maternel ait été étudié sur des arbovirus tels que

GETV, RRV, SFV, SINV, WNV, BEBV et récemment ZIKV, aucune donnée n'est encore disponible concernant d'autres arbovirus qui sont possiblement transmis pendant l'allaitement, tels que YFV (Traiber et al. 2011 ; Kuhn et al. 2011), DENV (Brueckner et al. 1956) et CHIKV (Friis et al. 1982).

Arbovirus	Composant antiviral testé	Référence
GETV	IgA	Welsh 1978
RRV	IgA	Welsh 1978
SFV	IgA	Welsh 1978
	Crème	Welsh 1978
	Lactoferrine	Waarts 2005
SINV	Acides gras	Kohn 1980
	Lactoferrine	Waarts 2005
WNV	Acides gras	Kohn 1980
ZIKV	4°C	Pfaender 2017, Conzelmann 2019
	-20°C	Conzelmann 2019
	22°C	Conzelmann 2019
	37°C	Conzelmann 2019
	Lactoferrine	Carvalho 2017
	Vésicules extracellulaires	Francese 2020
	Glycoaminoglycanes	Francese 2020
JEV	Lactoferrine	Chien 2008
MAYV	Lactoferrine	Carvalho 2014
DENV	Lactoferrine	Chen 2017
TOSV	Lactoferrine	Pietrantoni 2015
CHIKV	Lactoferrine	Carvalho 2017
USUV	Vésicules extracellulaires	Francese 2020
	Glycoaminoglycanes	Francese 2020
HCV	4°C	Pfaender 2013

Tableau 3 : Inhibition de l'infectiosité des arbovirus par les composants du lait maternel.
Les virus indiqués dans le tableau sont des arbovirus à l'exception du virus de l'hépatite C (gris). Celui-ci a été ajouté car il fait partie de la famille des *Flaviviridae* et présente de nombreuses similitudes avec les arbovirus appartenant au genre *Flavivirus*. Abréviations : Virus Getah (GETV), virus Ross river (RRV), virus Semliki forest (SFV), virus Sindbis (SINV), virus West Nile (WNV), virus Zika (ZIKV), virus de l'encéphalite japonaise (JEV), virus Mayaro (MAYV), virus de la dengue (DENV), virus Toscana (TOSV), virus chikungunya (CHIKV), virus Usutu (USUV) et virus de l'hépatite C (HCV).

Mécanismes de franchissement viral de l'épithélium intestinal du nourrisson

Franchissement de la barrière intestinale par les virus transmis par voie orale

En raison de sa surface et de ses capacités d'absorption, la barrière intestinale constitue une cible de choix pour les virus transmis par voie orale. À l'aide de différents modèles expérimentaux *in vitro* (e.g. pour le virus de l'hépatite A (HAV)), *in vivo* (e.g. pour le VIH) et *ex vivo* (e.g. pour le norovirus), divers mécanismes de franchissement de la barrière intestinale ont été proposés. Certains virus infectent les entérocytes sans induire de rupture de la monocouche intestinale, comme le virus HAV (Blank et al. 2000) ou le VIH (Fotopoulos et al. 2002), tandis que d'autres induisent une perte de l'intégrité de la barrière, comme le rotavirus (Dickman et al. 2000) et le CMV (Maidji et al. 2017). D'autres virus franchissent la barrière intestinale par transcytose à travers les entérocytes, tels que le VIH (Bomsel et al. 1997) et HTLV-1 (Martin-Latil et al. 2012), ou à travers les cellules M tels que le VIH (Fotopoulos et al. 2002), le PV (Ouzilou et al. 2002) et le NV (Gonzalez-Hernandez et al. 2013) **(Figure 17)**.

À la fin des années 1980, un modèle *in vitro* de barrière intestinale a été mis au point à l'aide de la lignée cellulaire Caco-2 (issue d'un adénocarcinome colorectal humain). Les cellules Caco-2 cultivées sur des filtres en polycarbonate pendant environ 20 jours forment une monocouche étanche de cellules différenciées et polarisées qui permet d'étudier le franchissement des virus et l'intégrité de la barrière intestinale.

Grâce à ce modèle, il a été démontré que la lignée cellulaire Caco-2 est permissive au HAV (Blank et al. 2000), au VIH (Fotopoulos et al. 2002) et au rotavirus (Dickman et al. 2000). L'infection par HAV entraîne une production de particules virales par les pôles apicaux et basolatéraux de la monocouche, avec une efficacité de production plus faible du côté basolatéral. Cette infection n'entraîne pas de perte d'intégrité de l'épithélium. L'infection des cellules Caco-2 par le VIH dépend de l'expression de récepteur galactosyl-céramide (GalCer) et n'entraîne aucune perturbation de l'intégrité de la barrière intestinale. En revanche, l'infection des entérocytes par le rotavirus conduit à une rupture de la barrière intestinale soit par altération des jonctions serrées, soit par apoptose NSP4-dépendante induite par voie mitochondriale (Dickman et al. 2000 ; Martin-Latil et al. 2007). Il est intéressant de noter que

le rotavirus est produit sous forme de grandes vésicules contenant plusieurs virions dans les fèces de souris et de porcs (Santiana et al. 2018).

D'autres virus franchissent la barrière intestinale par transcytose à travers les entérocytes. Il a été montré pour le VIH que ce dernier est capable de franchir une monocouche étanche de cellules Caco-2 par transcytose dépendante de l'expression du récepteur GalCer (Bomsel 1997). *Bomsel et al*. ont également montré que pendant la transcytose depuis le pôle basolatéral vers le pôle apical, des immunoglobulines intracellulaires ciblent les particules virales, inhibant ainsi le transport viral à travers la cellule (Bomsel et al. 1998). Notre laboratoire a démontré la transcytose du virus HTLV-1 en utilisant le modèle *in vitro* Caco-2 (Martin-Latil et al. 2012). Ce franchissement de la monocouche entérocytaire n'implique pas d'altération de l'intégrité de la barrière épithéliale, ni d'infection des entérocytes.

D'autres virus franchissent la barrière intestinale par transcytose à travers les cellules M. Il a été démontré sur le modèle *in vitro* Caco-2 enrichi en cellules M que les particules de VIH sont transportées à travers les cellules M par transcytose. En effet, pour induire la différenciation en cellules M, des lymphocytes B ont été ajoutés au pôle basolatéral des monocouches de Caco-2 et la différenciation des cellules M a été vérifiée d'une part par microscopie et d'autre part en mesurant la capacité de transcytose des monocouches cellulaires. Seuls les virions de type X4 franchissent les cellules M par transcytose (Fotopoulos et al. 2002). Il a également été démontré que le poliovirus franchit les cellules M par transcytose *in vitro* (Ouzilou et al. 2002). De plus, après l'infection d'explants de plaques de Peyer humaines par le poliovirus de type 1, les particules virales adhèrent de préférence aux cellules M. En effet, des vésicules intracellulaires contenant des virions ont été observées par microscopie électronique dans les cellules M. L'internalisation du poliovirus dans les cellules M a également été confirmée *in vivo* sur un modèle simien (Takahashi et al. 2008). Enfin, le norovirus franchit les épithélia intestinaux murins polarisés *in vitro* par transcytose à travers les cellules M (Gonzalez-Hernandez et al. 2013). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur un modèle murin. Après inoculation orale du norovirus, la déplétion transitoire des cellules M est associée à une diminution de l'infection (Gonzalez-Hernandez et al. 2014). Il a également été montré que le norovirus est excrété dans les fèces sous forme de vésicules contenant de nombreuses particules virales qui restent intactes pendant la transmission féco-orale (Santiana et al. 2018).

Franchissement de la barrière intestinale par les arbovirus

Dans le contexte de l'allaitement maternel, les arbovirus sont susceptibles d'atteindre la barrière intestinale car le pH de l'estomac des nouveau-nés est tamponné par le lait maternel et donc significativement plus élevé que le pH de l'estomac d'un adulte (Miclat et al. 1978). En effet, l'estomac de l'adulte présente un pH de 1,5 à 3,5 (MedlinePlus Medical Encyclopedia) tandis que celui du nourrisson est de 7,5 à 8,5 à la naissance (Miclat et al. 1978). Il a été démontré que les arbovirus comme ZIKV (Müller et al. 2016) ou TBEV (Gresikova-Kohutova 1959) sont stables à faible pH, voire dans les sucs gastriques pour TBEV (Pogodina et al. 1958). À ce jour, TBEV et ZIKV sont les seuls arbovirus dont la capacité à franchir la barrière intestinale a été étudiée dans des modèles expérimentaux **(Figure 17)**.

À l'aide du modèle cellulaire Caco-2, *Yu et al*. ont montré que TBEV franchit les monocouches intestinales par transcytose au début de l'infection et par voie paracellulaire cinq jours après l'infection en raison d'une altération de l'intégrité de la barrière (Yu et al. 2014). Pour ZIKV, notre laboratoire a montré que l'exposition de différents clones de Caco-2 à plusieurs souches de ZIKV (isolées au Brésil en 2016 ou en Polynésie française en 2013) conduit à leur infection. En utilisant le modèle de monocouche Caco-2 polarisée, il n'a été observé aucune altération de l'intégrité de la barrière épithéliale et avons constaté une production de particules virales infectieuses à la fois du côté apical et basolatéral. Bien que l'efficacité de production soit plus faible du côté basolatéral, ZIKV semble capable de franchir la barrière intestinale *in vitro*. *In vivo*, nous avons démontré que l'inoculation intra-gastrique de ZIKV à des souriceaux A129 conduit à leur infection associée à une neuro-invasion et à un taux de mortalité élevé (Hubert et al. 2020).

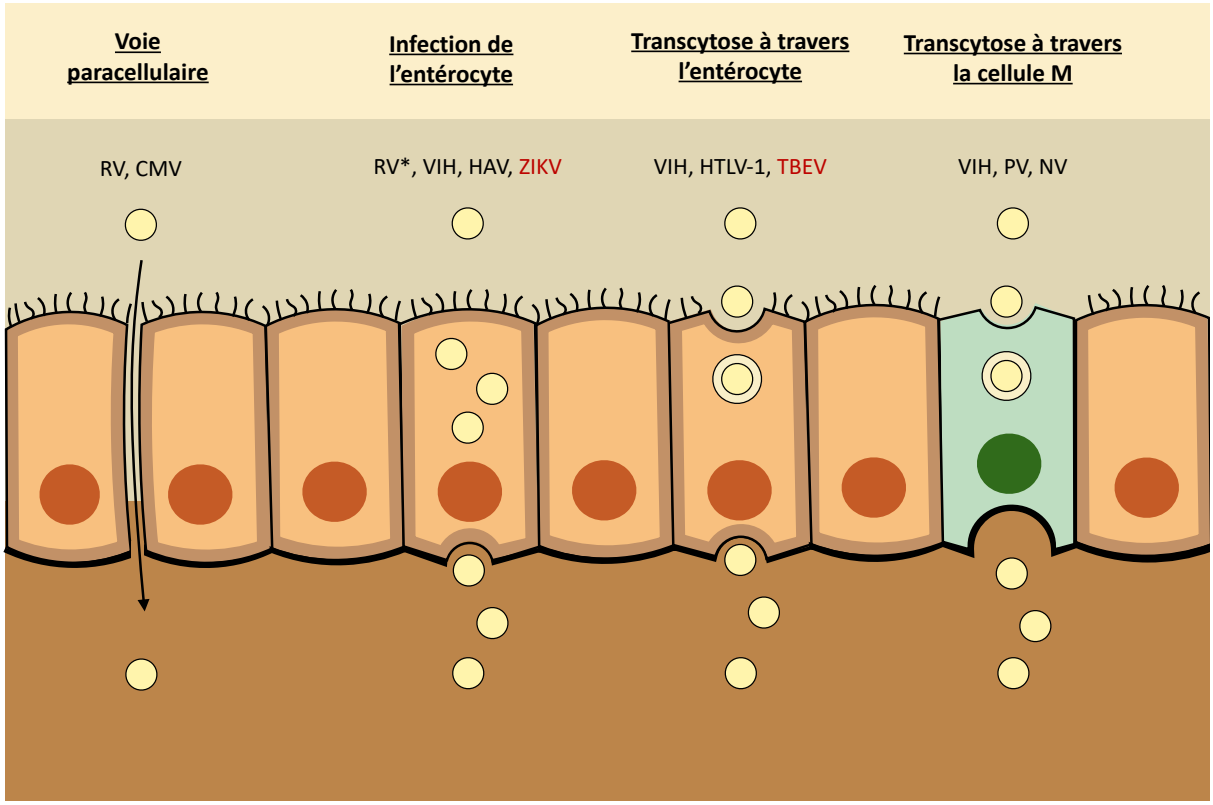


Figure 17 : Mécanismes suggérés de franchissement de la barrière intestinale par les virus.
La barrière intestinale peut être franchie par des virions libres par passage paracellulaire par le rotavirus (RV) et le cytomegalovirus (CMV). D'autres virus franchissent l'épithélium intestinal par infection des entérocytes, tels que le RV (* : après passage paracellulaire), le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), le virus de l'hépatite A (HAV) et le virus Zika (ZIKV). Le franchissement par transcytose à travers les entérocytes est observé pour le HIV, le virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) et le virus de l'encéphalite à tiques (TBEV). Enfin, le HIV, le poliovirus (PV) et le norovirus (NV) franchissent la barrière intestinale par transcytose à travers les cellules Microfold (cellules M). Les seuls arbovirus (en rouge) qui ont été signalés comme franchissant la barrière intestinale sont TBEV et ZIKV. (*Composition originale*).

Projet doctoral

OBJECTIFS DU PROJET DOCTORAL

Objectifs pour l'axe 1 – ZIKV

En raison de la difficulté de démontrer la transmission d'un arbovirus par allaitement, la transmission de ZIKV par allaitement est débattue depuis quelques années. Au laboratoire, la transmission de ZIKV par allaitement a été démontrée dans le modèle murin A129 et les mécanismes associés ont été étudiés. La dissémination du virus aux glandes mammaires de souris infectées a été observée, et l'infection de l'épithélium mammaire a été étudiée à l'aide de plusieurs modèles expérimentaux (i.e. glandes mammaires murines, cellules primaires de glande mammaire humaine et lignées cellulaires de glande mammaire humaine). La sensibilité à l'infection par voie orale a été démontrée chez les souriceaux A129 et le franchissement de la barrière intestinale a été démontré *in vitro*.

Cependant, chez l'Homme, certaines études de cas rapportent une transmission de ZIKV de mères infectées à leur nourrisson tandis que d'autres décrivent une absence de détection de génomes viraux et de développement de symptômes chez le nourrisson allaité. La transmission par allaitement semblant donc non-systématique, ce projet de recherche a pour but d'étudier :

- La nature infectieuse et la forme des entités virales du lait maternel pour ZIKV.

- L'effet des composants du lait maternel sur l'infectiosité de ZIKV.

Objectifs pour l'axe 2 – YFV

La transmission de YFV par allaitement a été décrite chez l'Homme pour la souche vaccinale, conduisant au développement de symptômes neurologiques sévères chez le nourrisson. Ce projet de recherche a pour but d'identifier les mécanismes de transmission par allaitement de YFV et de comparer ceux de la souche vaccinale et de souches sauvages du virus afin d'évaluer si ces dernières pourraient également être transmises de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement.

Trois étapes de la transmission par allaitement seront étudiées :

- La dissémination virale jusqu'à la glande mammaire dans un modèle expérimental murin, ainsi que les mécanismes de franchissement de l'épithélium mammaire.

- L'excrétion du virus dans le lait maternel.

- Le franchissement de l'épithélium intestinal du nourrisson et les mécanismes associés.

Matériel & Méthodes

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires Vero E6 (fibroblastes rénaux simiens, CRL-1586, ATCC), Caco-2 (entérocytes humains, Clone TC7, SCC209, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), MDA-MB-231 (cellules myoépithéliales mammaires humaines, HTB-26, ATCC) et MCF-7 (cellules luminales mammaires humaines, HTB-22, ATCC) ont été utilisées. Les lignées cellulaires Vero E6, Caco-2 et MDA-MB-231 ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté de l-glutamine (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), de 10% de sérum de vœu foetal (SVF, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), de 100 U/mL de penicilline, et de 100 µg/mL de streptomycine (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Les cellules ont été maintenues à 37°C et 5% de CO2 pour la culture. Les cellules MCF-7 ont été cultivées en milieu DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplémenté de 10% de SVF, de 100 U/mL de penicilline, de 100 µg/mL de streptomycine, de 20 ng/mL d'hEGF (Peprotech, East Windsor, NJ, USA), de 0,5 µg/mL d'hydrocortisone (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) et de 10 µg/mL d'insuline (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA).

Souches virales

Toutes les expériences avec ZIKV ont été réalisées en utilisant deux souches virales appartenant à la lignée asiatique : une souche isolée au Brésil en 2016 (Brazil/2016, GenBank : KU991811) et une souche isolée en Polynésie Française en 2013 (PF13, GenBank : KX369547). Les expériences avec YFV ont été réalisées avec 3 souches virales : une souche isolée à Dakar en 1965 (HD1279, U52413, U23574), la souche Asibi isolée au Ghana en 1927 (Asibi, Centre de ressources biologiques, Institut Pasteur, Paris, France) et la souche vaccinale 17D-204 (Vaccin Stamaril, Sanofi Pasteur, Lyon, France).

Afin de produire les inocula viraux utilisés dans nos expériences, les suspensions virales ont été ajoutées à des cellules Vero E6 à 37°C et 5% de CO2 pendant 2h dans du DMEM - 2% SVF - 1X pénicilline/streptomycine. Après 2h d'adsorption virale, l'inoculum a été retiré et remplacé par du DMEM- 2% SVF - 10 mM Hepes (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Après 2 jours de culture pour ZIKV et 3 jours de culture pour YFV, les surnageants ont été prélevés puis centrifugés à 500 g pendant 10 minutes et aliquotés pour être stockés à -80°C. Le titre viral de ces suspensions a été déterminé par titrage en plages de lyse (décrit ci-dessous).

Modèle animal

Les souris de fond génétique 129S2/SvPas-Ifnar1tm1Agt (A129) ont été utilisées pour réaliser les expériences. Ces souris sont immunodéprimées par knock-out du récepteur aux interférons de type I (Van den Broek et al. 1995) et permettent d'étudier l'infection par ZIKV (Dowall et al. 2016) et YFV (Meier et al. 2009)(Yan et al. 2020). Elles ont été hébergées et élevées dans les animaleries de l'Institut Pasteur qui sont accréditées par le ministère français de l'agriculture pour l'élevage et la réalisation d'expériences sur des rongeurs vivants.

Déclaration éthique

Les expériences sur les animaux ont été réalisées conformément aux réglementations françaises et européennes sur les soins et la protection des animaux de laboratoire (Directive CE 2010/63, Loi française 2013-118, 6 février 2013). Toutes les expériences avec ZIKV ont été approuvées par le Comité d'éthique #89 et enregistrées par le Ministère français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) sous la référence « APAFIS#16119-2018071314475930 v1 » (date d'approbation : 19 novembre 2018). Pour YFV, les expériences ont été approuvées par le Comité d'éthique #89 et enregistrées par le MESRI sous la référence « APAFIS#31829-2021052812549296 v1 » (date d'approbation : 31 mai 2021). L'utilisation de souris génétiquement modifiées (A129) a été approuvée par les instances institutionnelles et le MESRI sous la référence n° 2194 (date d'approbation : 6 octobre 2017).

Infection des animaux et prélèvement d'échantillons

Pour les expériences ZIKV *in vivo*, des souris femelles A129 âgées de 6 à 13 semaines ont été hébergées et accouplées conformément aux recommandations en matière de bien-être animal. Les souris A129 lactantes ont été infectées par voie sous-cutanée entre 1 et 11 jours post-partum avec 10^6 UFP de la souche Brazil/2016 de ZIKV. Des échantillons de sang ont été prélevés 3 jours après l'infection dans des tubes contenant 15 mM d'EDTA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et soumis à des titrages en plages de lyse et à des extractions d'ARN afin de vérifier l'infection des mères. Pour le prélèvement d'échantillons de lait à 4 jours post-infection, les mères ont été isolées de leurs souriceaux pendant environ 2h30 à 3h, pour permettre l'accumulation de lait maternel dans les glandes mammaires. Afin de stimuler l'éjection du lait des alvéoles vers les canaux lactifères, les mères ont été injectées

par voie intra-péritonéale avec 250 µL d'ocytocine (Ocytovem, Ceva Santé Animale, Libourne, France) et mises en contact avec leurs souriceaux pendant quelques minutes. Les mères ont été étroitement surveillées afin de permettre aux souriceaux de commencer à téter mais de les empêcher de boire tout le lait maternel. Après la stimulation, les mères ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale avec 100 µL d'un mélange anesthésique contenant 5 mg/kg de xylazine (Rompun, Bayer, Leverkusen, Allemagne) et 80 mg/kg de kétamine (Imalgene, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Allemagne). Le lait maternel a été recueilli à l'aide d'une pipette Pasteur en massant les glandes mammaires. Afin d'évaluer la transmission virale, les rates ont été prélevées sur les souriceaux euthanasiés et soumises à une extraction d'ARNv et à une RT-qPCR (décrites ci-dessous).

Pour les expériences YFV *in vivo*, des femelles A129 ont été infectées par voie sous-cutanée avec 10^5 UFP des souches Dakar ou Asibi de YFV. Des échantillons sanguins ont été prélevés à J3 et J5 post-infection pour l'expérience avec la souche Dakar et à J3, J4 et J6 pour l'expérience avec la souche Asibi. Le sang a été centrifugé à 2000 g pendant 15 minutes afin d'isoler le plasma. Après euthanasie des animaux, des glandes mammaires thoraciques, abdominales et inguinales ont également été prélevées, après perfusion des animaux et élimination du ganglion lymphatique présent dans les glandes abdominales. Les glandes mammaires ont été broyées (Bullet Blender Storm shredder, Dutscher, Bernolsheim, France) en présence de billes d'acier de 3,2 mm (Next Advance, Troy, MO, USA) et centrifugées à 2000 g pendant 10 minutes. La présence d'ARNv et de particules infectieuses a été déterminée par RT-qPCR et titrage en plage de lyse, respectivement (décrits ci-dessous).

Isolement des fractions du lait maternel

Pour séparer les différentes fractions du lait maternel, les échantillons de lait entier ont été centrifugés à 5000 g pendant 15 minutes. La crème, le lactosérum et le culot cellulaire ont ensuite été séparés et lavés 2 fois dans du PBS à 5000 g pendant 15 minutes afin de purifier ces différentes fractions.

Extractions d'ARN

Les ARNv ont été extraits d'échantillons de plasma, de lait entier, de crème, de lactosérum, de rates et de glandes mammaires, à l'aide du mini kit d'ARN viral QIAamp (Qiagen, Hilden, Allemagne). Les organes ont été conservés à -80°C avant les extractions d'ARNv. Le jour des extractions d'ARN, les organes ont été décongelés dans du PBS, broyés et centrifugés à 2000 g pendant 10 minutes. Les surnageants ont été utilisés pour les extractions d'ARNv.
Les ARN intracellulaires totaux ont été extraits des cellules Caco-2 à l'aide du kit « RNeasy Plus Mini Kit » (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon le protocole du fournisseur et quantifiés à l'aide de la technologie NanoDrop (ND-1000, Labtech).

RT-qPCR

La transcription inverse a été réalisée à l'aide d'amorces hexamériques aléatoires (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et du kit de transcriptase inverse Maxima H Minus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La PCR quantitative a été réalisée en utilisant 5 µL d'ADNc matrice, avec 10 µL de MasterMix (iTaq Universal SYBR Green Supermix, Biorad, Hercules, CA, USA) et 500 nM de chaque amorce spécifique des séquences virales NS5 et NS3 de ZIKV et YFV, respectivement.

	Amorce sens	Amorce antisens
NS5 (ZIKV)	5'-AAR TAC ACA TAC CAR AAC AAA GTG GT-3'	5'-TCC RCT CCC YCT YTG GTC TTG-3'
NS3 (YFV)	5'-GCG TAA GGC TGG AAA GAG TG-3'	5'-CTT CCT CCC TTC ATC CAC AA-3'

Le programme suivant a été utilisé pour l'amplification : 10 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles de 15 secondes à 95°C, 20 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C (Mastercycler Eppendorf Realplex, Hambourg, Allemagne). L'analyse a été réalisée soit par normalisation par rapport à l'expression du gène de ménage hPRT (Amorce : Sens : 5'- CCT GGC GTC GTG ATT AGT GAT -3'; Antisens : 5'- AGA CGT TCA GTC CTG TCC ATA A -3'), soit par quantification du nombre de copies d'ARNv, réalisée à l'aide d'une courbe standard d'un plasmide codant pour les génomes viraux de ZIKV ou YFV.

Titrage en plage de lyse

Des cellules Vero ont été exposées à des dilutions en série (au 10ème) d'échantillons de plasma, de lait entier, de crème, de lactosérum ou de surnageant de broyat de glande mammaire, dans du DMEM-2% SVF pendant 2h à 37°C et 5% de CO2. Après adsorption virale, les inocula ont été retirés et remplacés par du DMEM - 2% SVF - 1,6% carboxyméthylcellulose (CMC). Les cellules ont été cultivées, à 37°C et 5% de CO2, pendant 5 jours et 6 jours pour ZIKV et YFV, respectivement. Après 3 lavages dans du PBS, les cellules Vero ont été fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 minutes à température ambiante (RT) et colorées avec du cristal violet (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Les foyers infectieux ont été comptés manuellement.

Immunomarquages et cytométrie en flux

Après purification des culots cellulaires par 2 lavages dans du PBS, des anticorps anti-CD16/CD32 murin (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ont été ajoutés pendant 20 minutes à RT afin de bloquer la reconnaissance des anticorps de souris. Ils ont été dilués dans du tampon MACS contenant du SVF - 2% EDTA - 0,5% BSA (EDTA : Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA. BSA : Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) à un ratio de 2:50 (volume:volume). Après un lavage dans du PBS à 400 g pendant 4 minutes, les antigènes extracellulaires ont été marqués pendant 1h à RT dans l'obscurité (rapport 1:50 pour anticorps:MACS) comme suit : anti-CD45 murin marqué eF450 (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD24 murin marqué APC (eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-EpCAM marqué PE-Cy7 (eBioscience, San Diego, CA, USA) et anti-CD49f murin marqué PE (eBioscience, San Diego, CA, USA). Les étapes suivantes ont toutes été réalisées dans l'obscurité. Après 2 lavages dans du PBS, les cellules ont été fixées avec de la PFA à 4% pendant 15 minutes à RT. Après 2 lavages dans du PBS, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS contenant 10% de fixateur « Cell fix » (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Les acquisitions ont été faites au CytoFLEX S (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) et analysées sur le logiciel Kaluza (Version 2.1, Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Co-cultures

Après isolement du culot cellulaire (comme décrit ci-dessus), un million de cellules du lait ont été diluées en série (au tiers) et cultivées avec des cellules Vero E6 dans du DMEM - 2% SVF pendant 2h à 37°C et 5% de CO2. Du DMEM - 2% SVF - 1,6% CMC a été ajouté et les co-cultures ont été maintenues pendant 6 jours à 37°C et 5% CO2.

Après 3 lavages dans du PBS, les cellules Vero ont été fixées dans de la PFA à 4% pendant 15 minutes à RT et colorées avec du cristal violet. Les foyers infectieux ont été comptés manuellement.

Tests de viabilité cellulaire

Les cellules Vero ou Caco-2 ont été incubées avec du DMEM - 2% SVF, du diméthyl sulfoxide (DMSO), ou différentes concentrations d'acides gras libres, de LF ou de LA pendant 2h à 37°C. Les tapis cellulaires ont été lavés et cultivés dans du DMEM - 2% SVF à 37°C et 5% de CO2. L'activité métabolique cellulaire a été évaluée après 48h de culture par un test colorimétrique au MTT (bromure de thiazolyl bleu tétrazolium, Sigma-Aldrich).

Test d'activité antivirale de la lactoferrine, de la lactalbumine et des acides gras libres sur les cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 ont été incubées avec du DMEM - 2% SVF ou différentes concentrations d'acides gras libres, de LF, ou de LA pendant 1h à 37°C avant infection par ZIKV à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 (souche PF13 pour la LF et la LA ; souche Brazil/2016 pour les acides gras). Les inocula viraux ont été ajoutés à des cellules Caco-2 dans du DMEM - 2% SVF pendant 2h à 37°C et 5% de CO2 puis remplacés par du DMEM - 2% SVF. Les cellules ont été cultivées à 37°C et 5% de CO2 pendant 48h. Les tapis cellulaires ont été lavés 2 fois dans du PBS et soumis à une extraction des ARN intracellulaires totaux puis à une RT-qPCR afin d'amplifier le génome viral (comme décrit ci-dessus).

Test d'activité antivirale du DMSO, de l'éthanol, de la lactoferrine, de la lactalbumine et des acides gras libres sur le virus Zika

Des particules de ZIKV ont été incubées avec du DMEM - 2% SVF ou différentes concentrations de DMSO, d'éthanol, de LF, de LA ou d'acides gras (aux concentrations présentées en **figure 20**) pendant 1h à 37°C avant infection de cellules Caco-2 à une MOI de 1 (souche PF13 pour la

LF et la LA ; souche Brazil/2016 pour les acides gras et les solvants). Les inocula viraux ont été ajoutés sur les cellules Caco-2 dans du DMEM - 2% SVF, cultivées ensuite pendant 2h à 37°C et 5% de CO2. Les inocula ont été remplacés par du DMEM - 2% SVF et les cellules ont été cultivées à 37°C et 5% de CO2 pendant 48h. Les tapis cellulaires ont été lavés 2 fois dans du PBS et soumis à une extraction des ARN intracellulaires totaux puis à une RT-qPCR afin d'amplifier le génome viral (comme décrit ci-dessus).

Cinétiques de l'effet antiviral des acides gras libres sur l'infectiosité du virus Zika

Des particules de ZIKV (10^6 UFP) de la souche Brazil/2016 ont été incubées avec du DMEM - 2% SVF, de la PFA à 4%, des acides gras libres (aux concentrations présentées en **figure 20**) ou le solvant utilisé pour les diluer. À 0h, 1h, 4h ou 6h post-incubation, les titres viraux ont été déterminés par titrage en plages de lyse sur cellules Vero (comme décrit ci-dessus).

Résistance électrique trans-épithéliale

Afin d'évaluer l'intégrité des tapis cellulaires, la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) a été mesurée à l'aide d'un Ohmmètre (EVOM2, WPI, Sarasota, FL, USA). Au cours de la culture des barrières intestinales, la TEER a été mesurée avant le changement du milieu de culture. Afin d'évaluer l'effet de l'infection sur l'intégrité de la barrière intestinale, la TEER a été mesurée à 2h, 24h et 48h post-infection par la souche Dakar de YFV (MOI 1) ou post-traitement avec de l'EDTA 25% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Différenciation des cellules Caco-2 *in vitro*

Des cellules Caco-2 ont été ensemencées sur des filtres Transwell d'une porosité de 3 µm (Polycarbonate, Costar, Glendale, AZ, USA). Les cellules ont été cultivées pendant 3 semaines et la TEER a été mesurée tous les 2 jours afin de suivre l'étanchéité des barrières. Les milieux de culture apicaux et basolatéraux ont été changés tous les 2 jours, après mesure de la TEER. Lorsque la TEER dépasse 250 Ohm.cm^2, les barrières sont estimées imperméables. Les monocouches polarisées ont été observées par microscopie électronique (en collaboration avec Philippe Roingeard, Université de Tours).

Immunofluorescence

Les cellules Caco-2, ou les barrières Caco-2 cultivées sur filtre Transwell, ont été infectées ou non par la souche Dakar de YFV (MOI 1). À 24h ou 48h post-infection, après 2 lavages dans du PBS, les monocouches ont été fixées en PFA à 4% puis perméabilisées dans du PBS - 0,5% Triton 100X (Biorad) pendant 15 minutes à RT. Après saturation dans du PBS - 0,05% Tween20 - 5% BSA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), les cellules ont été immunomarquées pendant 2h à 4°C à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine de jonctions serrées ZO-1 (1/100ème, anticorps de lapin, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dans du tampon PBS - 0,2% BSA - 0,2% Tween 20 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Des anticorps secondaires anti-lapin marqués au AlexaFluor-546 ont été ajoutés (anticorps d'âne, au 1/500ème, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pendant 1h à RT dans du tampon PBS – 0,2% BSA. Les cellules Caco-2 non polarisées ont également été marquées au DAPI (0,6µM, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) pendant 5 minutes à RT puis montées sur lame dans du milieu Slowfade Diamond (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Les membranes des filtres transwell ont été découpées de leur support à l'aide d'un scalpel et montées entre lame et lamelle dans du milieu Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Les échantillons ont été observés par microscopie à fluorescence sur un microscope classique (EVOS FL, Life technologies).

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 9.1.0. Le nombre d'expériences et les tests statistiques utilisés sont détaillés dans les légendes des figures et présentés sous forme de moyenne ± déviation standard (SD).

Résultats

AXE 1 : Le virus Zika.

Il a été suggéré à plusieurs reprises que ZIKV était potentiellement transmis par allaitement. Cependant, la présence des moustiques vecteurs dans les régions endémiques rend difficile la démonstration de ce mode de transmission. Des études épidémiologiques ont rapporté la présence d'ARNv dans le lait maternel de femmes infectées par ZIKV. Une étude rapporte également la nature infectieuse du lait maternel mais le titre viral n'a, à notre connaissance, jamais été déterminé. N'ayant pas accès à du lait maternel de femmes contaminées actuellement, nous avons utilisé le modèle murin A129, fréquemment utilisé pour l'étude de l'infection par ZIKV (Dowall et al. 2016). Notre but était de confirmer la présence d'ARNv et de particules infectieuses dans le lait maternel et de déterminer le titre viral, afin d'aider à évaluer le risque que représente le lait maternel des femmes infectées pour leurs nourrissons. Par ailleurs, nous avons étudié la forme des entités infectieuses dans le lait maternel. En effet, notre but était d'identifier si le virus est présent sous forme libre ou associée aux cellules dans le lait maternel afin d'apporter de nouvelles hypothèses sur l'origine du virus dans le lait maternel et les mécanismes de franchissement de l'épithélium mammaire.

Nature des entités virales excrétées dans le lait maternel.

Des particules libres du virus Zika sont présentes dans le lait maternel de souris infectées et le virus est efficacement transmis aux souriceaux allaités.

Afin d'étudier l'excrétion de ZIKV dans le lait maternel et déterminer le titre viral, nous avons utilisé le modèle murin A129 **(figure 18)**. Après parturition, des femelles allaitantes ont été infectées par 10^6 UFP de ZIKV. Les femelles ont été infectées entre 1 et 11 jours après la mise bas, selon le jour de parturition. Celui-ci ne peut pas être prévu le même jour pour toutes les femelles car il dépend du moment de la fécondation (contact avec les mâles pendant environ une semaine) et de la durée de gestation qui peut varier de plus ou moins 2 jours. À 3 jours post-infection, des prélèvements sanguins ont été effectués afin de vérifier l'infection des souris allaitantes. À 4 jours post-infection, les rates des souriceaux ont été récupérées afin d'évaluer la transmission de ZIKV tandis que le lait maternel a été prélevé afin de rechercher et de quantifier la présence du virus.

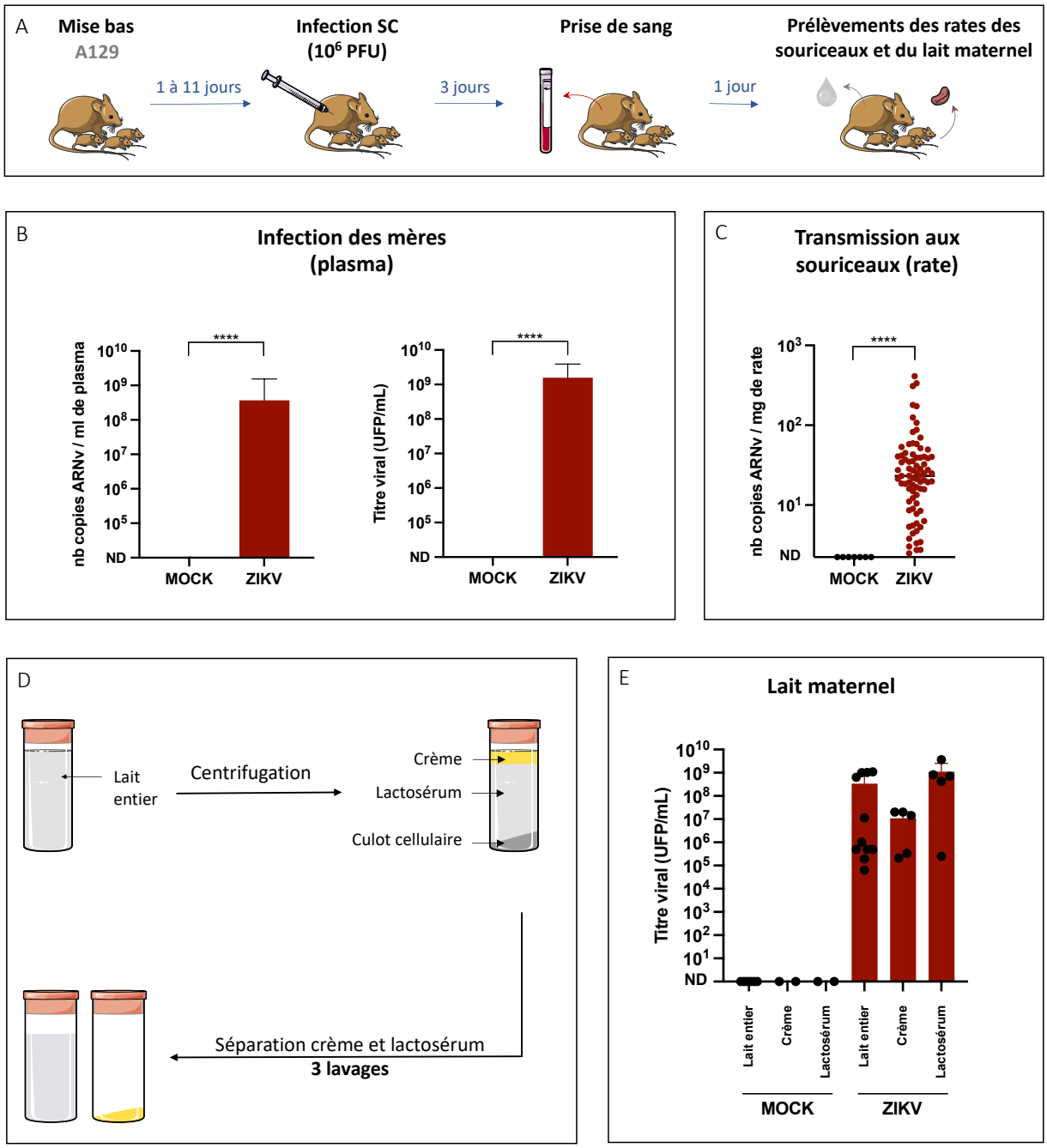


Figure 18 : Des particules libres du virus Zika sont présentes dans le lait maternel de souris infectées et le virus est efficacement transmis aux souriceaux allaités.

(A) Des souris A129 ont été infectées ou non (MOCK) entre 1 et 11 jours après la mise bas avec 10^6 UFP de la souche Brazil/2016 du virus Zika (ZIKV) par voie sous-cutanée (SC). À 3 jours post-infection, des échantillons sanguins ont été prélevés chez les mères afin de vérifier leur infection**. (B)** Les ARN viraux (ARNv) de ZIKV dans le plasma ont été amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS5 (n = 33 souris) et la présence de particules infectieuses a été déterminée par titrage en plages de lyse sur cellules Vero (n = 23 souris). **(C)** Les rates des souriceaux ont été prélevées à 4 jours post-infection afin de rechercher la présence de ZIKV par RT-qPCR et ainsi évaluer la transmission virale (n = 83 souriceaux). **(D)** Le lait maternel a été prélevé à 4 jours post-infection afin de rechercher la présence de ZIKV. La centrifugation du lait entier permet de séparer trois fractions : la crème, le lactosérum et le culot cellulaire. Les fractions liquides ont été purifiées par 3 lavages en PBS et **(E)** la présence de ZIKV a été recherchée par titrage en plages de lyse sur cellules Vero. **** : Significativement différent ($p < 0,0001$) par le test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

La présence d'ARNv et de particules infectieuses a été recherchée dans le plasma des mères par RT-qPCR (à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS5) et titrage en plages de lyse sur cellules Vero, respectivement **(figure 18)**. Chez les souris infectées, environ 2 x 10^8 copies d'ARNv ont été détectées par millilitre de plasma, variant de 3,1 x 10^6 à 6,3 x 10^8 copies/mL. Le titre viral moyen est de 1,6 x 10^9 UFP/mL et varie de 6 x 10^6 à 6,2 x 10^9 UFP/mL selon les échantillons. Ces résultats confirment l'infection virale des souris femelles allaitantes.

Dans les rates des souriceaux, la présence de l'ARNv de ZIKV a été recherchée par RT-qPCR. Plus de 90% des souriceaux allaités ont été infectés, avec en moyenne 42,3 copies d'ARNv détectées par milligramme de rate. Le poids des rates des animaux infectés varie de 11 à 68 mg selon l'âge des souriceaux.

Le lait entier des souris a été centrifugé afin de séparer les différentes fractions qui le composent : la crème, le lactosérum et le culot cellulaire. Les fractions liquides (crème et lactosérum) ont été séparées et purifiées par 3 lavages en PBS. Le titre viral a été déterminé dans ces fractions liquides, par titrage en plages de lyse sur cellules Vero. Nous avons détecté en moyenne 3,41 x 10^8 UFP/mL de lait entier (± SD = 4,8 x 10^8, 11 échantillons). Dans la crème et le lactosérum, nous avons détecté 1,09 x 10^7 UFP/mL (± SD = 10^7, 5 échantillons) et 1,12 x 10^9 UFP/mL (± SD = 1,4 x 10^9, 5 échantillons), respectivement.

Ces résultats montrent la présence d'un haut titre de particules virales infectieuses dans le lait maternel des souris infectées post-partum, confirmant que le lait maternel pourrait conduire à une transmission du virus par allaitement.

Le lait maternel contenant un grand nombre de cellules maternelles, qui sont transmises au nourrisson pendant l'allaitement, des cellules infectées pourraient être présentes et participer à la transmission de ZIKV au nouveau-né. Nous avons donc tenté d'identifier les types cellulaires présents dans le lait murin et étudié leur capacité à transmettre ZIKV.

Identification des types cellulaires du lait murin et présence de virus Zika associé aux cellules.

Les souris allaitantes ont été infectées selon le même protocole que dans la figure précédente **(figure 18)**. Le lait prélevé à 4 jours post-infection a été centrifugé afin d'isoler le culot cellulaire **(figure 19-A)**. Celui-ci a été lavé 3 fois en PBS afin d'éliminer les particules libres présentes dans les fractions liquides. Le culot cellulaire purifié a été soumis à des immunomarquages contre les antigènes CD45, CD24, EpCAM et CD49f. Par cytométrie en flux, selon l'expression du CD45 et du CD24, nous avons identifié les cellules immunitaires et épithéliales, respectivement **(figure 19-B)**. Dans les échantillons des souris MOCK et des souris infectées par ZIKV, en moyenne 2,85% et 1,28% de cellules CD45-positives ont été détectées, respectivement. Concernant les cellules CD24-positives, elles représentent en moyenne 70,9% et 88,5% des cellules du lait des souris MOCK et ZIKV respectivement, démontrant la présence d'une majorité de cellules épithéliales dans le lait murin. Ces résultats sont comparables au lait humain car 1 à 2% de leucocytes et 60 à 98% de cellules épithéliales (luminales, myoépithéliales et précurseurs confondus) ont été détectées dans le lait mature (Witkowska-Zimny et al. 2017).

Parmi les cellules CD45-négatives, l'expression des marqueurs CD24 et CD49f nous a permis d'identifier deux populations cellulaires : les progéniteurs luminaux immatures ($CD24^{high}/CD49f^{high}$) et les cellules luminales matures ($CD24^{high}/CD49f^{med}$) **(figure 19-C)**. Dans tous les échantillons de lait, les cellules les plus abondantes étaient $CD24^{high}/CD49f^{med}$ avec une moyenne de 68% dans les échantillons MOCK et 79,1% dans les échantillons ZIKV. Dans certains échantillons (ZIKV : 5/7, MOCK : 2/2), une population de cellules $CD24^{high}/CD49f^{high}$ a été détectée, variant de 1,24% à 8,6% de cellules dans les échantillons MOCK et de 1,88% à 15,2% dans les échantillons ZIKV. Cette population cellulaire correspond aux progéniteurs luminaux immatures.

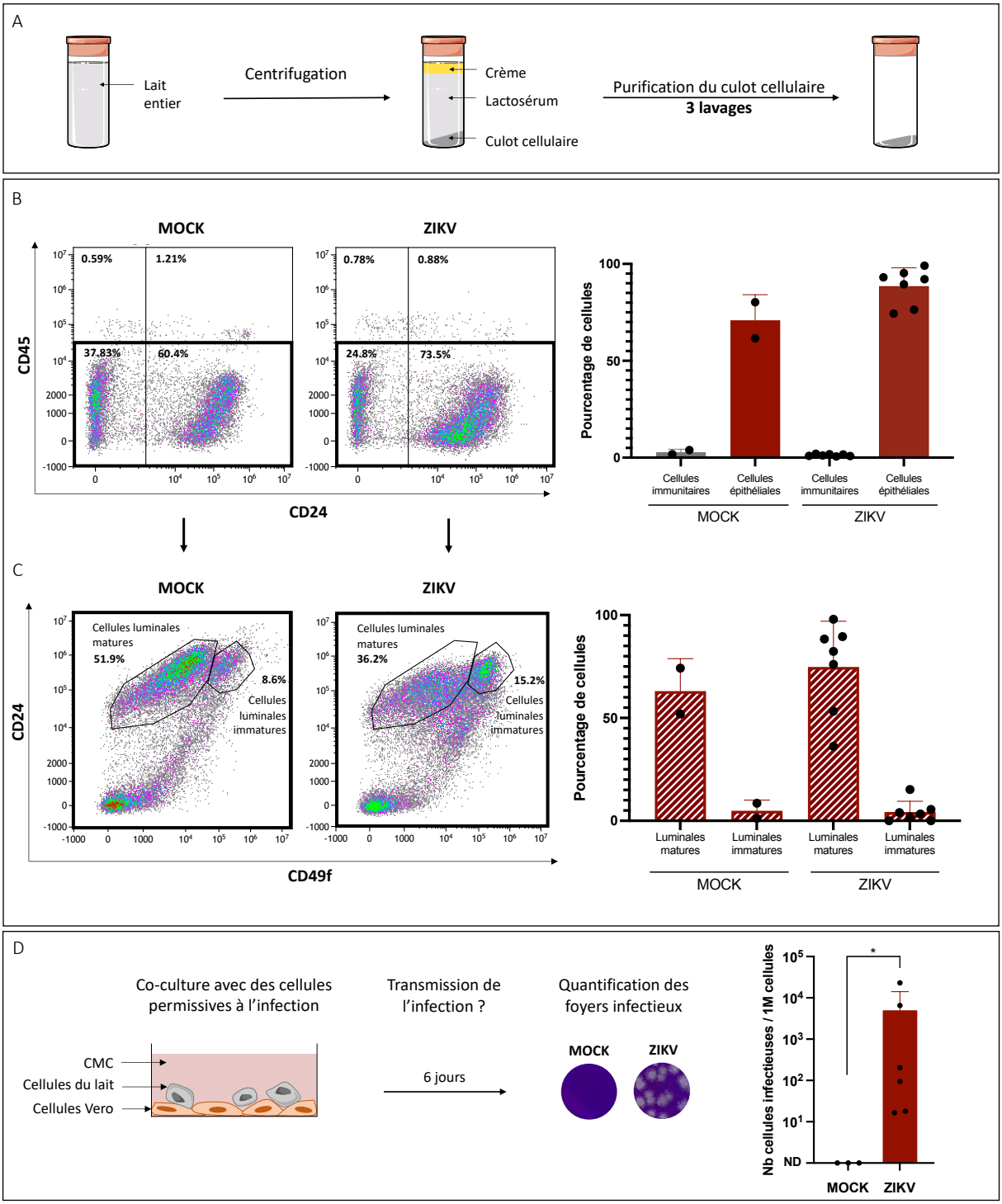


Figure 19 : Identification des types cellulaires du lait murin et présence de virus Zika associé aux cellules. **(A)** Le lait maternel prélevé à 4 jours post-infection a été centrifugé afin de séparer la crème, le lactosérum et le culot cellulaire. Les cellules ont été lavées 3 fois en PBS afin d'éliminer les particules libres du virus Zika (ZIKV), présentes dans les fractions liquides**. (B)** Le pourcentage de cellules immunitaires (CD45-positives) et épithéliales (CD24-positives) a été déterminé par immunomarquage puis cytométrie en flux (ZIKV : n = 7, dans 3 expériences distinctes. MOCK : n = 2, dans 2 expériences distinctes). **(C)** Parmi les cellules CD45-negatives, le pourcentage de cellules épithéliales luminales matures et immatures a été déterminé selon l'expression du marqueur CD49f. **(D)** La capacité des cellules du lait à transmettre l'infection a été évaluée par co-culture d'un million (1M) de cellules du lait avec des cellules Vero (n = 6 en duplicats) en présence de carboxymethyl-cellulose (CMC). Après 6 jours de co-culture, les cellules Vero ont été lavées 3 fois en PBS et fixées en paraformaldéhyde 4% puis marquées au cristal violet. Le nombre de foyers infectieux a été compté manuellement. * : Significativement différent (p = 0.0015) selon le test de Mann–Whitney (p < 0,05).

Nous avons ensuite étudié si les cellules du lait sont infectées. Il n'a pas été possible d'analyser leur infection par immunomarquage et cytométrie en flux car aucun signal n'a été détecté, probablement dû à une trop faible expression de la protéine d'enveloppe dans les cellules du lait car celles-ci sont métaboliquement très peu actives. Afin d'amplifier le signal, nous avons évalué la capacité des cellules du lait à transmettre l'infection à des cellules Vero, permissives à l'infection par ZIKV **(figure 19-D)**. Un million de cellules du lait murin ont été co-cultivées avec des cellules Vero en présence de CMC. Après 6 jours de co-culture, les tapis cellulaires ont été lavés 2 fois en PBS, fixés en PFA 4% et colorés au cristal violet afin de quantifier le nombre de foyers d'infection. Le nombre de foyers d'infection dans les échantillons ZIKV varie de 1,65 x 10^1 à 2,3 x 10^4 cellules infectieuses par million de cellules, avec une corrélation entre les titres viraux déterminés dans le lait entier et le nombre de cellules infectieuses dans les mêmes échantillons (Test de Spearman, rho = 0,9). Le lait maternel de souris infectées contient donc du virus associé aux cellules.

Le lait maternel murin contenant du virus infectieux, nous nous sommes demandé si des stratégies de traitement du lait maternel ou des composants de celui-ci pourraient altérer l'infectiosité de ZIKV.

Effet des composants du lait sur l'infection par le virus Zika.

Pour qu'un virus soit transmis par allaitement, il est nécessaire que celui-ci soit stable dans le lait maternel et que son infectiosité soit conservée (Van de Perre et al. 2021). Différents composants du lait maternel peuvent montrer un effet antiviral tels que les immunoglobulines de type A, le lyzozyme, la lactoferrine (LF) ou les acides gras libres (pour revue : Desgraupes et al. 2021). Nous nous sommes intéressés à la capacité de certains composants du lait à inhiber ou diminuer l'infection par ZIKV : la LF et les acides gras libres, ainsi que la lactalbumine (LA) (protéine la plus abondante du lait maternel). Nous avons étudié leur capacité à inactiver ZIKV dans le but de disposer d'outils pouvant potentiellement être considérés à des fins préventives ou thérapeutiques, dans le cadre de la transmission de ZIKV par allaitement.

Dans le lait maternel humain, les concentrations en acides gras libres varient considérablement en fonction de l'alimentation des mères, de la période de lactation, du moment de la tétée, etc (Ballard et al. 2013)(Bobiński and Bobińska 2020)… Les concentrations

en acides gras du lait maternel ont été décrites par *Cruz-Hernandez et al*. (à 4 semaines post-partum) **(figure 20)** (Cruz-Hernandez et al. 2013). Dans cette étude, les acides gras saturés C10:0, C14:0 et C18:0 sont en moyenne à une concentration de 0,6 mg/mL, 2 mg/mL et 2 mg/mL, respectivement. Les acides gras insaturés C18:1, C18:2 et C18:3 sont en moyenne à une concentration de 12,3 mg/mL, 5,6 mg/mL et 0,5 mg/mL, respectivement.

Concernant la LF et la LA, leurs concentrations décroissent au cours de la lactation. En effet, dans le colostrum, la LF et la LA sont à 3,16 mg/mL et 3,62 mg/mL respectivement, tandis que dans le lait mature, 0,9 mg/mL et 2,68 mg/mL sont détectés **(figure 21)**.

Nous avons utilisé les cellules Caco-2 (lignée entérocytaire humaine) afin d'étudier l'effet de la LF, de la LA et des acides gras libres sur l'infection par ZIKV car, lors de la transmission virale par allaitement, l'épithélium intestinal du nourrisson entre en contact avec le lait maternel infecté et constituerait une des portes d'entrées du virus dans l'organisme (Hubert et al. 2020).

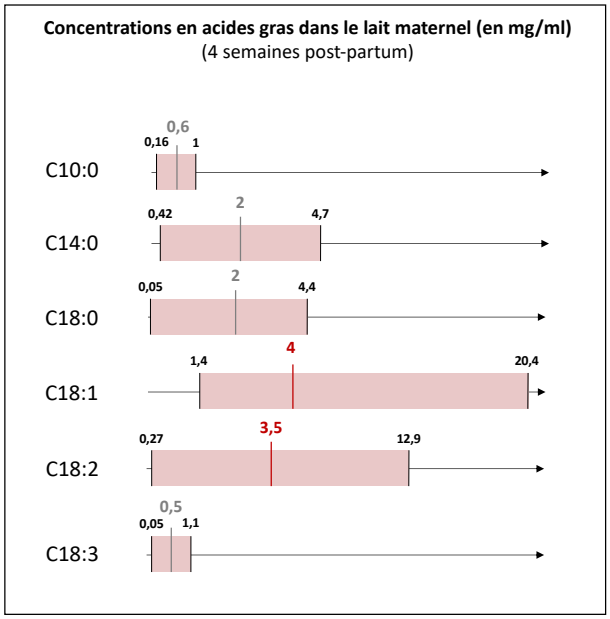


Figure 20 : Concentrations en acides gras libres dans le lait maternel humain à 4 semaine post-partum.
Les concentrations en acides gras libres dans le lait maternel ont été déterminées par *Cruz-Hernandez et al.* à 4 semaines post-partum (*Cruz-Hernandez et al., 2013*). Les valeurs extrêmes sont indiquées en noir (en mg/mL). Dans nos expériences, les concentrations moyennes (gris) de chaque acide gras ont été utilisées, à l'exception des acides gras C18:1 et C18:2 pour lesquels ces concentrations sont cytotoxiques. Nous avons donc utilisé les concentrations maximales non cytotoxiques (rouge) pour ces deux acides gras, déterminées en figure 22.

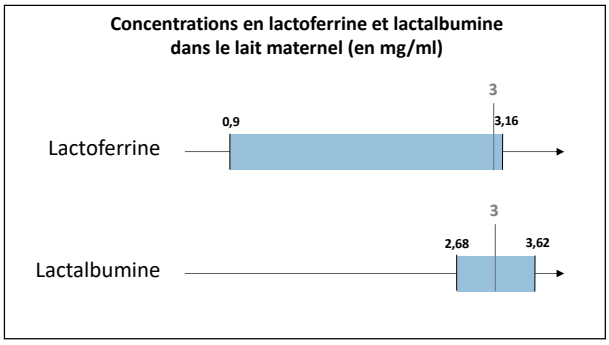


Figure 21 : Échelle de variation des concentrations en lactoferrine et lactalbumine au cours de l'allaitement.
Le contenu en lactoferrine et lactalbumine dans le lait décroit au cours de la lactation. D'après *Yang et al*. (*Yang et al*., *2018*), la lactoferrine dans le colostrum est à environ 3,16 mg/mL puis décroit jusqu'à 0,9 mg/mL dans le lait mature. D'après *Lönnerdal et al*. (*Lönnerdal et al*., *1976*), la lactalbumine est à 3,62 mg/mL dans le colostrum et décroit à 2,68 mg/mL dans le lait mature.

Effet de la lactoferrine, de la lactalbumine et des acides gras sur la viabilité des cellules Caco-2.

Puisque le lait contaminé entre en contact avec l'épithélium intestinal du nourrisson lors de l'allaitement, nous avons réalisé les expériences sur la lignée cellulaire Caco-2 (de phénotype entérocytaire). Afin d'évaluer l'effet de ces composants sur l'infection par ZIKV, nous avons commencé par contrôler leur cytotoxicité sur les cellules Caco-2 **(figure 22)**. Des cellules Caco-2 ont été incubées avec différentes concentrations de LF, de LA ou d'acides gras libres pendant 2h à 37°C. Après un lavage et 48h de culture, la viabilité cellulaire a été déterminée par un test au MTT. Aucune des concentrations de LF et de LA testées (de 0,5 à 5 mg/mL) n'a d'effet notable sur la viabilité des cellules Caco-2. Pour les acides gras saturés, les concentrations inférieures ou égales à 2 mg/mL ne sont pas cytotoxiques pour les cellules Caco-2. Pour les acides gras insaturés C18:1, C18:2 et C18:3, les concentrations maximales non cytotoxiques sont de 4 mg/mL, 3,5 mg/mL et 0,8 mg/mL, respectivement.

Dans nos expériences suivantes, seules des concentrations non cytotoxiques ont été utilisées. Pour tous les acides gras, à l'exception de C18:1 et C18:2, les concentrations moyennes du lait maternel (présentées en **figure 20**) ont été utilisées. Pour C18:1 et C18:2, à défaut de pouvoir utiliser les concentrations physiologiques moyennes car celles-ci sont cytotoxiques, les concentrations maximales non cytotoxiques ont été utilisées (4 mg/mL et 3,5 mg/mL) **(figure 20)**.

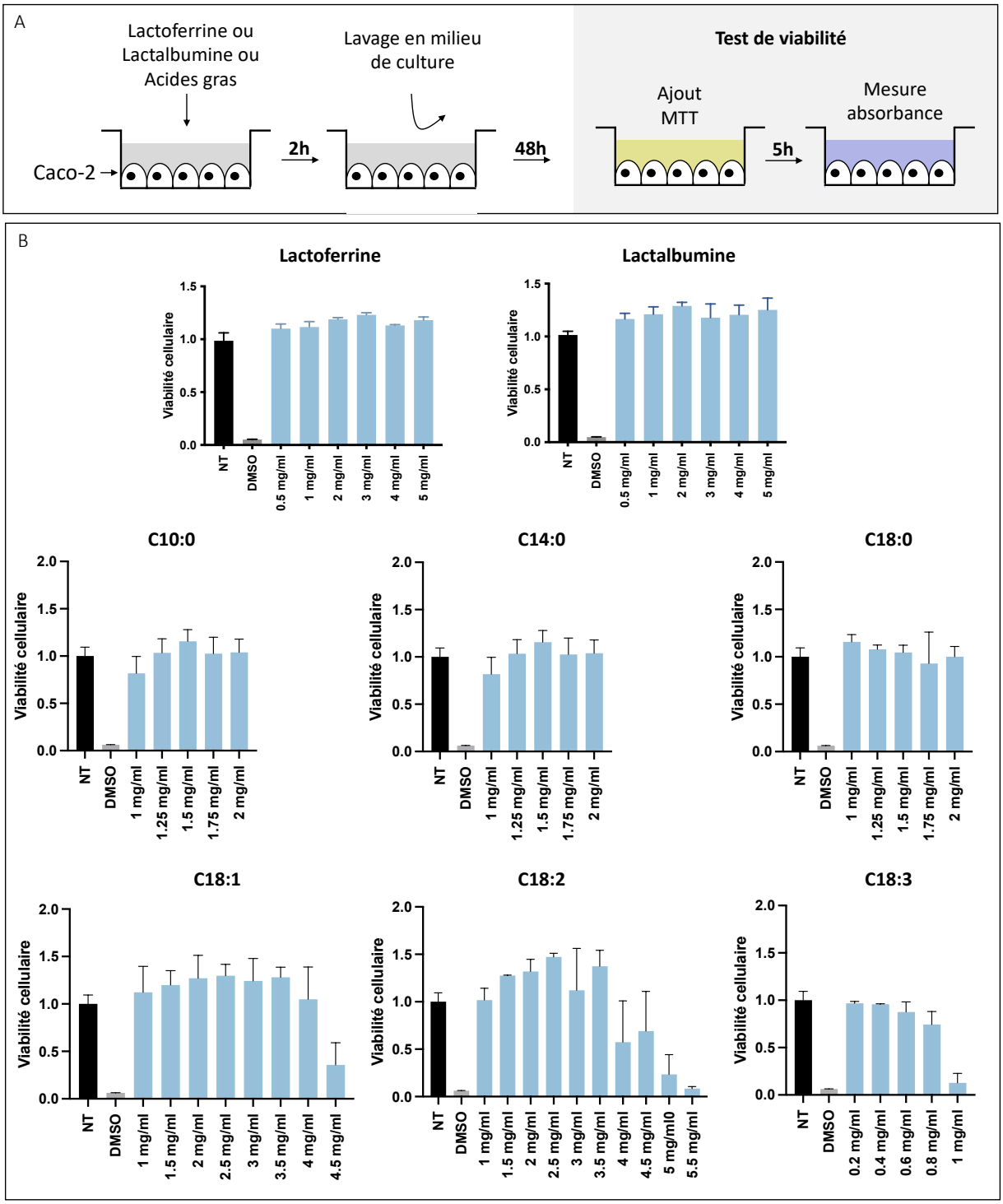


Figure 22 : Effet de la lactoferrine, de la lactalbumine et des acides gras libres sur la viabilité des cellules Caco-2.

(A) Des cellules Caco-2 ont été incubées avec du milieu de culture (NT), du diméthyl sulfoxide (DMSO) ou différentes concentrations de lactoferrine, de lactalbumine ou d'acides gras libres pendant 2h à 37°C. Les tapis cellulaires ont été lavés en milieu de culture et cultivés pendant 48h à 37°C avant le test de viabilité cellulaire au MTT (Lactoferrine et lactalbumine : n =2, en triplicats. Acides gras : n = 1, en triplicats). Après 5h de culture en présence de MTT, l'absorbance des surnageants cellulaires a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm afin d'évaluer la viabilité cellulaire. **(B)** Les résultats ont été normalisés par rapport à l'absorbance des cellules non traitées.

Effet de l'éthanol et du diméthyl sulfoxide sur l'infectiosité des particules du virus Zika.

Les acides gras étant insolubles en phase aqueuse, ces derniers ont été resuspendus en éthanol ou en DMSO. Nous avons donc contrôlé l'effet de ces solvants sur l'infectiosité des particules virales de ZIKV **(figure 23)**. Les virions ont été pré-incubés, pendant 1h à 37°C, avec différentes concentrations en éthanol ou en DMSO avant l'infection de cellules Caco-2 à une MOI de 1. À 48h post-infection, après lavage des tapis cellulaires en PBS et extraction des ARN intracellulaires totaux, les ARN viraux ont été amplifiés par RT-qPCR.

Parmi les concentrations testées, les concentrations maximales d'éthanol (10%) et de DMSO (16%) ont induit une légère diminution (d'un facteur 10) du nombre de copies d'ARNv détectées par microgramme d'ARN total dans les cellules Caco-2. Pour les concentrations inférieures, aucun effet sur le nombre de copies intracellulaires d'ARNv n'a été constaté. En effet, pour toutes ces conditions, environ 10^4 copies d'ARNv ont été détectées par microgramme d'ARN total. Ces concentrations en solvants ont donc pu être utilisées pour les expériences.

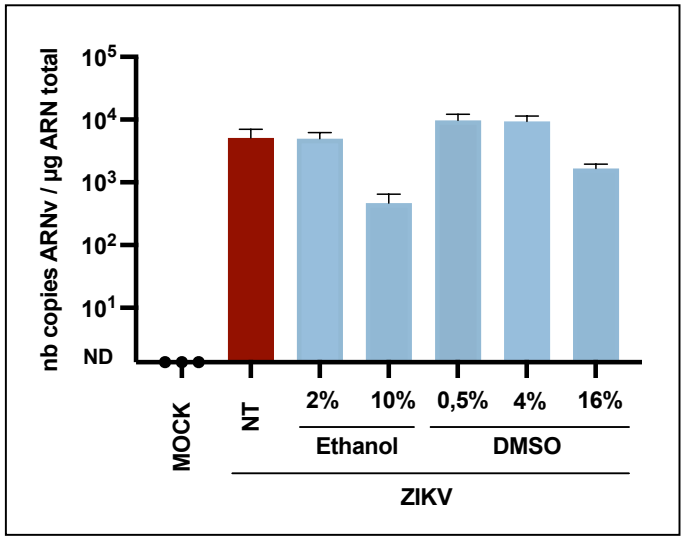


Figure 23 : Effet de l'éthanol et du diméthyl sulfoxide sur l'infectiosité des particules du virus Zika.
Des particules du virus Zika (ZIKV) ont été incubées avec du milieu de culture (NT) ou différentes concentrations d'éthanol ou de diméthyl sulfoxide (DMSO) pendant 1h à 37°C avant l'infection ou non (MOCK) de cellules Caco-2 (MOI 1). À 48h post-infection, les tapis cellulaires ont été lavés deux fois en PBS. Après extraction des ARN intracellulaires totaux, les ARN viraux (ARNv) ont été amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS5 (n = 1, en triplicats).

La lactoferrine, la lactalbumine et certains acides gras libres n'ont pas d'effet sur l'infectabilité des cellules Caco-2 par le virus Zika.

Nous avons étudié l'effet de la LF, de la LA et des acides gras libres sur l'infectabilité des cellules Caco-2 par ZIKV **(figure 24)**. Ces cellules ont été pré-incubées, avant infection, avec des concentrations physiologiques des différents composants : 1 à 3 mg/mL de LF et de LA, ou les concentrations en acides gras libres présentées en **figure 20**. Après pré-incubation des cellules Caco-2 avec les composants d'intérêt pendant 1h à 37°C, celles-ci ont été infectées

par ZIKV à une MOI de 1. À 48h post-infection, après lavage des tapis cellulaires en PBS et extraction des ARN intracellulaires totaux, les ARN viraux ont été amplifiés et quantifiés par RT-qPCR.

Aucun effet antiviral significatif n'a été constaté entre les infections par des particules virales non traitées ou pré-incubées avec de la LF ou de la LA. En effet, pour chacune de ces conditions, environ 10^6 copies d'ARNv ont été détectées par microgramme d'ARN total. En revanche, pour les acides gras libres, bien qu'aucun effet antiviral n'ait été constaté de façon significative, une légère augmentation du nombre de copies intracellulaires d'ARNv a été observé (d'un facteur 10).

Ces résultats suggèrent que la LF, la LA et les acides gras libres ne diminuent pas la sensibilité des cellules Caco-2 à l'infection par ZIKV.

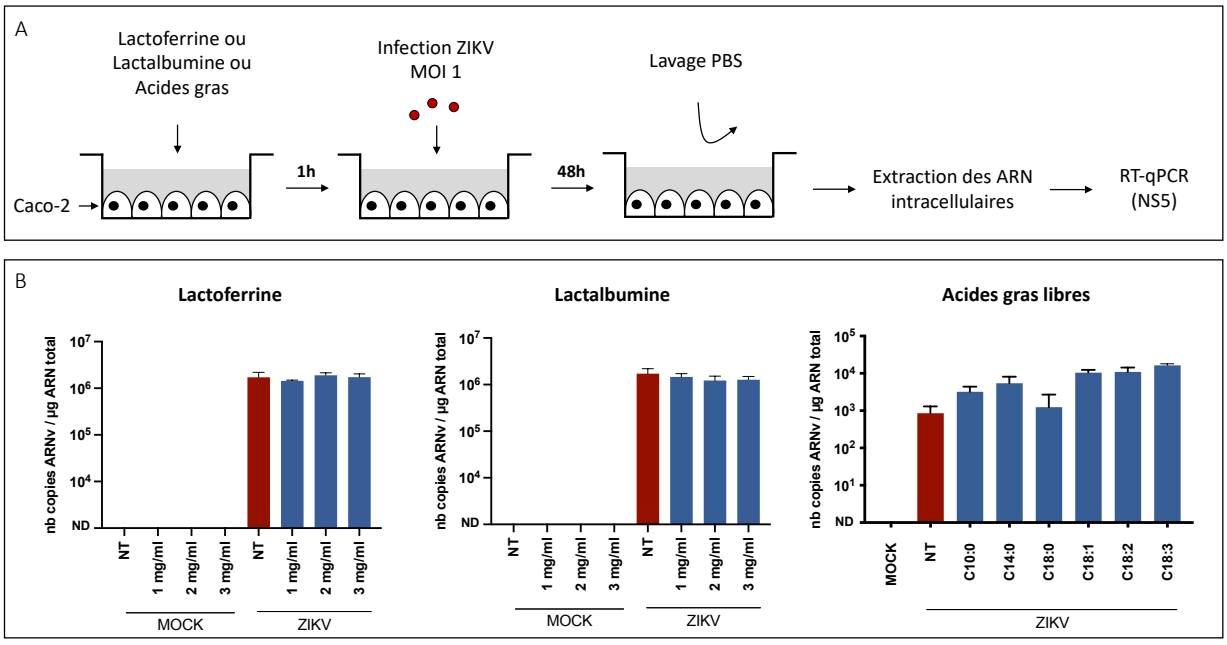


Figure 24 : La lactoferrine, la lactalbumine et certains acides gras libres n'ont pas d'effet sur l'infectabilité des cellules Caco-2 par le virus Zika.
(A) Les cellules Caco-2 ont été incubées avec du milieu de culture (NT) ou différentes concentrations de lactoferrine, de lactalbumine ou d'acides gras libres pendant 1h à 37°C avant infection par le virus Zika (ZIKV) (MOI 1). Pour chaque acide gras libre, la concentration utilisée est celle présentée précédemment en figure 20. À 48h post-infection, les tapis cellulaires ont été lavés deux fois en PBS. Après extraction des ARN intracellulaires totaux, les ARN viraux (ARNv) ont été amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS5. **(B)** Les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ARNv (déterminées à l'aide d'une courbe standard) et normalisés par rapport à la quantité d'ARN totaux. (n = 1, en triplicats).

Certains acides gras libres inhibent l'infectiosité des particules du virus Zika, contrairement à la lactoferrine et à la lactalbumine.

Afin d'étudier l'effet de la LF, de la LA et des acides gras libres sur l'infectiosité des particules virales de ZIKV, des virions ont été pré-incubés avec ces composants avant l'infection de cellules Caco-2 à une MOI de 1 **(figure 25)**. À 48h post-infection, après lavage des tapis cellulaires en PBS et extraction des ARN intracellulaires totaux, les ARN viraux ont été amplifiés par RT-qPCR.

Aucune différence significative du nombre de copies d'ARNv par microgramme d'ARN total n'a été constatée entre les cellules infectées par des particules virales non traitées ou pré-incubées avec de la LF ou de la LA : environ 10^6 copies/µg d'ARN total sont détectées dans les deux conditions. Concernant les acides gras libres, suite à la pré-incubation de ZIKV avec C10:0, C18:0, C18:1 ou C18:2, aucun ARNv n'a été détecté dans les cellules Caco-2. Pour les acides gras C14:0 et C18:3, des diminutions d'un facteur 100 et d'un facteur 10 ont été observées, respectivement.

D'après ces résultats, la LF et la LA n'altèreraient pas l'infectiosité des particules de ZIKV aux concentrations physiologiques, tandis que les acides gras libres testés sembleraient inactiver, plus ou moins efficacement, les particules virales.

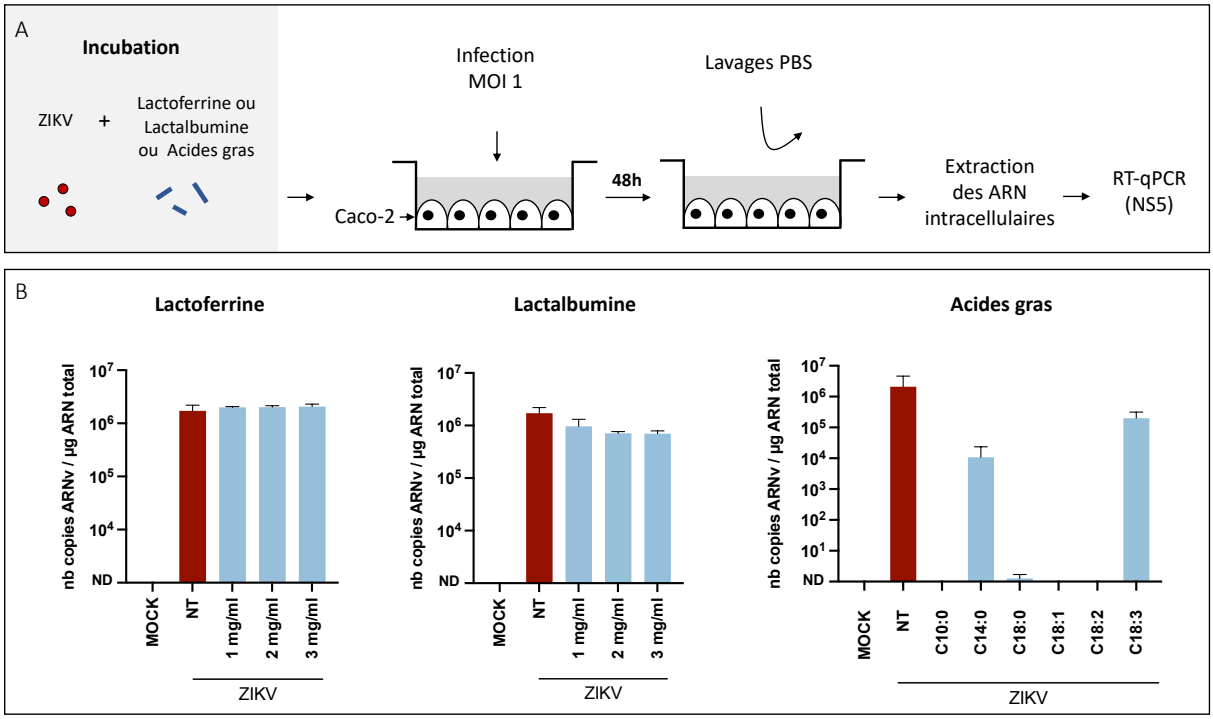


Figure 25 : Certains acides gras libres inhibent l'infectiosité des particules du virus Zika, contrairement à la lactoferrine et à la lactalbumine.

(A) Des particules du virus Zika (ZIKV) ont été incubées avec du milieu de culture (NT), de la lactoferrine, de la lactalbumine ou des acides gras libres (aux concentrations déterminées en figure 20) pendant 1 h à 37 °C avant infection ou non (MOCK) de cellules Caco-2 (MOI 1). À 48 h post-infection, les tapis cellulaires ont été lavés deux fois en PBS. Après extraction des ARN intracellulaires totaux, les ARN viraux (ARNv) ont été amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS5. **(B)** Les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ARNv (déterminées à l'aide d'une courbe standard) et normalisés par rapport à la quantité d'ARN totaux. (n = 1, en triplicats).

Effet des acides gras sur la viabilité des cellules Vero.

Afin d'étudier plus en détail l'inactivation des particules virales de ZIKV par les acides gras libres, nous avons réalisé des cinétiques de titrage des particules virales infectieuses en plages de lyse sur cellules Vero. Afin d'utiliser ce modèle cellulaire, nous avons d'abord contrôlé l'effet des acides gras libres sur la viabilité des cellules Vero **(figure 26)**. Celles-ci ont été incubées avec différentes concentrations d'acides gras libres pendant 2h à 37°C. Après un lavage et 48h de culture, la viabilité cellulaire a été déterminée par un test au MTT.

Les acides gras C10:0, C18:0 et C18:1 n'ont pas d'effet sur la viabilité des cellules Vero jusqu'à 1 mg/mL (concentration maximale testée). En revanche, les acides gras C14:0, C18:2 et C18:3, peuvent être utilisés sur les cellules Vero à des concentrations maximales non cytotoxiques de 0,8 mg/mL, 0,6 mg/mL et 0,2 mg/mL, respectivement.

Dans nos expériences, les concentrations en acides gras présentées précédemment (telles qu'indiquées en **figure 20**) ont pu être utilisées pour la pré-incubation des particules virales. Les inocula ont ensuite été dilués au moins au 10ème avant l'infection des cellules Vero, afin de déposer des concentrations en acides gras non cytotoxiques.

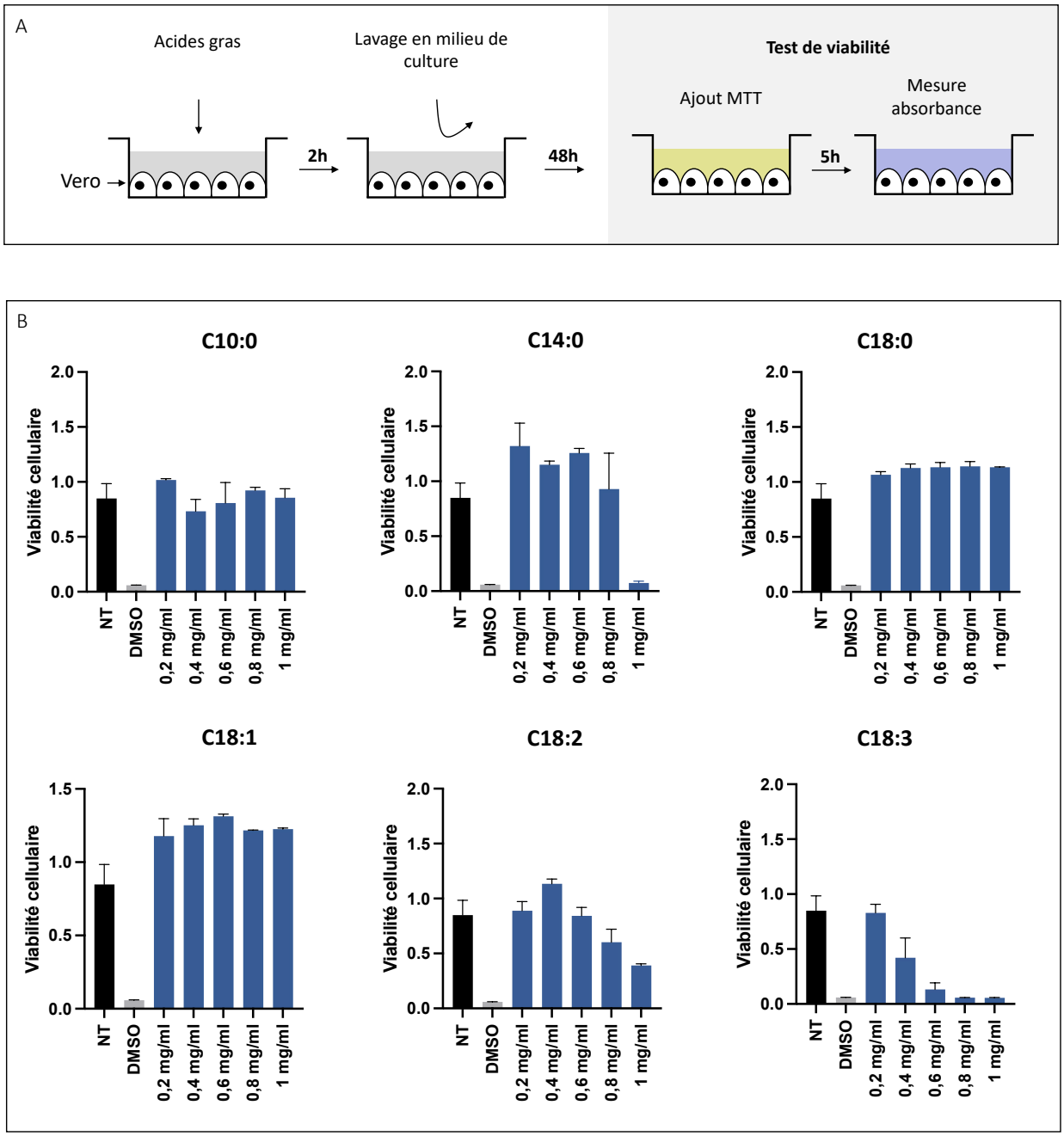


Figure 26 : Effet des acides gras sur la viabilité des cellules Vero.
(A) Des cellules Vero ont été incubées avec du milieu de culture (NT), du diméthyl sulfoxide (DMSO) ou différentes concentrations d'acides gras libres pendant 2h à 37°C. Les tapis cellulaires ont été lavés en milieu de culture et cultivés pendant 48h à 37°C avant le test de viabilité cellulaire au MTT (n = 1, en triplicats). Après 5h de culture en présence de MTT, l'absorbance des surnageants cellulaires a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm afin d'évaluer la viabilité cellulaire. **(B)** Les résultats ont été normalisés par rapport à l'absorbance des cellules non traitées.

Cinétiques d'inactivation des particules du virus Zika par les acides gras libres.

Afin d'étudier plus en détails l'inactivation des particules virales de ZIKV par les acides gras, nous avons étudié l'effet de ces derniers sur l'infectiosité du virus au cours du temps **(figure 27)**. Des particules de ZIKV ont été pré-incubées avec du milieu de culture, de la PFA 4% (afin d'inactiver les particules virales), des acides gras libres (aux concentrations physiologiques présentées en **figure 20**) ou le solvant utilisé pour les remettre en suspension (à des concentrations identiques). À différents temps post-incubation (0h, 1h, 4h et 6h), les inocula viraux ont été titrés en plages de lyse sur cellules Vero. Après 5 jours de culture, les tapis cellulaires ont été lavés 2 fois en PBS, fixés en PFA 4% et colorés au cristal violet afin de quantifier les foyers infectieux.

Comme attendu, aucune inactivation des particules virales non traitées n'a été observée au cours du temps tandis que la PFA inactive ZIKV en moins d'1h (premier temps testé).

Les acides gras étant resuspendus en éthanol ou en DMSO, les particules virales ont été pré-incubées soit avec l'acide gras dans son solvant, soit avec le solvant seul (à la même concentration). La pré-incubation des particules virales avec de l'éthanol ou du DMSO a entraîné une légère diminution de l'infectiosité virale pour la plupart des concentrations testées, sauf pour le contrôle C18:0 qui a diminué d'un facteur 10^5 à 6h d'incubation. Cependant, C18:0 diminue l'infectiosité de ZIKV dès 1h d'incubation et inactive totalement les particules virales dès 4h, lorsque ce n'est pas le cas pour le solvant. Ces résultats suggèrent donc que l'acide gras C18:0 inactive les particules virales de ZIKV.

Contrairement au C18:0, les autres acides gras saturés C10:0 et C14:0 n'ont exercé aucun effet sur l'infectiosité du virus jusqu'à 6h d'incubation. Enfin, concernant les acide gras insaturés, le mono-insaturé C18:1 inactive ZIKV en moins d'1h tandis que les acides gras poly-insaturés C18:2 et C18:3 l'inactivent en 4h.

En conclusion, les acides gras saturés C10:0 et C14:0 ne semblent pas impacter l'infectiosité de ZIKV aux concentrations testées tandis que les acides gras insaturés C18:1, C18:2 et C18:3, ainsi que le C18:0, inhibent de façon significative l'infectiosité des particules virales.

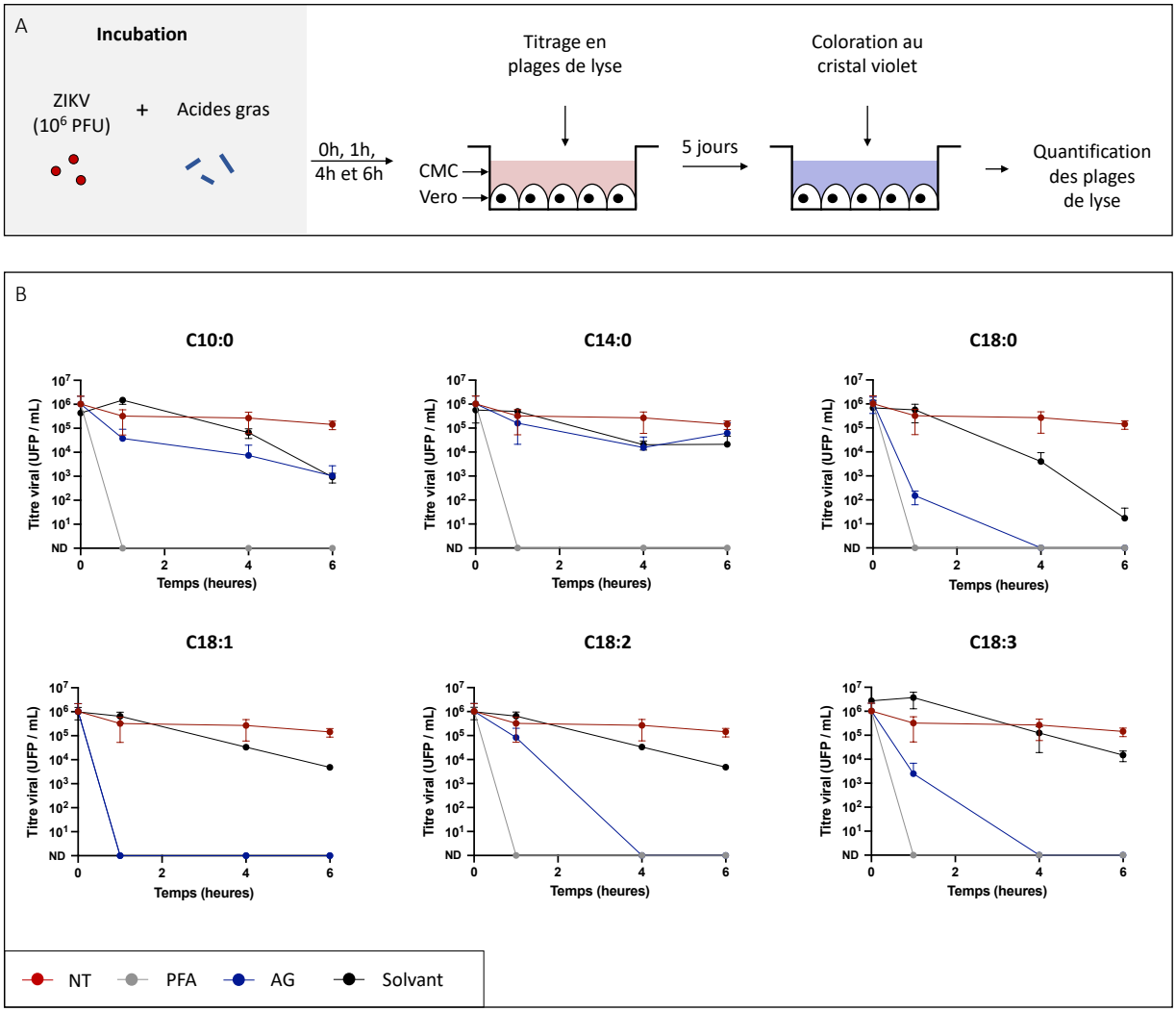


Figure 27 : Cinétiques d'inactivation des particules du virus Zika par les acides gras libres.
(A) Pour déterminer si les acides gras libres exercent une activité antivirale, 10^6 UFP de particules du virus Zika (ZIKV) ont été incubées avec du milieu de culture (NT), du paraformaldéhyde à 4 % (PFA), des acides gras libres (AG) ou le solvant utilisé pour les diluer (solvant) pendant 6 h. À plusieurs temps post-incubation (0h, 1h, 4h et 6h), les titres viraux ont été déterminés par titrage en plages de lyse sur cellules Vero. Après 5 jours à 37°C en présence de carboxymethyl-cellulose (CMC), les cellules Vero ont été lavées 3 fois en PBS et fixées en paraformaldéhyde 4% puis marquées au cristal violet. **(B)** Le nombre de foyers infectieux a été compté manuellement et les titres viraux ont été représentés en fonction du temps. (n = 4, en triplicats)

AXE 2 : Le virus de la fièvre jaune.

Chez l'Homme, la transmission de la souche vaccinale de YFV par allaitement a été décrite, conduisant au développement de symptômes neurologiques sévères chez le nourrisson. Afin de renseigner sur le risque de transmission par allaitement de souches sauvages de YFV, nous avons étudié les mécanismes associés à la transmission par allaitement : (i) la dissémination virale jusqu'à la glande mammaire, (ii) l'excrétion du virus dans le lait maternel et (iii) le franchissement de l'épithélium intestinal du nourrisson et les mécanismes associés.

Mécanismes de franchissement de la barrière épithéliale mammaire de la mère.

Dissémination de la souche Dakar du virus de la fièvre jaune aux glandes mammaires de souris.

Pour qu'un virus soit transmis par allaitement, il est indispensable que ce dernier dissémine jusqu'aux glandes mammaires et franchisse une barrière (e.g. la barrière épithéliale mammaire). Afin d'étudier la capacité de YFV à disséminer jusqu'aux glandes mammaires, le modèle murin A129 a été utilisé **(figure 28)**. Les souris A129 sont un modèle pertinent pour l'étude de l'infection par YFV et développent une pathologie viscérotrope rappelant la fièvre jaune humaine (au lieu des signes encéphalitiques généralement observés chez la souris) (Meier et al. 2009). Des souris femelles ont été infectées par 10^5 UFP de la souche Dakar de YFV par voie sous-cutanée. À 3 et 5 jours post-infection, des prélèvements sanguins ont été effectués afin de vérifier l'infection des souris et, après euthanasie, des glandes mammaires thoraciques, abdominales et inguinales ont été prélevées **(figure 28)**. Après broyage et clarification des glandes mammaires, la présence d'ARNv et de particules infectieuses a été recherchée par RT-qPCR (à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS3) et titrage en plages de lyse sur cellules Vero, respectivement.

Après extraction des ARN présents dans le plasma des souris, l'ARNv de YFV a été quantifié par RT-qPCR. Dès J3, en moyenne 3,1 x 10^2 copies d'ARNv ont été détectées par millilitre de plasma tandis qu'à J5, environ 4,5 x 10^2 copies/mL ont été détectées, confirmant l'infection des souris.

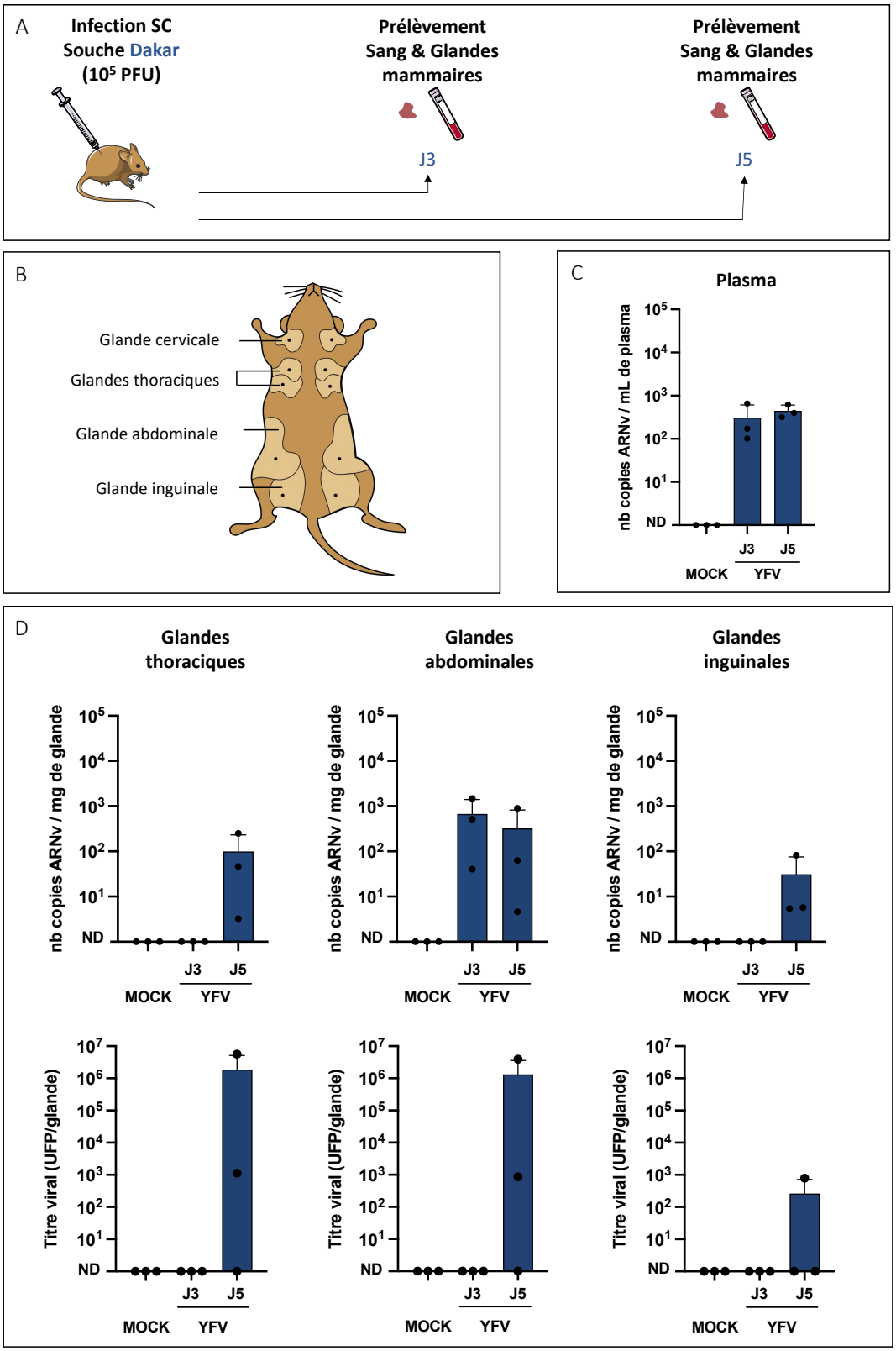


Figure 28 : Dissémination de la souche Dakar du virus de la fièvre jaune aux glandes mammaires de souris. **(A)** Des souris A129 ont été infectées avec 10^5 UFP de la souche Dakar du virus de la fièvre jaune (YFV) par voie sous-cutanée (SC). À 3 et 5 jours post-infection, des échantillons sanguins ont été prélevés afin d'évaluer l'infection des souris. Après euthanasie, des glandes mammaires **(B)** thoraciques, abdominales et inguinales ont été prélevées. **(C)** Après centrifugation du sang, les ARN du plasma ont été extraits. Les ARN viraux (ARNv) ont été amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS3. **(D)** La présence de YFV dans les glandes mammaires a été recherchée par RT-qPCR et titrage en plages de lyses sur cellules Vero. (n = 1, 3 souris par groupe)

Pour les glandes mammaires, toutes contiennent de l'ARNv et des particules infectieuses mais les résultats sont apparemment très variables selon les souris et selon les paires de glandes mammaires. En effet, en termes de cinétique, l'ARNv n'a pas été détecté à J3 dans les glandes thoraciques et inguinales tandis qu'environ 6,7 x 10^2 copies ont été détectées par milligramme de glande abdominale. À J5, les charges virales dans les glandes thoraciques, abdominales et inguinales varient respectivement de 3,2 x 10^0 à 2,5 x 10^2, 4,6 x 10^0 à 9 x 10^2 et 5,4 x 10^0 à 8,2 x 10^1 copies par milligramme de glande. Cependant, bien que des différences de cinétique et de charges virales aient été observées, l'ARNv est détecté dans la glande mammaire chez toutes les souris infectées (6/6).

Concernant les titrages en plages de lyse, à J3, aucune particule infectieuse n'a été détectée dans les glandes mammaires. À J5, bien que des particules infectieuses aient été détectées, les titres viraux sont très variables selon les souris et les glandes mammaires. En effet, les titres viraux varient de 0 à 5,7 x 10^6 UFP par glande thoracique, de 0 à 4 x 10^6 UFP par glande abdominale et de 0 à 7,8 x 10^2 UFP par glande inguinale, au sein d'une même expérience.

Bien qu'il soit difficile d'interpréter en termes de quantification (l'expérience ayant été réalisée avec 3 animaux par groupe), ces résultats démontrent néanmoins la dissémination de la souche Dakar de YFV aux glandes mammaires de souris infectées.

Dissémination de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune aux glandes mammaires de souris.

Afin de confirmer et de compléter les résultats concernant la dissémination de YFV aux glandes mammaires murines, une autre souche sauvage du virus a été étudiée : la souche Asibi **(figure 29)**. Des souris femelles ont été infectées par 10^5 UFP de la souche Asibi de YFV par voie sous-cutanée. À 3, 4 et 6 jours post-infection, des prélèvements sanguins ont été effectués afin de vérifier l'infection des souris et, après euthanasie, des glandes mammaires thoraciques, abdominales et inguinales ont été prélevées. Après broyage et clarification des glandes mammaires, la présence d'ARNv et de particules infectieuses a été recherchée par RT-qPCR et titrage en plages de lyse sur cellules Vero, respectivement.

Après centrifugation des échantillons sanguins et extraction des ARN présents dans le plasma, l'ARNv de YFV a été quantifié par RT-qPCR. Contrairement à la cinétique observée avec la souche Dakar, les charges virales de la souche Asibi dans le plasma augmentent au cours du temps. Nous détectons en moyenne 1,9 x 10^3, 5 x 10^4 et 8,1 x 10^5 copies d'ARNv par millilitre de plasma à J3, J4 et J6 respectivement, confirmant l'infection des souris.

Concernant les glandes mammaires, toutes contiennent de l'ARNv mais les résultats montrent à nouveau une grande variabilité selon les souris et selon les paires de glandes mammaires. Concernant la cinétique de dissémination aux glandes mammaires, l'ARNv n'est pas détecté à J3, sauf dans les glandes thoraciques d'une seule souris. Les charges virales augmentent ensuite à J4 et J6. À J4, les charges virales varient de 0 à 4,6 x 10^3 copies d'ARNv/mg de glande thoracique, de 0 à 2,2 x 10^1 copies d'ARNv/mg de glande abdominale et de 0 à 1,1 x 10^0 copies/mg de glande inguinale. À J6, les charges virales varient de 4,4 x 10^1 à 8,4 x 10^4 copies d'ARNv/mg de glande thoracique, 6,5 x 10^1 à 8,6 x 10^3 copies/mg de glande abdominale et 1,2 x 10^1 à 1,2 x 10^3 copies d'ARNv/mg de glande inguinale. Néanmoins, l'ARNv est détecté dans la glande mammaire à J6 chez toutes les souris infectées (5/5).

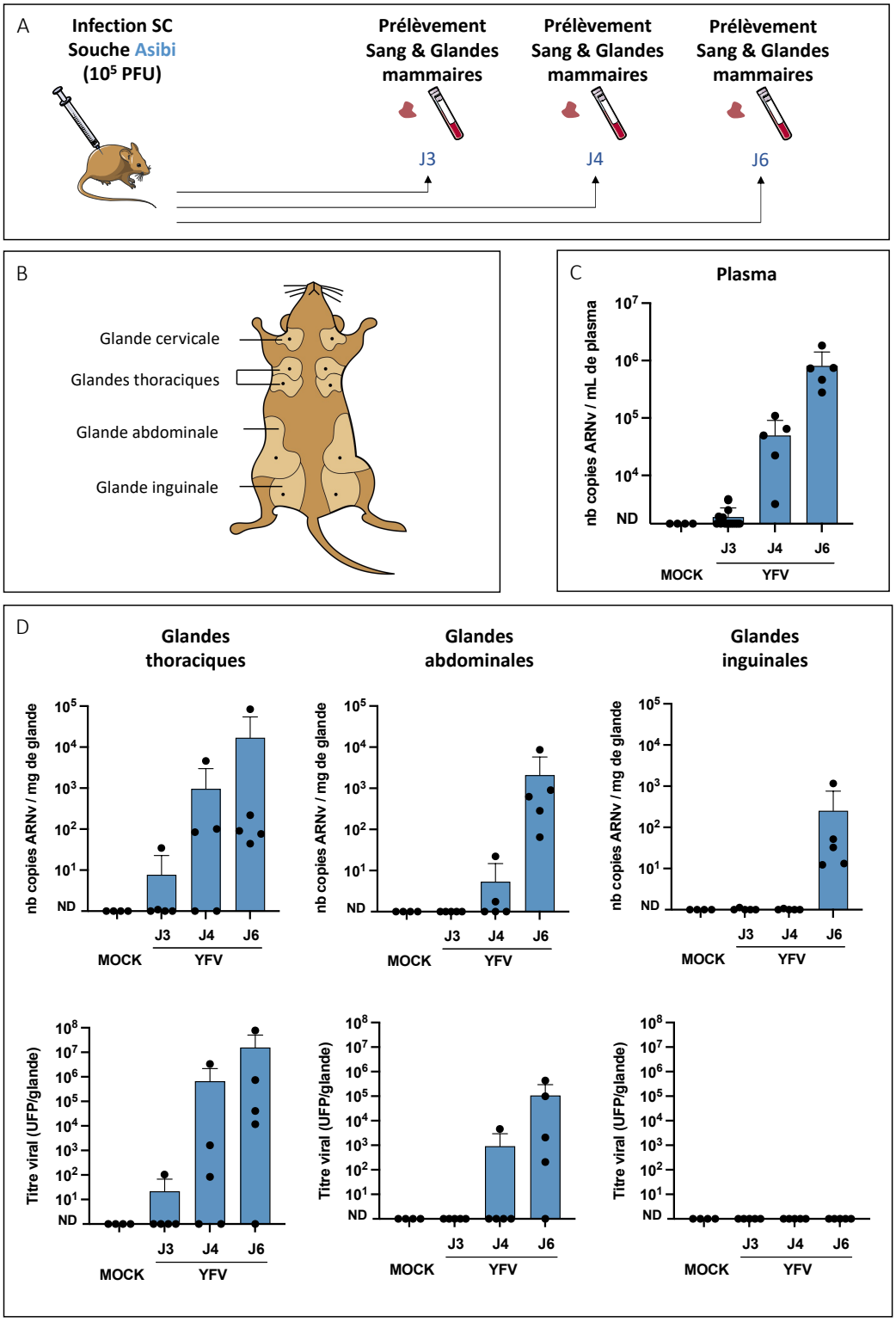


Figure 29 : Dissémination de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune aux glandes mammaires de souris. **(A)** Des souris A129 ont été infectées avec 10^5 UFP de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune (YFV) par voie sous-cutanée (SC). À 3, 4 et 6 jours post-infection, des échantillons sanguins ont été prélevés afin d'évaluer l'infection des souris. Après euthanasie, des glandes mammaires **(B)** thoraciques, abdominales et inguinales ont été prélevées**. (C)** Après centrifugation du sang, les ARN du plasma ont été extraits. Les ARN viraux (ARNv) ont été amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS3. **(D)** La présence de YFV dans les glandes mammaires a été recherchée par RT-qPCR et titrage en plages de lyses sur cellules Vero. (n = 1, 5 souris par groupe). N.B.: Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Jeanne Pascard, étudiante en stage de Master 2.

Concernant les titres viraux, aucune particule infectieuse n'a été détectée dans les glandes inguinales, à aucun des temps testés. En revanche, dans les glandes thoraciques et abdominales, les titres viraux augmentent au cours du temps. En effet, en moyenne 6,7 x 10^5 UFP/glande et 9,2 x 10^2 UFP/glande sont détectées dans les glandes thoraciques et abdominales à J4, tandis que 1,6 x 10^7 UFP/glande et 1,1 x 10^5 UFP/glande sont détectées à J6.

Bien qu'il soit difficile d'interpréter en termes de quantification (l'expérience ayant été réalisée avec 5 animaux par groupe), ces résultats démontrent néanmoins la dissémination de la souche Asibi de YFV aux glandes mammaires de souris infectées, confirmant les résultats observés avec la souche sauvage Dakar.

Les lignées épithéliales de glande mammaire MDA-MB-231 et MCF-7 sont sensibles et permissives à l'infection par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune.

Après dissémination virale jusqu'à la glande mammaire, afin que la transmission par allaitement puisse avoir lieu, il est nécessaire que le virus franchisse l'épithélium mammaire pour atteindre le lait maternel. Un des mécanismes possibles de franchissement de cet épithélium est l'infection productive des cellules épithéliales mammaires. Nous nous sommes donc intéressés au tropisme de YFV dans la glande mammaire. Dans ce but, nous avons étudié la sensibilité et la permissivité de lignées cellulaires mammaires humaines de phénotype myoépithélial (MDA-MB-231) ou luminal (MCF-7) à trois souches de YFV : les souches sauvages Dakar et Asibi, ainsi que la souche vaccinale 17D-204 **(figure 30)**.

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 ont été infectées à une MOI de 1 par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 **(figure 30)**. Après 2h d'adsorption, les tapis cellulaires ont été lavés avec du milieu de culture et incubés à 37°C. À 2h, 24h et 48h post-infection, les ARN intracellulaires totaux ont été extraits et les ARNv ont été amplifiés par RT-qPCR afin d'évaluer l'infection des cellules. Les résultats, exprimés en -ΔCt, ont été normalisés par rapport à l'expression du gène HPRT (hypoxanthine ribosyltranferase). Pour les 3 souches, une multiplication du génome viral est observée au cours du temps, aussi bien dans les cellules MDA-MB-231 que dans les cellules MCF-7, montrant la sensibilité de ces deux types cellulaires mammaires à l'infection par YFV.

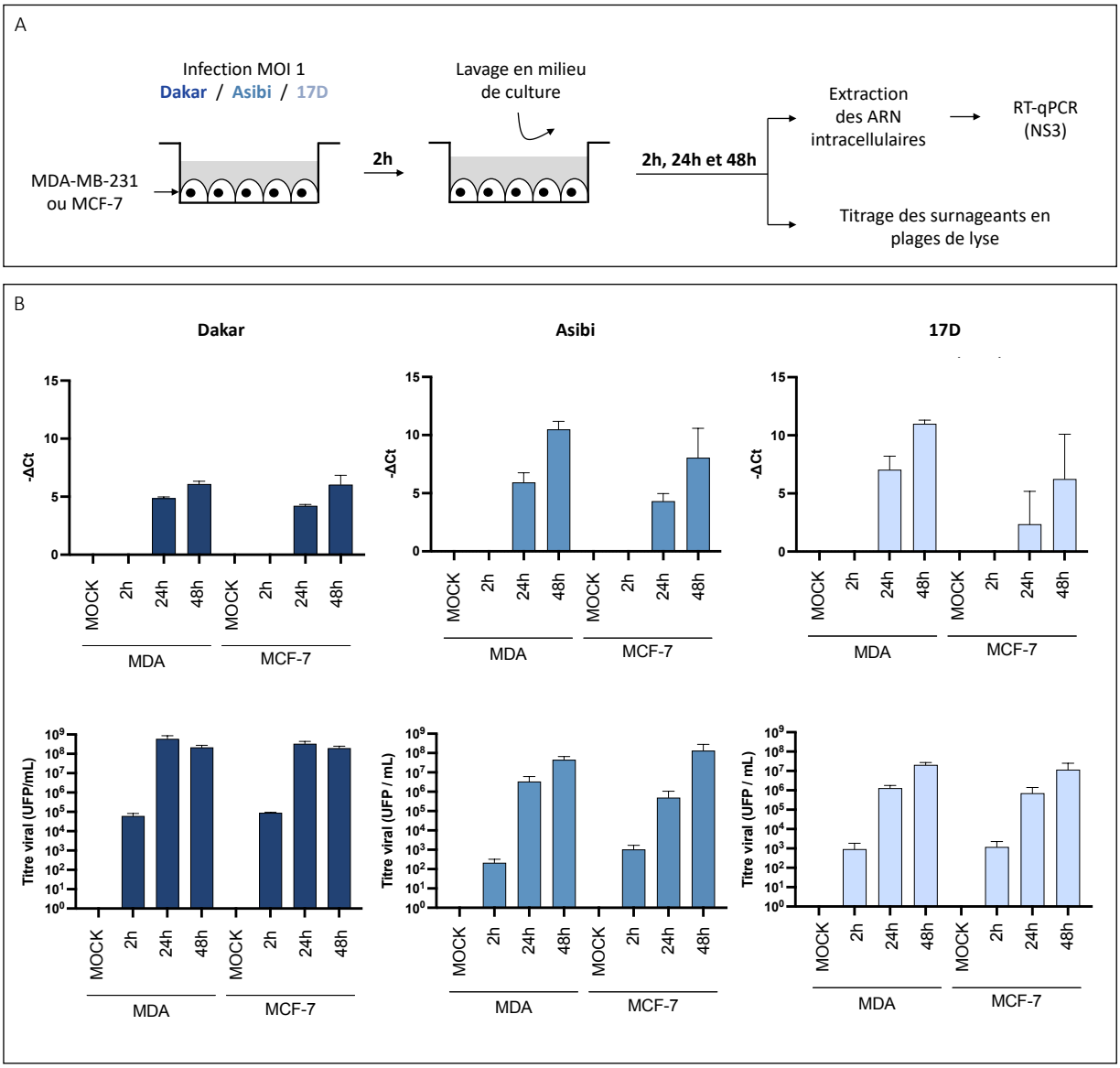


Figure 30 : Les lignées épithéliales de glande mammaire MDA-MB-231 et MCF-7 sont sensibles et permissives à l'infection par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune.
(A) Des lignées cellulaires myoépithéliales MDA-MB-231 (MDA) et luminales MCF-7 (MCF-7) de glande mammaire humaine ont été infectées ou non (MOCK) par les souches Dakar (Dakar), Asibi (Asibi) ou 17D-204 (17D) du virus de la fièvre jaune (YFV) (MOI 1). À 2h, 24h et 48h post-infection, la sensibilité et la permissivité des cellules a été étudiée. (**B)** Après extraction des ARN intracellulaires totaux, les ARN viraux ont été amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS3. Les résultats sont exprimés en -ΔCt par rapport à l'expression du gène hPRT. La production de particules virales infectieuses a été mesurée par titrage des surnageants en plages de lyse sur cellules Vero. (Dakar : n = 1, en triplicats. Asibi et 17D : n = 2, en triplicats). N.B.: Les expériences avec les souches Asibi et 17D-204 ont été réalisées en collaboration avec Jeanne Pascard, étudiante en stage de Master 2.

Afin d'étudier la production de particules virales infectieuses par ces deux types cellulaires, les surnageants ont été prélevés et titrés par la méthode des plages de lyse sur cellules Vero **(figure 30)**. Pour les 3 souches de YFV, nous observons une augmentation du titre viral au cours du temps dans les surnageants, démontrant une production de particules virales infectieuses par les deux types cellulaires. En effet, à 48h post-infection, en moyenne 2,2 x 10^8 UFP/mL et 2 x 10^8 UFP/mL sont détectées dans les surnageants des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 infectées par la souche Dakar, respectivement. Pour la souche Asibi, environ 4,5 x 10^7 UFP/mL et 1,3 x 10^8 UFP/mL sont détectées dans les surnageants des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 à 48h, respectivement. Pour la souche 17D-204, environ 2,1 x 10^7 UFP/mL et 1,2 x 10^7 UFP/mL sont produites dans les surnageants des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 à 48h, respectivement.

Ces résultats démontrent la capacité des 3 souches de YFV à infecter les lignées de cellules myoépithéliales (MDA-MB-231) et luminales (MCF-7) de façon productive. L'efficacité d'infection par les différentes souches de YFV testées semble comparable.

Présence de particules virales infectieuses libres de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune dans le lait maternel de souris infectées.

Après dissémination virale à la glande mammaire et infection de l'épithélium, pour qu'un virus soit transmis au nourrisson par allaitement, il est nécessaire que celui-ci franchisse la barrière mammaire et soit présent dans le lait maternel. Nous avons donc étudié la capacité de YFV à être excrété dans le lait maternel à l'aide du modèle murin A129 **(figure 31)**. Dans ce but, des souris allaitantes ont été infectées, entre 1 et 8 jours après parturition, avec 10^5 UFP de la souche Asibi de YFV par voie sous-cutanée. À 4 jours post-infection, des prélèvements sanguins ont été réalisés afin de vérifier l'infection des souris. À 5 jours post-infection, le lait maternel a été prélevé et titré par la méthode des plages de lyse pour déterminer le titre viral. Afin d'étudier la présence de particules infectieuses libres dans le lait maternel, celui-ci a été centrifugé et les différentes fractions qui le composent (la crème, le lactosérum et le culot cellulaire) ont été séparées. Après élimination du culot cellulaire, le lactosérum et la crème ont été purifiés par 2 lavages en PBS et titrés en plages de lyse sur cellules Vero. Les titres viraux obtenus dans la crème ne sont pas présentés ici car nous n'avons pas obtenu de résultats en raison d'un problème technique lors de l'expérience.

Chez les souris infectées, en moyenne 10^4 copies d'ARNv (± SD = 7,2 x 10^3) et 1,7 x 10^3 UFP (± SD = 3,2 x 10^3) ont été détectées par millilitre de plasma, confirmant l'infection des souris.

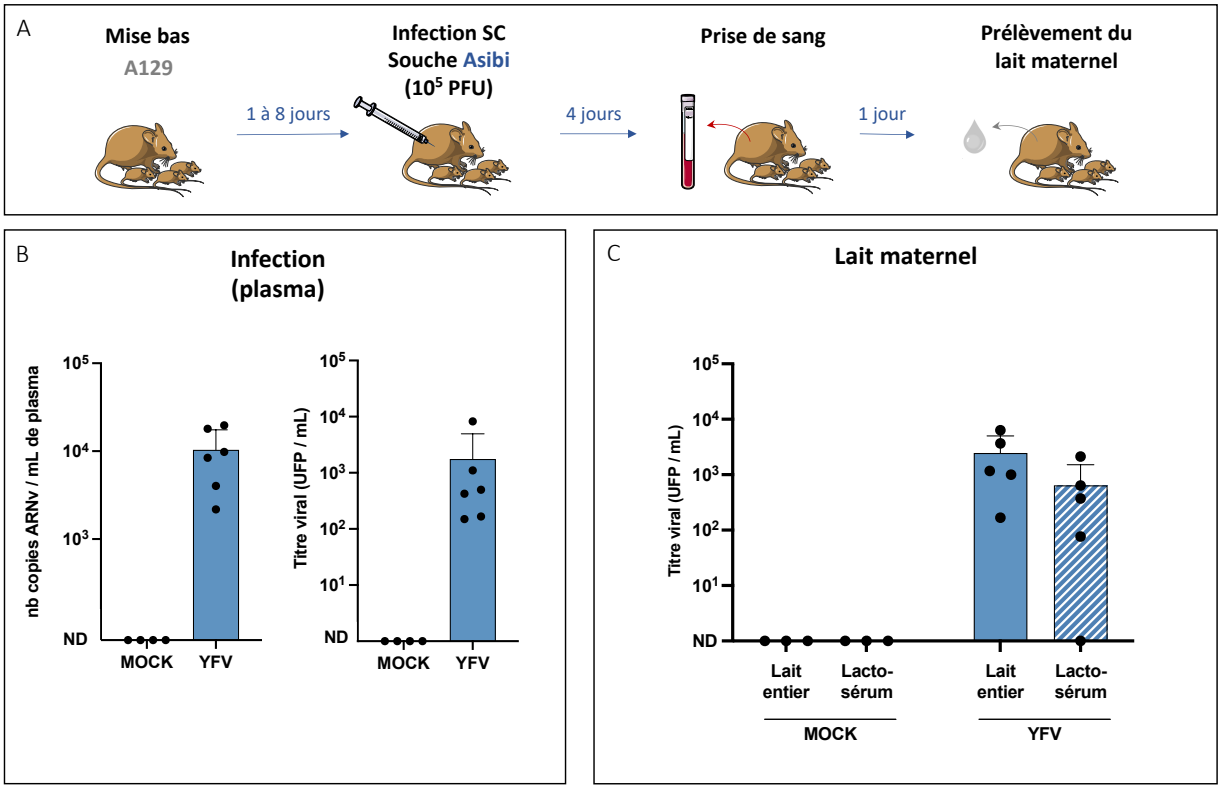


Figure 31 : Présence de particules virales infectieuses libres de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune dans le lait maternel de souris infectées.
(A) Des souris A129 ont été infectées, 1 à 8 jours après la mise bas, avec 10^5 UFP de la souche Asibi du virus de la fièvre jaune (YFV) par voie sous-cutanée (SC). À 4 jours post-infection, des échantillons sanguins ont été prélevés afin de vérifier l'infection des souris. Le lait maternel a été prélevé à 5 jours post-infection et titré par la méthode des plages de lyse sur cellules Vero. **(B)** Après centrifugation du sang, les ARN viraux (ARNv) du plasma ont été quantifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS3. Les particules virales infectieuses ont été quantifiées par titrage en plages de lyse sur cellules Vero (n = 1, 4 souris MOCK, 6 souris YFV). **(C)** Le lait maternel a été titré entier ou a été centrifugé afin de séparer les différentes fractions qui le composent. Après élimination du culot cellulaire et de la crème, le lactosérum a été purifié par 2 lavages dans du PBS puis titré par la méthode des plages de lyse sur cellules Vero. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Jeanne Pascard, étudiante en stage de Master 2.

Concernant les échantillons de lait, 5 souris infectées sur 6 ont produit des volumes suffisants pour étudier la présence de particules infectieuses dans le lait maternel. Dans le lait entier, les titres viraux ont été quantifiés par titrage en plages de lyse et varient de 1,7 x 10^2 à 6,3 x 10^3 UFP/mL de lait (2,5 x 10^3 UFP/mL en moyenne). Dans le lactosérum, en moyenne 6,4 x 10^2 UFP/mL ont été détectées, démontrant la présence de particules infectieuses libres dans le lait maternel.

Ces résultats indiquent la nature infectieuse du lait maternel de souris infectées par la souche Asibi de YFV et montrent la présence de particules virales infectieuses sous forme libre dans le lait maternel murin. Le lait maternel pourrait donc être véhicule de YFV et représenter un risque de transmission virale au nourrisson.

Après franchissement viral de l'épithélium mammaire et stabilité du virus dans le lait maternel, la dernière étape de la transmission virale par allaitement est le franchissement d'un épithélium chez le nourrisson. Bien que plusieurs barrières épithéliales se trouvent sur le trajet du lait infecté dans l'organisme du nourrisson (i.e. la barrière tonsillaire, la barrière intestinale ou même la barrière pulmonaire, notamment chez les nourrissons atteints de dysphagie), la dissémination virale se fait très probablement à travers la barrière intestinale, du fait de sa grande surface d'absorption.

Mécanismes de franchissement de la barrière intestinale du nourrisson.

La barrière intestinale représente une porte d'entrée dans l'organisme de l'hôte pour de nombreux virus transmis par voie orale (e.g. l'HAV, le rotavirus, le poliovirus, le norovirus, le VIH, le CMV, l'HTLV-1 et le ZIKV). Différents mécanismes de franchissement ont été acquis par ces virus au cours de l'évolution : par voie paracellulaire après rupture de l'intégrité de la barrière intestinale, par infection des entérocytes, par transcytose à travers les entérocytes ou enfin, par transcytose à travers les cellules M. Dans cette partie, nous avons étudié la capacité de YFV à franchir la barrière intestinale et décrit les mécanismes associés.

Les cellules de la lignée entérocytaire humaine Caco-2 sont sensibles et permissives à l'infection par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune.

Après ingestion du lait maternel par le nourrisson, celui-ci circule dans son tractus digestif et entre en contact avec son épithélium intestinal. Nous avons donc étudié la sensibilité et la permissivité d'une lignée humaine de cellules entérocytaires (les cellules Caco-2) à l'infection par les 3 souches de YFV : les souches sauvages Dakar et Asibi, ainsi que la souche vaccinale 17D-204 **(figure 32)**. Les cellules Caco-2 ont été infectées à une MOI de 0,1 ou de 1. Après 2h d'adsorption virale, les tapis cellulaires ont été lavés en milieu de culture puis cultivés pendant 2h, 24h ou 48h à 37°C. Après un lavage en PBS, les cellules ont été lysées et les ARN intracellulaires ont été extraits puis amplifiés par RT-qPCR (à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS3) afin d'évaluer l'infection des cellules. Les résultats, exprimés en -ΔCt, ont été normalisés par rapport à l'expression du gène de référence HPRT. Pour les 3 souches, une multiplication du génome viral est observée dans les cellules Caco-2 au cours du temps, montrant leur sensibilité à l'infection par YFV.

Afin d'évaluer la production de particules virales infectieuses par les cellules Caco-2, les surnageants de culture ont été prélevés à 2h, 24h et 48h post-infection et titrés en plages de lyse sur cellules Vero. Pour les 3 souches virales, une augmentation du titre viral est observée au cours du temps, démontrant la permissivité de ces cellules à l'infection par YFV. Pour la souche Dakar, une augmentation d'un facteur 10^3 est observée entre 2h et 48h post-infection à MOI de 0,1 tandis qu'à MOI de 1, le titre viral augmente d'un facteur $4,7 \times 10^1$. Pour la souche Asibi, entre 2h et 48h post-infection à MOI de 0,1, une augmentation d'un facteur $1,7 \times 10^4$ est observée tandis qu'à MOI de 1, le titre viral augmente d'un facteur 3×10^4. Enfin, après

infection par la souche 17D-204, le titre viral augmente d'un facteur 4,8 x 10^3 à MOI de 0,1 et d'un facteur 4,7 x 10^1 à MOI de 1, entre 2h et 48h. Ainsi, à 48h post-infection, les titres viraux dans les surnageants des cellules infectées à MOI de 1 par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 sont de 1,3 x 10^7 UFP/mL, 1,4 x 10^7 UFP/mL et 1,2 x 10^7 UFP/mL, respectivement.

Ces résultats démontrent la capacité des 3 souches de YFV à infecter les cellules Caco-2 de façon productive. Les titres viraux détectés à 48h post-infection étant de l'ordre de 10^7 UFP/mL, l'infection par les 3 souches virales semble comparable. Les cellules Caco-2 étant permissives à l'infection par YFV, un mécanisme de franchissement de la barrière intestinale pourrait être l'infection productive de celle-ci. Afin d'investiguer cette hypothèse, des cellules Caco-2 ont été différenciées en un modèle d'épithélium intestinal *in vitro*.

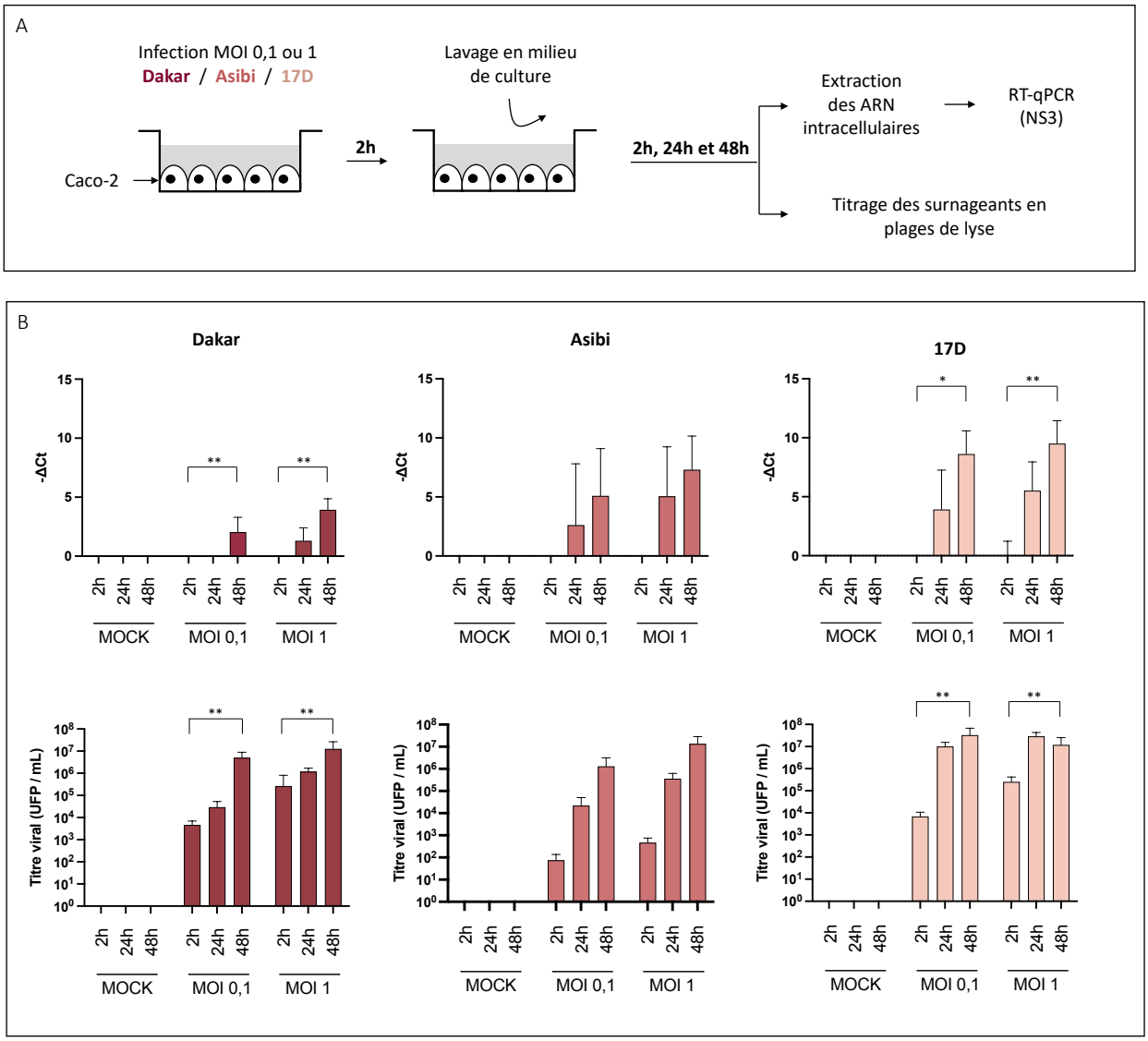


Figure 32 : Les cellules de la lignée entérocytaire humaine Caco-2 sont sensibles et permissives à l'infection par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune.
(A) Des cellules Caco-2 ont été infectées ou non (MOCK) par les souches Dakar (Dakar), Asibi (Asibi) ou 17D-204 (17D) du virus de la fièvre jaune (YFV) à une MOI de 0,1 ou de 1. À 2h, 24h et 48h post-infection, la sensibilité et la permissivité des cellules ont été étudiées. **(B)** Après extraction des ARN intracellulaires totaux, les ARN viraux ont été amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS3. Les résultats sont exprimés en -ΔCt par rapport à l'expression du gène HPRT. La production de particules virales infectieuses a été mesurée par titrage des surnageants en plages de lyse sur cellules Vero à 2h, 24h et 48h post-infection. (Dakar et 17D : n = 3, en triplicats. Asibi : n = 2, en triplicats). * et ** : Significativement différent (* : P-value = 0,0156. ** : P-value = 0,0039) par le test de Wilcoxon (P-value < 0,05).

Modèle de barrière intestinale différenciée et polarisée *in vitro*.

Afin d'étudier le franchissement de la barrière intestinale par YFV, nous avons utilisé un modèle connu d'épithélium intestinal différencié *in vitro* **(figure 33)** (Balimane et al. 2005). Des cellules Caco-2 ont été ensemencées sur des filtres Transwell composés d'une membrane contenant des pores de 3µm de diamètre. Les cellules ont été cultivées pendant 3 semaines à 37°C et leurs milieux de culture, dans les compartiments apicaux et basaux, ont été changés tous les deux jours afin de permettre la croissance cellulaire. Après 3 semaines de culture, des monocouches intestinales étanches sont obtenues. Les cellules sont différenciées et forment des microvillosités à leur pôle apical. La polarisation des barrières intestinales a été vérifiée par l'observation des microvillosités apicales par microscopie électronique (en collaboration avec Philippe Roingeard, Université de Tours).

L'intégrité des monocouches intestinales a été suivie par mesure de la TEER (résistance électrique trans-épithéliale) au cours du temps. La TEER d'un filtre vide est d'environ 100 Ohm.cm^2 tandis que l'ensemencement de cellules sur celui-ci entraîne une augmentation de la TEER. Lorsque celle-ci dépasse 250 Ohm.cm^2, les barrières intestinales sont considérées comme étant étanches (Srinivasan et al. 2015). À 21 jours post-ensemencement, la TEER atteint un plateau (à environ 600 Ohm.cm^2) et témoigne de l'étanchéité des épithélia.

Ce modèle de monocouche intestinale différenciée *in vitro* a été utilisé afin d'étudier le franchissement de la barrière intestinale par YFV.

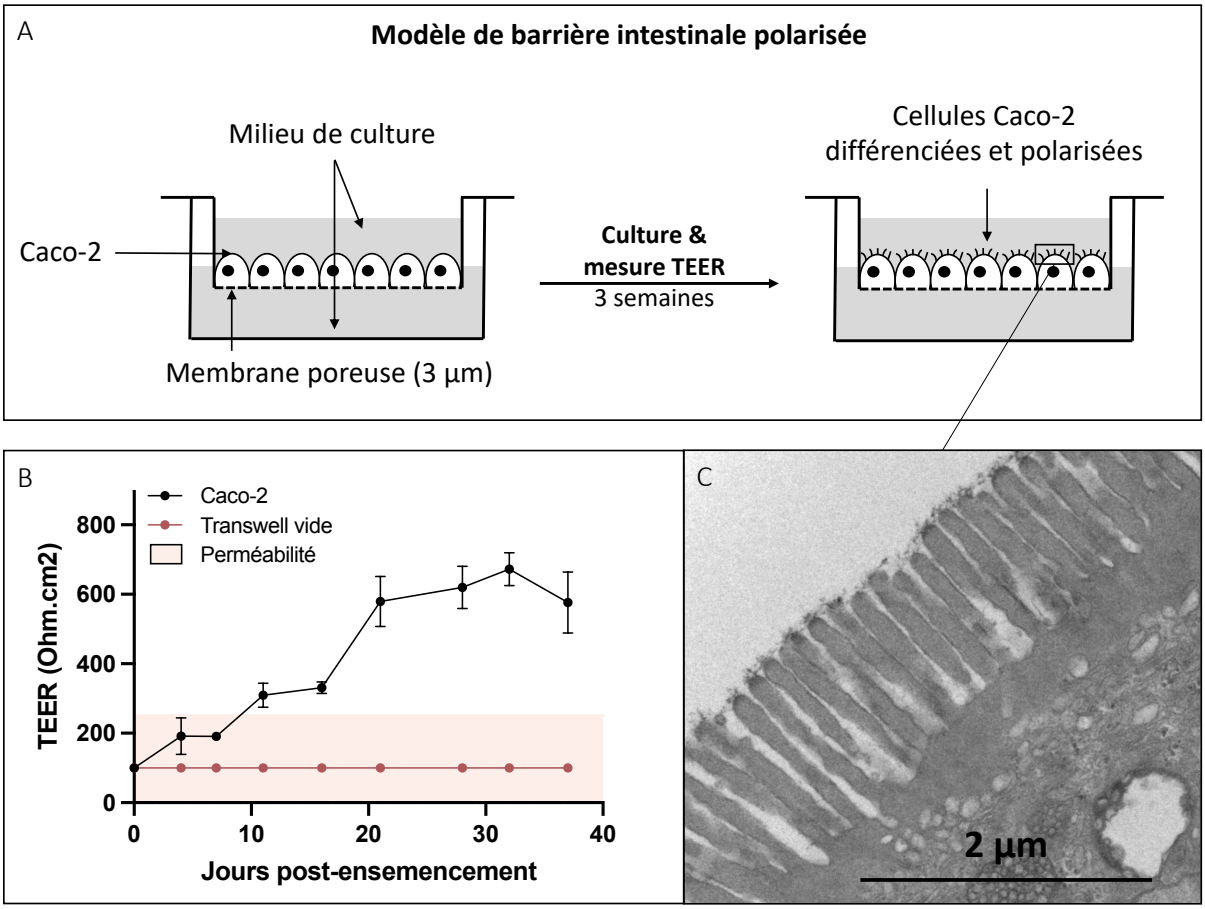


Figure 33 : Modèle de barrière intestinale différenciée et polarisée *in vitro*.
(A) Des cellules Caco-2 ont été ensemencées sur des filtres Transwell d'une porosité de 3 µm. Les cellules ont été cultivées pendant 3 semaines et la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) a été mesurée tous les 2 jours afin de suivre l'étanchéité des barrières. **(B)** Lorsque la TEER dépasse 250 Ohm.cm^2 (cadre rose), les barrières deviennent imperméables. **(C)** Les monocouches différenciées sont polarisées et développent des microvillosités au pôle apical, observées par microscopie électronique (en collaboration avec Philippe Roingeard).

L'infection par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune n'altère pas la distribution de la protéine de jonctions serrées ZO-1 dans les barrières intestinales *in vitro*.

Nous avons commencé par étudier si l'exposition des cellules Caco-2 à YFV induit une altération de la distribution des jonctions serrées **(figure 34)**. Dans ce but, des cellules Caco-2 ont été infectées à MOI de 1 puis la distribution de la protéine de jonctions serrées ZO-1 a été observée par immunomarquage et immunofluorescence à 24h post-infection **(figure 34-A)**. Suite à l'observation de plusieurs champs à l'aide d'un microscope photonique classique, un marquage membranaire de la protéine ZO-1 a été observé dans les cellules infectées et non-infectées.

Nous avons ensuite réalisé des observations de la distribution de la protéine ZO-1 sur le modèle de barrière intestinale polarisée **(figure 34-B)** afin d'étudier si YFV induit une rupture de l'intégrité de l'épithélium intestinal. Les barrières intestinales ont été infectées par la souche Dakar de YFV à une MOI de 1 au pôle apical des cellules puis la distribution des jonctions serrées a été observée par immunofluorescence suite à l'immunomarquage de la protéine ZO-1 **(figure 34-B)**. L'analyse d'un grand nombre de champs a révélé une distribution caractéristique de la protéine ZO-1, en « nid d'abeille », conforme avec une barrière intègre **(figure 34-C)** aussi bien dans les barrières infectées et non-infectées.

Le virus ne semble donc pas altérer la distribution de la protéine de jonctions serrées ZO-1. Afin de compléter ces observations qualitatives faites par immunofluorescence, nous avons étudié l'effet de l'infection sur l'étanchéité des barrières par mesure de la TEER.

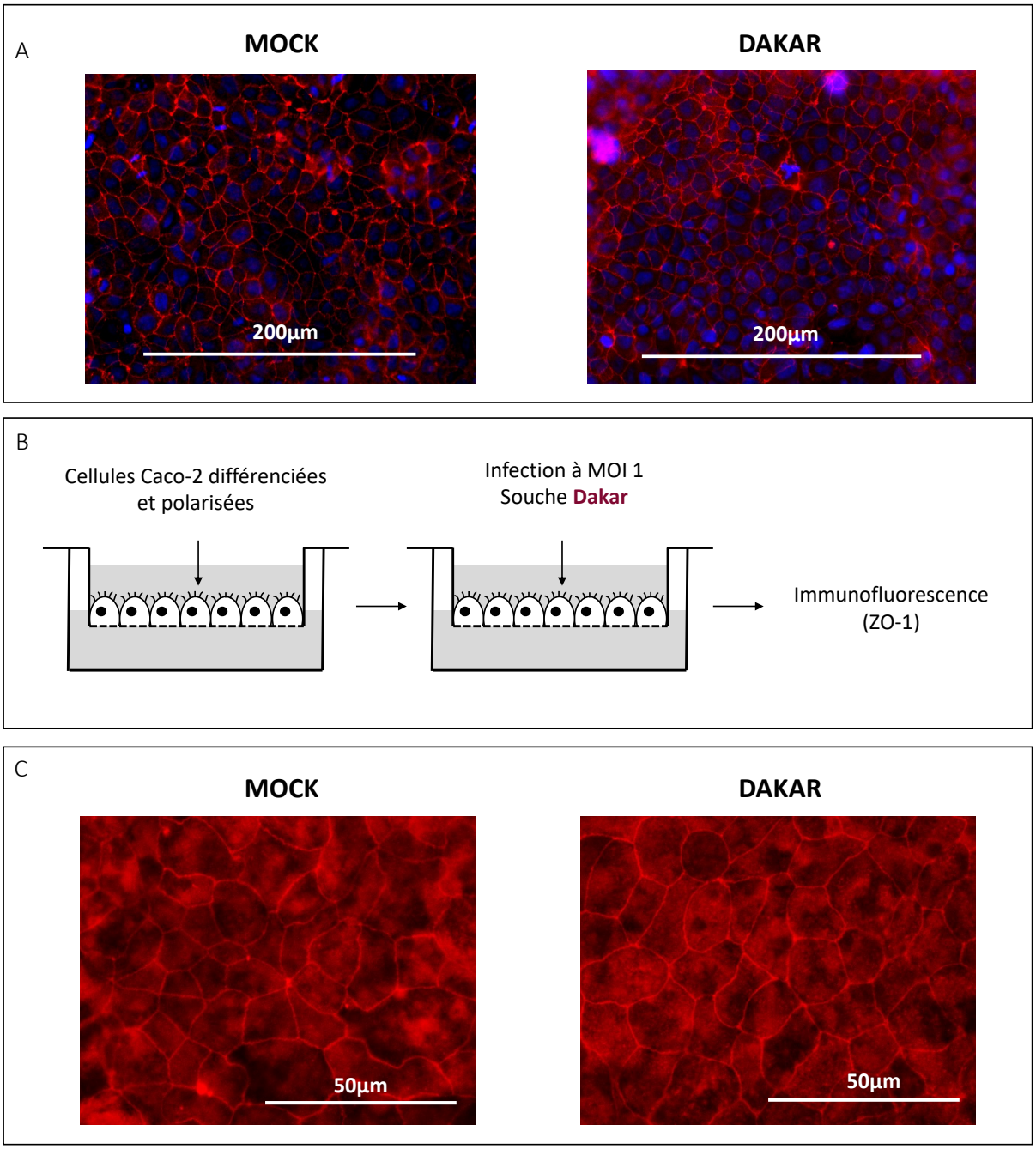


Figure 34 : L'infection par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune n'altère pas la distribution de la protéine de jonctions serrées ZO-1 dans les barrières intestinales *in vitro*.
(A) Des cellules Caco-2 cultivées en puits ont été infectées (Dakar) ou non (MOCK) par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune (YFV) (MOI 1). À 24h post-infection, la protéine de jonctions serrées Zonula occludens 1 (ZO-1) et les noyaux cellulaires ont été marqués à l'aide d'anticorps anti-ZO-1 et de DAPI, respectivement. L'observation de plusieurs champs a été réalisée à l'aide d'un microscope optique classique (n = 1) (un champ présenté par condition, au grossissement 20X). **(B)** Les monocouches Caco-2, cultivées sur filtre Transwell d'une porosité de 3 µm, ont été infectées (Dakar) ou non (MOCK) par la souche Dakar de YFV (MOI 1). À 48h post-infection, les monocouches ont été immunomarquées à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine de jonctions serrées ZO-1 puis la distribution de ZO-1 a été observée par immunofluorescence (n = 1). **(C)** Plusieurs champs ont été observés à faible grossissement au microscope EVOS (un champ présenté par condition, au grossissement 40X).

L'infection par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune n'altère pas l'étanchéité de la barrière intestinale *in vitro*.

Afin de confirmer et de quantifier les observations faites précédemment sur l'étanchéité des barrières intestinales suite à l'infection par YFV, l'intégrité des monocouches cellulaires a été évaluée par mesure de la TEER **(figure 35)**. L'étude de la distribution de la protéine ZO-1 a permis une observation qualitative de l'intégrité des jonctions serrées. Ici, la mesure de la TEER permet d'affiner l'étude de l'étanchéité des barrières car c'est la résistance à un courant électrique qui est mesurée.

Les barrières intestinales ont été traitées à l'EDTA (qui induit une ouverture des jonctions serrées), infectées par la souche Dakar de YFV à une MOI de 1, ou non infectées. Suite au traitement à l'EDTA, une chute de la TEER est observée. En effet, à 2h post-traitement, la TEER est de 150 Ohm.cm^2 et est donc passée en dessous du seuil de perméabilité de 250 Ohm.cm^2. Cependant, bien que la manipulation des barrières intestinales ait induit une légère diminution de la TEER, aucune différence n'est observée entre les barrières infectées ou non-infectées à 2h, 24h et 48h post-infection. Ces résultats suggèrent que l'infection par YFV n'altère pas l'intégrité du modèle de monocouches intestinales *in vitro*.

D'après les 2 techniques testées, l'exposition des monocouches à YFV n'entraînerait pas de rupture de la barrière intestinale *in vitro*.

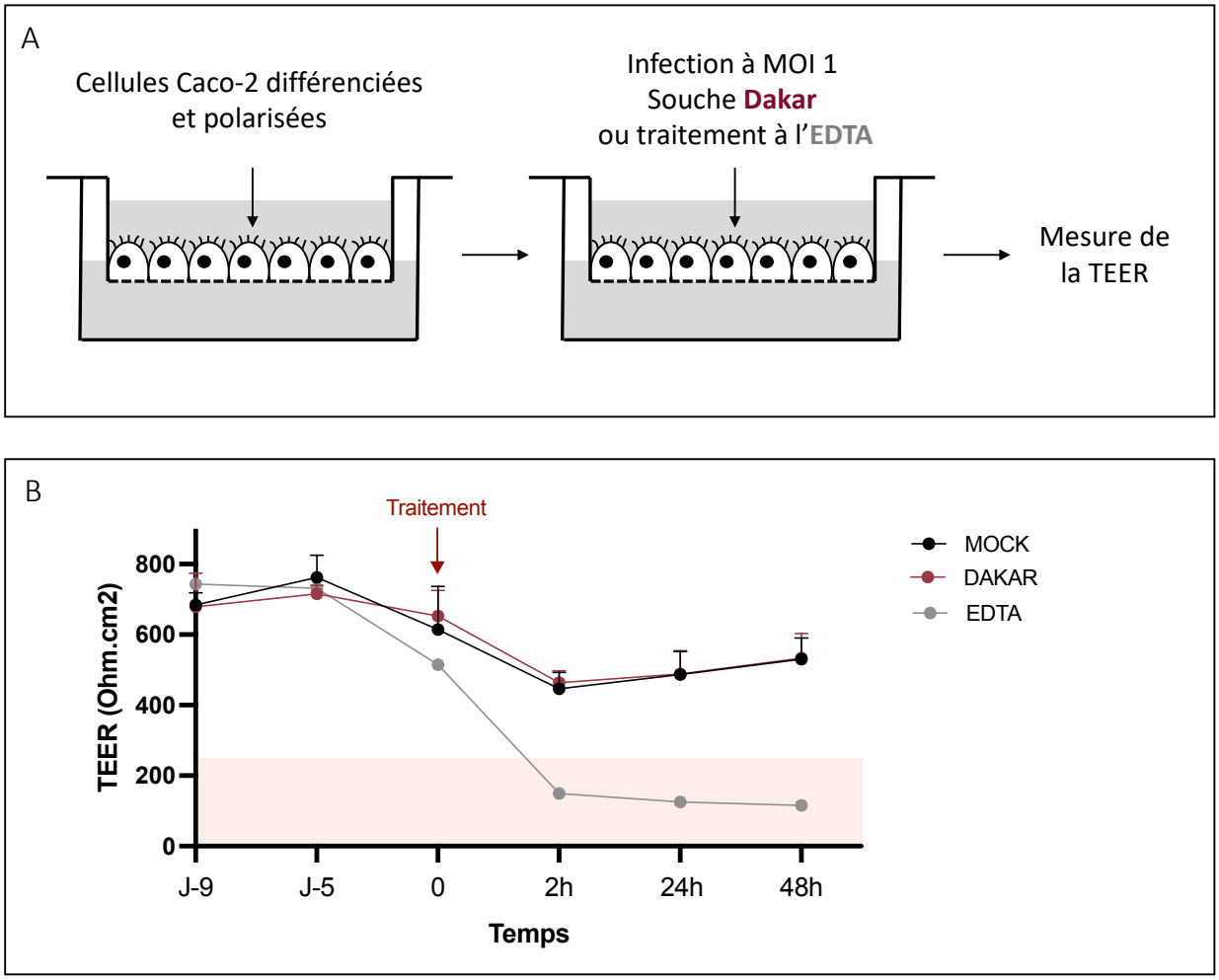


Figure 35 : L'infection par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune n'altère pas l'étanchéité de la barrière intestinale *in vitro*.
(A) Les monocouches Caco-2, cultivées sur filtre Transwell d'une porosité de 3 µm, ont été infectées ou non (MOCK) par la souche Dakar du virus de la fièvre jaune (YFV) (MOI 1) ou traitées à l'EDTA afin d'induire l'ouverture des jonctions serrées. **(B)** La résistance électrique trans-épithéliale (TEER) a été mesurée 5 et 9 jours avant l'infection afin de vérifier l'étanchéité des barrières avant infection. Après l'infection, la TEER a été mesurée à 2h, 24h et 48h afin de suivre l'effet des traitements sur l'intégrité des barrières (n = 1). Cadre rose : zone de perméabilité des barrières intestinales.

Les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune franchissent le modèle de barrière intestinale polarisée *in vitro*.

Après avoir observé que l'exposition à YFV n'induit pas de rupture des barrières Caco-2, nous avons étudié la capacité du virus à franchir l'épithélium intestinal. Des barrières de cellules Caco-2 ont été obtenues selon le protocole décrit précédemment en **figure 33 (figure 36)**. La TEER a été suivie au cours de la culture des monocouches de cellules Caco-2 afin d'évaluer la formation puis l'intégrité des barrières. Après 3 semaines de culture, les barrières intestinales ont été infectées par leur pôle apical à MOI de 1 par les 3 souches de YFV : les souches Dakar, Asibi et 17D-204. À 2h, 24h, 48h et 72h post-infection, les surnageants des compartiments apicaux et basaux ont été prélevés et titrés par la méthode des plages de lyse sur cellule Vero afin d'étudier la présence de particules virales infectieuses **(figure 36)**.

Pour toutes les barrières intestinales utilisées, la TEER a été mesurée au cours du temps et dépasse le seuil de perméabilité à 250 Ohm.cm^2. À 21 jours post-ensemencement, la TEER des barrières utilisées pour l'infection par la souche Dakar a atteint environ 550 Ohm.cm^2 tandis que, pour les barrières infectées par les souches Asibi et 17D-204, celle-ci a atteint environ 790 et 820 Ohm.cm^2, respectivement. Toutes les monocouches obtenues sont donc étanches et ont pu être infectées par YFV pour étudier le franchissement viral.

Dans le compartiment apical, une augmentation du titre viral est observée au cours du temps pour les trois souches de YFV, traduisant une production de particules infectieuses par le pôle apical des monocouches. En effet, une augmentation d'environ un facteur 10^3, 3 x 10^1 et 10^4 est constatée entre 2h et 48h post-infection pour les souches Dakar, Asibi et 17D-204 respectivement. Ainsi, à 48h post-infection, les titres viraux atteignent en moyenne 6,6 x 10^7 UFP/mL, 5,5 x 10^4 UFP/mL et 1,4 x 10^6 UFP/mL pour les souches Dakar, Asibi ou 17D-204, respectivement.

Dans le compartiment basal, aucune particule infectieuse n'est détectée à 2h post-infection pour les 3 souches virales, confirmant l'étanchéité des barrières intestinales. Pour les souches 17D-204 et Asibi, aucune particule virale n'est détectée dans le compartiment basal jusqu'à 24h et 48h post-infection respectivement, tandis que pour les monocouches infectées par la souche Dakar, 5,9 x 10^3 UFP/mL et 5,5 x 10^5 UFP/mL sont détectées dans le compartiment basal à 24h et 48h post-infection. Pour les monocouches infectées par la souche Asibi, ce n'est

qu'à partir de 72h que 1,2 x 10^2 UFP/mL sont détectées. Enfin, pour la souche 17D-204, environ 3,4 x 10^2 UFP/mL et 10^5 UFP/mL sont produites par le pôle basal à 48h et 72h post-infection.

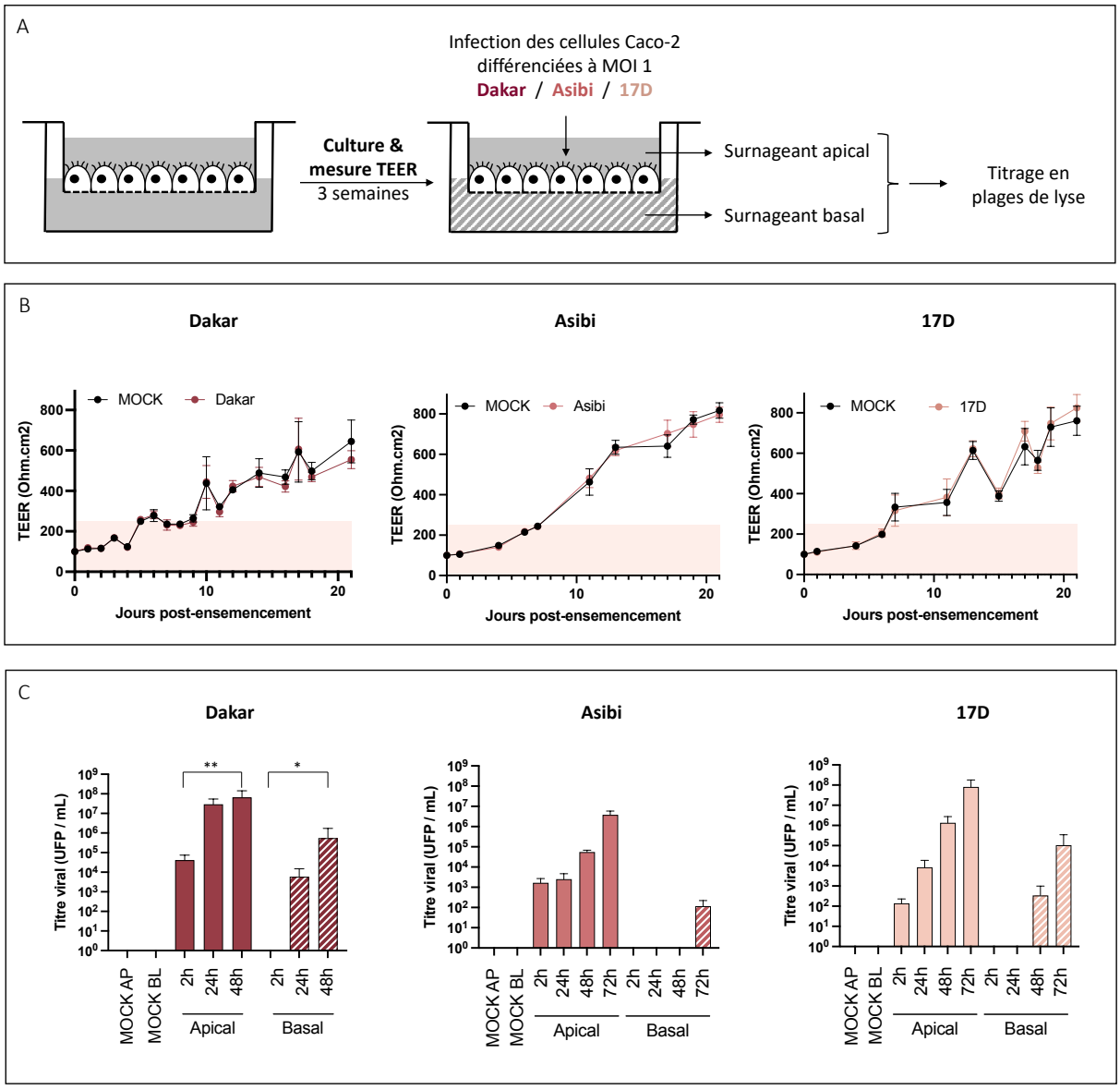


Figure 36 : Les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune franchissent le modèle de barrière intestinale polarisée *in vitro*.

(A) Des cellules Caco-2 ont été cultivées sur des filtres Transwell d'une porosité de 3µm pendant 3 semaines. Les monocouches différenciées ont été infectées ou non (MOCK) par les souches Dakar (Dakar), Asibi (Asibi) ou 17D-204 (17D) du virus de la fièvre jaune (YFV) (MOI 1). La présence de particules infectieuses de YFV dans les surnageants apicaux et basolatéraux des barrières a été déterminée par titrage en plages de lyse. **(B)** La résistance électrique trans-épithéliale a été mesurée tous les 2 jours afin de suivre l'étanchéité des barrières pendant leur culture. Lorsque la TEER dépasse 250 Ohm.cm^2 (cadre rose), les barrières deviennent imperméables. Les barrières imperméables ont été infectées après 21 jours de culture. **(C)** La présence de particules infectieuses a été recherchée dans les compartiments apicaux et basolatéraux par titrage en plages de lyse sur cellules Vero à 2h, 24h et 48h post-infection. Pour les échantillons MOCK, seul le temps 48h est représenté sur les graphes mais des valeurs identiques (nulles) ont été obtenues à chaque temps testé. (Dakar : n = 3, en triplicats. Asibi : n = 1, en triplicats. 17D : n = 2, en triplicats.). * et ** : Significativement différent (* : P-value = 0,0156. ** : P-value = 0,0039) par le test de Wilcoxon (P-value < 0,05).

Ces résultats montrent la capacité de YFV à franchir le modèle de barrière intestinale *in vitro* et suggèrent des différences d'efficacité de franchissement selon les souches virales. Cependant, les expériences avec les souches 17D-204 et Asibi ayant été faites 2 fois et 1 fois respectivement, il est indispensable de répéter ces expériences afin de confirmer les différences d'efficacité de franchissement observées selon les souches. Enfin, les titres viraux augmentant au cours du temps (y compris au pôle apical des cellules) le franchissement de la barrière intestinale pourrait provenir d'une infection productive de l'épithélium.

Les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune se répliquent dans les barrières intestinales polarisées *in vitro*.

Afin de vérifier l'hypothèse d'une infection productive des barrières intestinales par YFV, nous avons vérifié l'infection des monocouches Caco-2 **(figure 37)**. Après infection à MOI de 1 par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 au pôle apical des monocouches, les ARN intracellulaires ont été extraits à 2h, 48h et 72h post-infection. Les ARNv ont ensuite été retro-transcrits et amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquence virale NS3. Les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ARNv et normalisés par rapport à la quantité d'ARN intracellulaires totaux.

Pour les trois souches de YFV, une augmentation du nombre de copies intracellulaires d'ARNv est observée au cours de temps. En effet, entre 2h et 48h post-infection, une augmentation d'un facteur d'environ 200, 50 et 5000 est constatée dans les cellules infectées par les souches Dakar, Asibi et 17D-204 respectivement, traduisant une multiplication du génome viral.

Ces résultats indiquent que les barrières intestinales *in vitro* sont sensibles à l'infection par les 3 souches de YFV. Afin de confirmer ces résultats, les expériences avec les souches Asibi et 17D-204 doivent être répétées. Un mécanisme de franchissement de la barrière intestinale par YFV pourrait donc être par infection des cellules épithéliales et production de particules virales infectieuses par leur pôle basal.

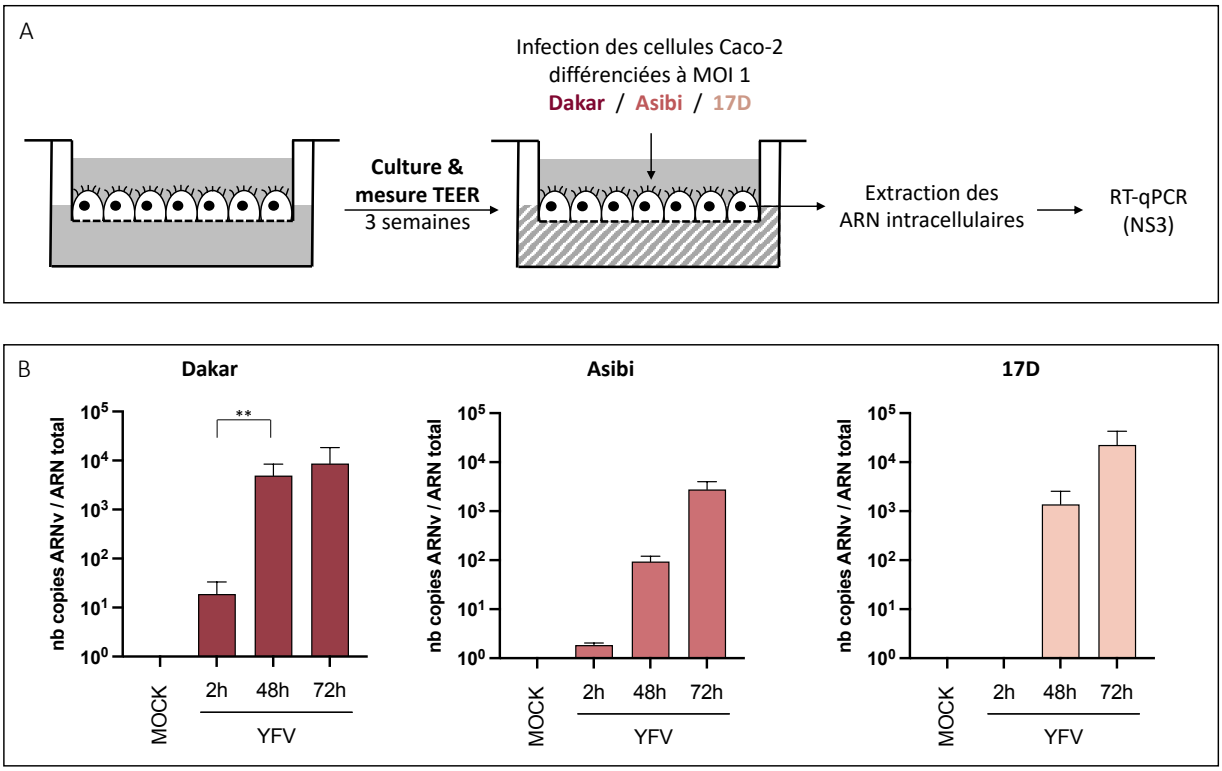


Figure 37 : Les souches Dakar, Asibi et 17D-204 du virus de la fièvre jaune se répliquent dans les barrières intestinales polarisées *in vitro*.

(A) Des cellules Caco-2 ont été cultivées sur des filtres Transwell d'une porosité de 3µm pendant 3 semaines. La résistance électrique trans-épithéliale a été mesurée tous les 2 jours afin de suivre l'étanchéité des barrières (les résultats sont présentés sur la figure précédente, figure 34). Les monocouches ont été infectées ou non (MOCK) par les souches Dakar (Dakar), Asibi (Asibi) ou 17D-204 (17D) (MOI 1). À 2h, 48h et 72h post-infection, après extraction des ARN intracellulaires totaux, les ARN viraux (ARNv) ont été amplifiés par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques de la séquences virale NS3. **(B)** Les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ARNv (déterminées à l'aide d'une courbe standard) et normalisés par rapport à la quantité d'ARN totaux. (Dakar : n = 3, en triplicats. 17D : n = 2, en triplicats. Asibi : n = 1, en triplicats). ** : Significativement différent (P-value = 0,0039) par le test de Wilcoxon (P-value < 0,05).

Discussion

DISCUSSION

Trois virus sont reconnus comme étant efficacement transmis par allaitement maternel (i.e. VIH, HTLV-1 et CMV). Cependant, depuis quelques années de nouveaux arguments suggèrent une transmission potentielle d'autres virus au cours de l'allaitement (i.e. ZIKV, YFV, DENV, CHIKV, WNV…). Mon projet doctoral a porté sur l'identification des mécanismes de transmission de ZIKV et YFV par allaitement, au niveau de la glande mammaire, du lait maternel et de la muqueuse intestinale du nourrisson.

Axe 1 – Le virus Zika

Depuis 2014, la transmission de ZIKV par allaitement est débattue. Des arguments épidémiologiques et physiologiques en faveur d'une transmission du virus par allaitement ont été rapportés (e.g. transmission virale au nourrisson allaité, présence d'ARNv dans le lait maternel, etc.) mais, comme la possibilité d'une transmission vectorielle ne peut jamais être exclue, il est presque impossible de démontrer la transmission pendant l'allaitement dans la population humaine (Van de Perre et al. 2021). Ceci explique le très faible nombre de rapports de cas pour lesquels il est démontré que la transmission virale a eu lieu par l'allaitement. En raison de ce problème, les études épidémiologiques et les rapports de cas ne peuvent pas informer sur l'importance relative de ce mode de transmission. Il est donc nécessaire d'évaluer la transmission par allaitement et d'étudier les mécanismes associés sur modèle animal. Au laboratoire, nous avions précédemment démontré la transmission de ZIKV par allaitement sur le modèle murin A129 (Hubert et al. 2020) mais, chez l'Homme, certaines études de cas ont décrit une absence de détection de l'ARNv dans les échantillons sanguins ou urinaires des nouveau-nés allaités (Hemachudha et al. 2019 ; Cavalcanti et al. 2017). Cette absence de détection d'ARNv pourrait témoigner d'une absence de transmission virale par allaitement. Des facteurs biologiques régulant l'efficacité de cette voie de transmission pourraient donc exister (e.g. charge virale dans le lait, forme virale dans le lait, statut immunologique de la mère, stade de la lactation, composition du lait maternel, etc.) comme cela a été décrit pour d'autres virus transmis par allaitement (e.g. le CMV, HTLV-1 et le VIH (Prendergast et al. 2019)). Nous avons étudié le rôle du lait maternel et de ses composants dans la transmission de ZIKV par allaitement.

Nous avons précédemment démontré la capacité de ZIKV à disséminer jusqu'aux glandes mammaires de souris infectées. Ici, nous avons étudié la capacité de ZIKV à être excrété dans le lait maternel. Des titres viraux de l'ordre de 10^9 PFU/mL ont été détectés dans le lait maternel de souris allaitantes infectées. Parmi les 12 échantillons de lait testés, les titres viraux varient de $6{,}33 \times 10^4$ à $1{,}08 \times 10^9$ PFU/mL de lait. La nature infectieuse du lait maternel avait également été rapportée par *Regla-Nava et al*. dans le lait maternel de souris AG129 mais le titre viral n'avait pas été déterminé. En effet, le lactosérum avait été isolé puis passé plusieurs fois sur cellules Vero afin d'amplifier l'infection (Regla-Nava et al. 2019). Chez l'Homme, la nature infectieuse du lait de mères infectées par ZIKV avait été rapportée dans 5 études de cas (Sotelo et al. 2017 ; Blohm et al. 2017 ; Blohm et al. 2018 ; Dupont-Rouzeyrol et al. 2016 ; Cavalcanti et al. 2017) par l'observation d'un effet cytopathogène lors de l'exposition de cellules (Vero ou LLC-MK2) au lait infecté, tandis qu'une seule étude de cas a rapporté une absence d'effet cytopathogène d'un échantillon de lait maternel (Besnard et al. 2014).

Pour mieux caractériser le virus présent dans le lait maternel, nous avons séparé et isolé les différentes fractions qui le composent. Dans les fractions liquides (i.e. crème et lactosérum), des particules virales infectieuses ont été détectées : en moyenne 10^7 et 10^9 PFU/mL ont été détectées dans la crème et le lactosérum, respectivement. Ces résultats démontrent que des particules virales infectieuses libres sont présentes dans le lait maternel, confirmant que le lait maternel pourrait être véhicule de ZIKV et conduire à une transmission du virus par allaitement. Pour le VIH, qui est transmis par allaitement, le lait maternel contient également des particules infectieuses (10^5 PFU/ml à 6 mois de lactation) (Koulinska et al. 2006) et les hautes charges virales dans le lait ont été identifiées comme facteur de risque de la transmission du VIH par allaitement (Van de Perre et al. 2012). Il est également intéressant de noter que, chez l'Homme, l'ARNv de ZIKV a été détecté dans le lait maternel 3 jours avant l'apparition des symptômes de la mère (Hemachudha et al. 2019), renforçant le risque de transmission au nourrisson. Plusieurs mécanismes de franchissement de l'épithélium mammaire pourraient expliquer l'origine des particules virales dans le lait maternel. Les particules virales libres pourraient avoir été excrétées par les cellules épithéliales luminales mammaires car elles produisent le lait maternel. En effet, nous avions précédemment démontré la permissivité des cellules épithéliales primaires de glande mammaire humaine à l'infection par ZIKV (Hubert et al. 2019), ainsi que la permissivité des lignées cellulaires mammaires MDA-MB-231 (phénotype myoépithéliale) et MCF-7 (phénotype luminal) (Hubert

et al. 2019). Bien que cela soit moins probable, les particules virales pourraient également être produites localement dans le lait maternel par des cellules infectées.

Nous avons donc recherché la présence de cellules infectées dans le lait maternel. Nous avons d'abord essayé de rechercher la présence de cellules infectées par cytométrie en flux. Nous avons utilisé des anticorps dirigés contre la protéine E de ZIKV (ainsi que des anticorps dirigés contre les marqueurs cellulaires CD24, CD49f, EpCAM et CD45) mais nous n'avons pas réussi à détecter de signal positif. Nous pensons que cette absence de signal est due au fait que les cellules du lait ne répliquent pas activement le virus dans le lait et que le niveau d'expression de la protéine E est donc trop faible pour détecter un signal fluorescent par cytométrie en flux. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons essayé d'amplifier la production de ZIKV en réalisant des co-cultures avec des cellules Vero, permissives à l'infection. Cette technique nous a permis d'amplifier le signal : les particules virales ont été transmises aux cellules Vero démontrant la présence de virus dans la fraction cellulaire. Chez l'Homme, une unique étude de cas mentionne la présence d'un autre arbovirus, le CHIKV, dans la fraction cellulaire du lait d'une mère infectée (Campos et al. 2017). Des virus pour lesquels la transmission par allaitement est démontrée sont également présents sous forme cellule-associée dans le lait des mères infectées : le VIH (Koulinska et al. 2006) et le virus HTLV-1 (pour revue : Percher et al. 2016).

Le nombre de foyers infectieux dans les échantillons ZIKV varie de $1,65 \times 10^1$ à $2,3 \times 10^4$ cellules infectieuses par million de cellules, avec une corrélation entre les titres viraux déterminés dans le lait entier et le nombre de cellules infectieuses dans les mêmes échantillons. De même, pour le VIH, le nombre moyen de cellules infectées dans le lait maternel est de 10^4 cellules infectées par million de cellules (Koulinska et al. 2006), avec également une corrélation entre les titres en particules libres et les cellules infectées (Koulinska et al. 2006). Dans nos expériences, nous ne pouvons pas parler de cellules infectées car, avec la technique des co-cultures, nous avons observé une transmission de l'infection. Les cellules pourraient donc être infectées ou bien, des particules virales pourraient être adsorbées à la surface cellulaire. Afin de discriminer ces deux hypothèses, il serait nécessaire de réaliser les co-cultures après traitement (ou non) des cellules du lait avec de la trypsine afin de décrocher les particules virales adsorbées. Cependant, les quantités de lait récoltées étant très variables et parfois trop faibles (de 0 à 300 µl par souris), il serait difficile d'obtenir suffisamment de cellules du lait

pour réaliser cette expérience. Nos résultats démontrent l'existence de virus associé aux cellules dans le lait maternel. Les mécanismes de franchissement de l'épithélium mammaire impliquant des cellules pourraient être le « cheval de Troie » (transmigration de cellules infectées à travers l'épithélium) ou la desquamation de cellules épithéliales mammaires dans le lait maternel. Bien que peu probable, les cellules présentes dans le lait pourraient produire des particules virales localement. En outre, les cellules du lait pourraient jouer un rôle dans la transmission de ZIKV par allaitement. Il serait nécessaire d'étudier leur stabilité dans le tractus digestif du nouveau-né et leur capacité à atteindre et franchir l'épithélium intestinal.

Pour décrire plus précisément le contenu cellulaire du lait maternel et ainsi identifier les types cellulaires potentiellement infectieux, nous avons réalisé des expériences de cytométrie en flux en utilisant des marqueurs de cellules épithéliales (CD24) et immunitaires (CD45). Nous avons observé une majorité de cellules épithéliales allant de 74,4% à 99% contre une moyenne de 1,28% de cellules CD45-positives dans le lait maternel mature des souris infectées, comparables aux valeurs observées dans le lait maternel des souris MOCK. Ces résultats, sont comparables aux études réalisées avec du lait humain (Witkowska-Zimny et al. 2017) : *Witkowska-Zimny et al*. ont détecté de 60% à 98% de cellules épithéliales dans le lait humain mature et moins de 2% de cellules immunitaires. Nous avons précisé le type de cellules épithéliales détectées afin de déterminer si des cellules luminales, myoépithéliales ou progénitrices de glande mammaire sont présentes dans le lait maternel. En utilisant les marqueurs CD49f, CD24 et EpCAM, nous avons montré que le lait maternel des souris infectées par ZIKV contient des cellules luminales matures (74,8%) et parfois des progéniteurs immatures (4,28%), mais aucune population claire de cellules myoépithéliales n'a été détectée (bien qu'un marquage des cellules myoépithéliales de glande mammaire serait nécessaire pour identifier cette population cellulaire). Comme les cellules mammaires luminales sont permissives à l'infection par ZIKV (Hubert et al. 2019) et sont majoritaires dans le lait maternel murin, elles pourraient être infectées ou porter des particules de ZIKV adsorbées à leur surface. Un mécanisme de franchissement de l'épithélium mammaire par ZIKV pourrait donc être le détachement de cellules luminales mammaires infectées de l'épithélium mammaire, introduisant ainsi du virus associé aux cellules dans le lait maternel. Ces résultats n'excluent pas la potentielle présence de cellules immunitaires infectées dans le lait maternel mais étant peu abondante dans le lait mature, leur participation à la transmission de ZIKV par allaitement serait minoritaire. Dans le colostrum, en revanche, les cellules immunitaires sont très

abondantes (184 000 leucocytes/ml dans le colostrum contre 15 000 leucocytes/ml dans le lait mature (Trend et al. 2015)) et pourraient participer à la transmission du virus par allaitement.

Nous avons essayé de déterminer si les cellules infectieuses du lait maternel murin sont des cellules épithéliales et/ou immunitaires. Comme mentionné précédemment, il n'a pas été possible de détecter la protéine E par cytométrie en flux donc nous avons voulu réaliser les co-cultures après déplétion selon le marqueur CD45. Après immuno-marquage des cellules du lait par des anticorps anti-CD45 couplés à des billes magnétiques, nous avons séparé les fractions CD45-positive et CD45-négative avant co-culture de chaque fraction avec des cellules Vero. Malheureusement, les volumes de lait murin prélevés étant trop faibles, nous n'avons jamais pu obtenir suffisamment de cellules du lait pour réaliser les déplétions, les contrôles de déplétion par cytométrie en flux ainsi que les co-cultures. Pour déterminer les types cellulaires infectés par ZIKV dans le lait maternel, il serait nécessaire d'avoir accès à du lait maternel de femmes infectées.

La transmission de ZIKV par allaitement a été évaluée par la recherche d'ARNv dans les rates des souriceaux allaités. Un taux très élevé de transmission virale (>90%) a été observé, avec des charges virales spléniques allant de 0,93 à 4×10^2 copies d'ARNv/mg. Ces charges virales restent relativement faibles, très probablement en raison du stade très précoce de l'infection des souriceaux (Hubert et al. 2020). En effet, les souriceaux ont dû être sacrifiés à J4 post-infection car tout le lait maternel a été prélevé afin d'étudier l'excrétion de ZIKV dans celui-ci. Pour étudier la transmission virale aux souriceaux, il est nécessaire de choisir un moment ultérieur au pic d'excrétion de ZIKV dans le lait maternel, lorsque l'épithélium intestinal des souriceaux a été exposé à plusieurs reprises à du lait infecté. Cependant, ayant déjà démontré la transmission de ZIKV aux souriceaux dans une étude précédente (Hubert et al. 2020), la quantification de l'ARNv dans les rates des souriceaux n'a été réalisée ici que pour vérifier s'il y avait eu transmission du virus. Ces résultats apportent néanmoins une information supplémentaire à notre étude précédente car nous avions démontré la transmission du virus à des souriceaux âgés de 1 à 3 jours tandis qu'ici, ZIKV est transmis à des souriceaux plus âgés (jusqu'à 11 jours au moment de l'infection des mères), même quand l'imperméabilité de la barrière intestinale augmente (Holmes et al. 2006). Le taux très élevé de transmission virale aux souriceaux que nous avons obtenu dans nos expériences pourrait être expliqué par le

statut immunologique de notre modèle animal car les souris A129 ne possèdent pas de récepteurs aux IFN de type I. Chez l'Homme, la transmission au nourrisson a été rapportée chez 4 enfants allaités (Blohm et al. 2017 ; Besnard et al. 2014 ; Giovanetti et al. 2018) tandis que 2 études montrent une absence de transmission au nourrisson (Cavalcanti et al. 2017 ; Hemachudha et al. 2019).

Afin de comprendre les différences de transmission virale observées chez l'Homme, nous avons étudié si certains composants du lait maternel pourraient réguler la transmission de ZIKV pendant l'allaitement. Nous avons étudié l'effet de la LF, de la LA et des acides gras libres sur l'infection par ZIKV.

Nous n'avons pas observé d'effet de la LF et de la LA (aux concentrations physiologiques) sur l'infection des cellules Caco-2 (ni lors de la pré-incubation des cellules avant infection, ni lors de la pré-incubation des particules virales avant infection). En revanche, il a été montré que la LF interfère avec les particules virales du VIH-1 (Puddu et al. 1998)(Campbell et al. 1995) et les cellules cibles lors de l'infection par le CMV, bien que ces virus soient transmis par allaitement (Ng et al. 2015).

Concernant les acides gras libres, nous avons démontré que les acides gras à longue chaîne carbonée C18:0 C18:1, C18:2 et C18:3 entraînent une inactivation des particules de ZIKV. D'après des études précédentes, les acides gras libres interagiraient avec l'enveloppe virale des virus enveloppés, entraînant une altération de l'intégrité de celle-ci (Welsh et al. 1978). Afin de vérifier cette hypothèse, les particules virales de ZIKV, traitées ou non par ces différents acides gras, pourraient être observées par microscopie électronique, comme cela a été fait pour le VSV (Thormar et al. 1987). Après coloration négative par l'acide phosphotungstique, la pénétration du colorant dans les particules virales témoigne de l'altération de l'enveloppe virale. L'intégrité des particules virales suite à l'incubation avec les acides gras pourrait également être étudiée par des tests en présence de RNase. La dégradation de l'ARNv suite au traitement par la RNase témoigne de l'altération de l'intégrité des particules virales.

Les lipides étant les composants les plus variables du lait maternel (Koletzko et al. 2001), il pourrait être intéressant de prendre en compte le contenu en acides gras du lait des mères infectées dans l'évaluation du risque de transmission de ZIKV à leur nourrisson. Par ailleurs, différentes techniques permettent de faire varier le contenu en acides gras du lait maternel,

telles que l'adaptation de l'alimentation de la mère ou la supplémentation orale en acides gras, et pourraient être discutées dans la prévention de la transmission de virus enveloppés par allaitement. De plus, il a été déterminé dans plusieurs études que le lait maternel exerce une activité antivirale lorsque celui-ci a été conservé à 4 °C ou -20°C. Le contenu en acides gras étant plus élevé à 4°C, ces derniers pourraient être responsables de l'activité antivirale observée (Pfaender et al. 2013). *Pfaender et al.* ont suggéré que la conservation du lait maternel entraînerait une altération de l'intégrité de la membrane des globules gras, rendant le cœur de triglycérides accessible aux lipases présentes dans le lait. Les triglycérides seraient alors digérés, générant une augmentation des acides gras libres dans le lait. Deux observations renforcent cette hypothèse : (i) la pré-incubation de ZIKV avec la fraction crème entraîne une inactivation du virus (ii) mais, si les fractions du lait sont séparées avant la réfrigération/congélation du lait (et non après), l'activité antivirale de la crème est perdue (Thormar et al. 1987). Ces résultats suggèrent qu'un facteur du lait écrémé est nécessaire à l'activité antivirale de la crème (probablement les lipases). Le rôle des lipases dans l'activité antivirale du lait a ensuite été confirmé par *Thormar et al.* qui ont réfrigéré les échantillons en présence ou en absence d'inhibiteurs de lipase. La préincubation du virus avec du lait réfrigéré a entraîné une chute du titre viral tandis que la préincubation avec du lait réfrigéré contenant des inhibiteurs de lipases n'a pas entraîné de modification du titre viral. En outre, la conservation du lait à 4°C ou -20°C serait également une technique envisageable pour inactiver les particules virales présentes dans le lait maternel des femmes infectées. À noter que les lactariums conservent les dons de lait à -20°C avant de les donner aux nourrissons, limitant ainsi le risque de transmission virale.

En conclusion, les deux formes virales (particules libres et cellules infectieuses) présentes dans le lait maternel pourraient jouer un rôle dans la transmission de ZIKV par allaitement. En effet, l'estomac des nourrissons étant tamponné par le lait maternel, le pH gastrique des nouveau-nés est d'environ 7 (Miclat et al. 1978). Les particules libres de ZIKV étant stables à pH 7(Müller et al. 2016), elles pourraient atteindre la muqueuse intestinale du nourrisson et être transmises à ce dernier. Par ailleurs, certaines cellules maternelles étant transmises au nourrisson au cours de l'allaitement (Cabinian et al. 2016 ; Aydın et al. 2018), les cellules infectieuses pourraient participer à la transmission de ZIKV. En effet, l'allaitement entraîne un microchimérisme maternel, c'est-à-dire, un transfert et une implantation de cellules maternelles dans la muqueuse intestinale du nourrisson (Molès et al. 2017b). Enfin, nos

résultats sur l'effet antiviral des acides gras pourraient être considérés dans la lutte et dans l'évaluation du risque de transmission de ZIKV par allaitement.

Axe 2 – Le virus de la fièvre jaune

La transmission de YFV par allaitement a été décrite chez l'Homme pour la souche vaccinale, conduisant au développement de symptômes neurologiques sévères chez le nourrisson. Afin de renseigner sur le risque de transmission par allaitement de souches sauvages de YFV et de déterminer les mécanismes associés, nous avons étudié les trois étapes chronologiques de la transmission par allaitement : (i) la dissémination virale jusqu'à la glande mammaire, (ii) l'excrétion du virus dans le lait maternel et (iii) le franchissement de l'épithélium intestinal du nourrisson et les mécanismes associés.

Nous avons commencé par étudier la capacité de YFV à disséminer jusqu'aux glandes mammaires chez la souris. Après infection, les 2 souches sauvages testées (Dakar et Asibi) ont été détectées dans les glandes mammaires thoraciques, abdominales et inguinales des souris mais des différences ont été observées selon les glandes mammaires. En effet, pour la souche Asibi, bien qu'une augmentation du titre viral ait été observée dans les glandes thoraciques et abdominales au cours du temps, aucune particule infectieuse n'a été détectée dans les glandes inguinales (à aucun des temps testés et chez aucune des 15 souris). Pour la souche Dakar également, des titres viraux plus faibles (d'un facteur 10 000) ont été détectés dans les glandes inguinales (maximum 7,8 x 10^2 UFP/glande à J5) par rapport aux glandes thoraciques (maximum 5,7 x 10^6 UFP/glande à J5) et abdominales (maximum 4 x 10^6 UFP/glande à J5). Ces résultats pourraient être dus à la distance des glandes inguinales par rapport au point d'injection situé entre les omoplates. Par ailleurs, les expériences avec les 2 souches ayant été faites séparément, nous ne pouvons pas comparer leur efficacité de dissémination, les charges virales et les titres viraux. Ces expériences seront répétées et réalisées en parallèle afin de pouvoir confirmer et comparer les résultats obtenus en termes d'efficacité. Néanmoins, la dissémination virale de YFV aux glandes mammaires est démontrée.

Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier et de confirmer la dissémination aux glandes mammaires de la souche vaccinale de YFV car sa transmission par allaitement et sa présence dans le lait maternel sont démontrées chez l'Homme. Enfin, nous avons réalisé ces expériences chez des souris non allaitantes, il serait donc intéressant d'étudier la dissémination virale dans les glandes mammaires à d'autres stades de leur développement

(pendant la gestation ou la lactation), car des changements structurels et métaboliques majeurs se produisent.

YFV disséminant aux glandes mammaires, nous nous sommes ensuite intéressés à son tropisme dans cet organe. Plus précisément, nous avons étudié la sensibilité et la permissivité des cellules épithéliales de glande mammaire, à l'aide de lignées cellulaires de phénotype luminal (MCF-7) ou myoépithélial (MDA-MB-231). Nous avons observé que les deux lignées sont sensibles à l'infection par les 3 souches de YFV testées et produisent des titres viraux supérieurs à 10^7 PFU/ml à 48h post-infection. Il serait nécessaire de confirmer ces résultats sur d'autres modèles tels que des cellules primaires de glande mammaire humaine ou d'étudier le tropisme viral dans la glande mammaire de souris infectées. En effet, l'étude du tropisme sur modèle murin permettrait de confirmer la permissivité des cellules épithéliales mammaires mais également d'étudier celle des autres types cellulaires présents dans les glandes mammaires (e.g. adipocytes, cellules endothéliales, cellules immunitaires, etc). L'immunomarquage des molécules CD31 et CD45 permettrait d'identifier les cellules endothéliales et immunitaires respectivement, tandis que des colorants (tels que le LipidTOX) peuvent être utilisés pour marquer les adipocytes. L'infection des cellules peut ensuite être étudiée par cytométrie en flux (à l'aide d'un marquage de la protéine E du virus). Si l'infection des cellules épithéliales de glande mammaire était ainsi confirmée, une hypothèse de mécanisme de franchissement de l'épithélium mammaire serait l'infection productive des cellules myoépithéliales puis des cellules luminales, aboutissant à la production de particules infectieuses dans le lait maternel. Afin d'étudier la plausibilité d'un tel mécanisme, il serait intéressant d'étudier le mécanisme de franchissement de l'épithélium mammaire à l'aide de modèles de barrière *in vitro*. Les lignées cellulaires MCF-10A et MCF-10F (cellules épithéliales mammaires) peuvent être cultivées sur filtres Transwell et forment des barrières mammaires imperméables (Chin et al. 2018)(Marshall et al. 2009)(Zhang et al. 2022).

De manière générale, les travaux sur le tropisme viral dans la glande mammaire *in vivo* sont rares. À notre connaissance, seule la dissémination de ZIKV et de MMTV a été étudiée dans les glandes mammaires murines (Hubert et al. 2019 ; Parisi et al. 2022). Après l'infection par ZIKV, le virus dissémine jusqu'aux glandes mammaires abdominales où des charges virales de l'ordre de 10^5 copies d'ARNv ont été détectées par milligramme de glande (Hubert et al. 2019). Concernant le MMTV, celui-ci est introduit dans les glandes mammaires par des lymphocytes

B ou des cellules dendritiques infectées (Parisi et al. 2022). De même, le tropisme viral dans les glandes mammaires murines a été étudié uniquement pour ces deux virus. En effet, il a précédemment été observé au laboratoire (données non publiées), que les cellules immunitaires (CD45+) et les cellules non-immunitaires et non-endothéliales (CD45-/CD31-) de glandes mammaires murines sont infectées *in vivo* (Thèse Hubert 2019). Concernant le MMTV, celui-ci infecte les cellules épithéliales mammaires lors de leur division à la puberté ou pendant la gestation (Ross et al. 2010) et les tumeurs viro-induites se développent à partir des cellules luminales de la glande mammaire (Parisi et al. 2022). Enfin, la sensibilité des lignées cellulaires épithéliales de glande mammaire humaine a été montrée pour différents virus. En effet, les cellules MDA-MB-231 sont notamment sensibles à l'infection par le CMV (Branch et al. 2021) tandis que les cellules MCF-7 sont sensibles à l'infection par le CMV (Branch et al. 2021) et le virus de la maladie de Newcastle (Ghrici et al. 2013).

Suite à la dissémination de YFV aux glandes mammaires murines, nous avons étudié la capacité du virus à être excrété dans le lait maternel. Dans ce but, et n'ayant pas accès à du lait maternel de femmes infectées, nous avons utilisé le modèle murin A129. Nous avons mis en évidence la nature infectieuse du lait maternel de souris infectées par la souche sauvage Asibi, dans lequel nous avons détecté des titres viraux variants de 1,7 x 10^2 UPF/ml à 6,3 x 10^3 UFP/ml. La présence de virus infectieux dans le lait maternel renforce la possibilité d'une transmission de souches sauvages de YFV par allaitement. Ces titres viraux sont cependant plus faibles que ceux que nous avons observés pour ZIKV. En effet, les titres viraux de ZIKV dans le lait maternel murin varient de 10^5 à 10^9 UFP/ml. Nous nous sommes également intéressés à la forme virale dans le lait maternel et avons recherché la présence de particules libres de YFV dans les mêmes échantillons de lait. Après élimination du culot cellulaire et de la crème, nous avons détecté des titres viraux variants de 0 à 2,13 x 10^3 UFP/ml dans le lactosérum, confirmant la présence de particules libres. Il serait intéressant de déterminer l'origine de ces particules virales dans le lait maternel et donc d'étudier les mécanismes de franchissement de l'épithélium mammaire (comme mentionner ci-dessus). La présence de cellules infectées sera également étudiée après isolement du culot cellulaire du lait maternel de souris infectées, de même que décrit précédemment pour ZIKV (par co-cultures avec des cellules Vero en présence de CMC). Par ailleurs, il sera également intéressant d'investiguer l'excrétion d'autres souches virales de YFV dans le lait maternel telles que la souche vaccinale qui est transmise par allaitement chez l'Homme.

Enfin, pour compléter les résultats obtenus avec le lait murin, la stabilité du virus dans le lait maternel humain est en cours d'étude au laboratoire. Nous collaborons avec le Dr Virginie Rigourd, directrice du lactarium de l'hôpital Necker, qui nous fournit des échantillons de lait maternel de donneuses consentantes. Les expériences sont réalisées directement le jour des prélèvements afin de ne pas modifier la composition du lait maternel par conservation de celui-ci.

Le lait maternel murin étant infectieux et l'ARNv de YFV (souches 17DD et sauvage) ayant été détecté dans le lait maternel humain, celui-ci pourrait être véhicule du virus. Après ingestion de lait maternel infecté, pour qu'il y ait transmission virale au nourrisson, le virus doit franchir un épithélium. Nous avons étudié le franchissement de l'épithélium intestinal car celui-ci se trouve sur le trajet du lait infecté dans le tractus digestif et est une porte d'entrée connue pour de nombreux virus, notamment pour les arbovirus ZIKV et TBEV. Nous avons montré que les cellules Caco-2 (lignée entérocytaire) sont sensibles et permissives à l'infection. Bien qu'il soit nécessaire de répéter les expériences avec la souche Asibi, la permissivité des cellules Caco-2 à l'infection par les 3 souches virales semble comparable (environ 10^7 UFP/ml sont détectées à 48h post-infection). Nous avions précédemment montré la permissivité des cellules Caco-2 à l'infection par ZIKV mais les titres viraux détectés étaient de l'ordre de 10^5 UFP/ml à 48h post-infection.

Nous avons ensuite étudié le franchissement de la barrière intestinale à l'aide d'un modèle *in vitro* permettant l'obtention d'une monocouche épithéliale polarisée. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'effet de l'infection YFV sur l'intégrité de la barrière intestinale et nous avons observé que le virus n'entraîne pas de rupture de l'épithélium intestinal *in vitro*. En effet, nous avons évalué l'intégrité des monocouches par mesure de la TEER avant et après infection et nous n'avons pas observé de différence de résistance entre les monocouches infectées et non infectées, tandis que le traitement par l'EDTA a bien induit une chute de celle-ci, démontrant que la barrière reste étanche après infection (au moins jusqu'à 48h post-infection). Par ailleurs, nous avons immuno-marqué la protéine de jonctions serrées ZO-1 et nous avons observé une distribution membranaire continue dans les barrières intestinales infectées et non infectées, par immunofluorescence. Cette expérience sera répétée et complétée par l'étude des niveaux d'expression protéique de ZO-1 par Western-Blot. Enfin, des analyses histologiques de coupes de tissus intestinaux pourraient être réalisées chez des

souriceaux infectés par voie intra-gastrique, ou bien des analyses de la distribution des jonctions serrées par immunofluorescence.

Les épithélia intestinaux étant étanche après exposition à YFV *in vitro*, nous avons ensuite étudié la capacité du virus à franchir la barrière intestinale. Nous avons observé que les 3 souches virales infectent et franchissement les monocouches intestinales *in vitro*. Les cellules Caco-2 polarisées produisent des particules infectieuses aussi bien du côté apical que basolatéral. Du côté apical, les cellules infectées par les souches Dakar, 17D-204 et Asibi produisent 6,6 x 10^7 UFP/ml, 1,4 x 10^6 UFP/ml et 5,5 x 10^4 UFP/ml à 48h post-infection, respectivement. De même, du côté basolatéral, le franchissement semble plus efficace pour la souche Dakar que pour les souches 17D-204 puis Asibi. En effet, des particules infectieuses ont été détectées dans le compartiment basolatéral à partir de 24h pour la souche Dakar (5,9 x 10^3 UFP/ml), 48h pour la souche 17D-204 (3,4 x 10^2 UFP/ml) et 72h pour la souche Asibi (1,2 x 10^2 UFP/ml). Cependant, l'expérience de franchissement de barrière par la souche Asibi n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il est indispensable de répéter celle-ci afin d'observer si des différences d'efficacité de franchissement existent réellement. Bien que la production de particules infectieuses soit moins importante du côté basolatéral qu'apical, les 3 souches virales franchissent la barrière intestinale *in vitro*. Afin de confirmer le mécanisme de franchissement viral, des observations par microscopie électronique seront réalisées pour vérifier l'infection des barrières et le franchissement de la barrière intestinale par YFV sera étudié *in vivo*. Après infection de souriceaux du modèle A129 par voie intra-gastrique, l'infection de ces derniers et la dissémination aux différents organes seront étudiées. Par ailleurs, l'infection de leur épithélium intestinal sera évaluée et le tropisme de YFV y sera déterminé par immunomarquage et cytométrie en flux. De plus, d'autres modèles permettent d'étudier les interactions hôte-pathogène au niveau de l'épithélium intestinal tels que les organoïdes ou les entéroïdes intestinaux humains (Zachos et al. 2016). Ces modèles permettent l'obtention de sphéroïdes tri-dimensionnels contenant les différents types cellulaires de l'épithélium intestinal, permettant ainsi l'étude des différents types cellulaires infectés. Enfin, le virus circulant dans le tractus digestif du nourrisson, il serait intéressant d'étudier la stabilité de YFV à pH faible et dans les sucs gastriques.

En conclusion, les mécanismes cellulaires étudiés dans ce projet sont comparables entre les souches 17D-204, Dakar et Asibi. À l'instar de la souche vaccinale 17D-204, les souches sauvages testées disséminant aux glandes mammaires murines, franchissant l'épithélium mammaire de la mère et l'épithélium intestinal du nourrisson, celles-ci pourraient être transmises par allaitement au nouveau-né.

L'étude des mécanismes de transmission par allaitement est nécessaire à la prévention et à l'évaluation des risques de transmission d'une mère infectée à son enfant allaité. Cependant, d'autres modes de transmission reposent sur la présence de virus infectieux dans le lait maternel. En effet, les produits laitiers peuvent être à l'origine de la transmission de virus par l'alimentation. Le TBEV peut être transmis suite à l'ingestion de lait ou de produits laitiers contaminés (Buczek et al. 2022) et des virus tels que le virus de l'hépatite E (Santos-Silva et al. 2022), le virus Maëdi-Visna (Kalogianni et al. 2020) ou le virus de l'arthrite encéphalite caprine (Narayan et al. 1985) ont été détectés dans le lait d'animaux infectés (e.g. vaches (Santos-Silva et al. 2022), chèvres (Santos-Silva et al. 2022) et moutons (Kalogianni et al. 2020)). Il serait intéressant d'évaluer le risque de leur transmission par l'alimentation et d'étudier des stratégies d'inactivation virale par traitement du lait contaminé (e.g. pasteurisation holder, pasteurisation pretoria, congélation…) afin de contrôler leur transmission.

Bibliographie

Abreu Manso et al. (2015). Yellow Fever 17DD Vaccine Virus Infection Causes Detectable Changes in Chicken Embryos. *PLoS Neglected Tropical Diseases 9(9).* https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004064

Agumadu & Ramphul (2018). Zika Virus: A Review of Literature. *Cureus, 10(7), e3025*. https://doi.org/10.7759/cureus.3025

Andervont (1946). The Mammary Tumor Agent and Its Implication in Cancer Research. *The Yale journal of biology and medicine 18(5): 333–44.* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20982663

Arragain et al. (2017). Vertical Transmission of Dengue Virus in the Peripartum Period and Viral Kinetics in Newborns and Breast Milk: New Data. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society 6(4): 324–31*. https://academic.oup.com/jpids/article-lookup/doi/10.1093/jpids/piw058

Aydın et al. (2018). Transfer and Integration of Breast Milk Stem Cells to the Brain of Suckling Pups. *Scientific Reports 2018 8:1 8(1): 1–9.* https://www.nature.com/articles/s41598-018-32715-5

Balimane et al. (2005). Cell Culture-Based Models for Intestinal Permeability: A Critique. *Drug Discovery Today 10(5): 335–43.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644604033549?via%3Dihub

Ballard & Morrow (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America 60(1): 49–74.* https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031395512001678?via%3Dihub

Barrett & Stanberry (2009). Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases. *1478*. https://www.elsevier.com/books/vaccines-for-biodefense-and-emerging-and-neglected-diseases/barrett/978-0-12-369408-9

Barthel et al. (2013). Breast Milk as a Possible Route of Vertical Transmission of Dengue Virus ? *Clinical Infectious Diseases 57(3): 415–17.* https://academic.oup.com/cid/article/57/3/415/460422?login=true

Bartu, Dusci & Ilett (2009). Transfer of Methylamphetamine and Amphetamine into Breast Milk Following Recreational Use of Methylamphetamine. *British Journal of Clinical Pharmacology 67(4): 455–59.* https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2125.2009.03366.x

Beljaars et al. (2004). Inhibition of Cytomegalovirus Infection by Lactoferrin in Vitro and in Vivo. *Antiviral Research 63(3): 197–208.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354204000920?via%3Dihub

Berkhout et al. (2004). The Antiviral Activity of the Milk Protein Lactoferrin against the Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine 17(3): 291–94.* https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15222480/

Besnard et al. (2014). Evidence of Perinatal Transmission of Zika Virus, French Polynesia. Euro Surveillance 19(13): 8–11. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20751

Blank et al. (2000). Infection of Polarized Cultures of Human Intestinal Epithelial Cells with Hepatitis A Virus: Vectorial Release of Progeny Virions through Apical Cellular Membranes. *Journal of virology 74(14): 6476–84.* https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.74.14.6476-6484.2000

Blohm et al. (2017). Complete Genome Sequences of Identical Zika Virus Isolates in a Nursing Mother and Her Infant. *Genome Announcements 5(17).* https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomeA.00231-17

Blohm et al. (2018). Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. *Clinical Infectious Diseases 66(7): 1120–21*. https://www.cdc.gov/zika/transmission/

Bobiński & Bobińska (2020). Fatty Acids of Human Milk – a Review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research 2022 92:3-4, 280-291.* https://econtent.hogrefe.com/doi/10.1024/0300-9831/a000651

Bomsel et al. (1998). Intracellular Neutralization of HIV Transcytosis across Tight Epithelial Barriers by Anti-HIV Envelope Protein DIgA or IgM. *Immunity 9(2): 277–87.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107476130080610X?via%3Dihub

Bomsel (1997). Transcytosis of Infectious Human Immunodeficiency Virus across a Tight Human Epithelial Cell Line Barrier. *Nature Medicine 3(1): 42–47.* https://www.nature.com/articles/nm0197-42

Boyer et al. (2018). An Overview of Mosquito Vectors of Zika Virus. *Microbes and Infection 20(11–12): 646–60.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128645791830039X

Branch et al. (2021). Productive Infection of Human Breast Cancer Cell Lines with Human Cytomegalovirus (HCMV). *Pathogens 2021, Vol. 10, Page 641 10(6): 641.* *https*://www.mdpi.com/2076-0817/10/6/641/htm

Brueckner, Reagan & Yancey (1956). Studies of Dengue Fever Virus (Hawaii Mouse Adapted) in Lactating Hamsters. *The American journal of tropical medicine and hygiene 5(5): 809–11.* https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/5/5/article-p809.xml

Bryant, Holmes & Barrett (2007). Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. *PLoS Pathogens 3(5): 0668–73.* https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030075

Buczek et al. (2022). Food-Borne Transmission of Tick-Borne Encephalitis Virus - Spread, Consequences, and Prophylaxis. *International Journal of Environmental Research and Public Health 2022, Vol. 19, Page 1812 19(3): 1812*. https://www.mdpi.com/1660-4601/19/3/1812/htm

Cabinian et al. (2016). Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PLOS ONE 11(6): e0156762.* https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0156762

Campbell et al. (1995). Antiviral Effects of Plasma and Milk Proteins: Lactoferrin Shows Potent Activity against Both Human Immunodeficiency Virus and Human Cytomegalovirus Replication in Vitro. *The Journal of infectious diseases 172(2): 380–88.* https://academic.oup.com/jid/article/172/2/380/826751?login=true

Campos et al. (2017). First Detection of Chikungunya Virus in Breast Milk. *Pediatric Infectious Disease Journal 36(10): 1015–17*. https://journals.lww.com/pidj/Fulltext/2017/10000/First_Detection_of_Chikungunya_Virus_in_Breast.27.aspx

Cao-Lormeau et al. (2016). Guillain-Barré Syndrome Outbreak Associated with Zika Virus Infection in French Polynesia: A Case-Control Study. *The Lancet 387(10027): 1531–39.* http://www.thelancet.com/article/S0140673616005626/fulltext

Carbajo, Cardo & Vezzani (2019). Past, Present and Future of Aedes Aegypti in Its South American Southern Distribution Fringe: What Do Temperature and Population Tell Us? *Acta Tropica 190: 149–56.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X18309550?via%3Dihub

Carvalho et al. (2014). Inhibition of Mayaro Virus Infection by Bovine Lactoferrin. *Virology 452–453: 297–302*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004268221400035X?via%3Dihub

Carvalho et al (2017). Bovine Lactoferrin Activity against Chikungunya and Zika Viruses. *Journal of General Virology 98(7): 1749–54.* https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000849

Castro Ferreira et al. (2018). The 17D-204 and 17DD Yellow Fever Vaccines: An Overview of Major Similarities and Subtle Differences. *Expert review of vaccines 17(1): 79–90*. https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2018.1406800

Cavalcanti et al. (2017). Zika Virus Shedding in Human Milk during Lactation: An Unlikely Source of Infection? *International Journal of Infectious Diseases 57: 70–72.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971217300450?via%3Dihub

Centeno-Tablante et al. (2021). Update on the Transmission of Zika Virus Through Breast Milk and Breastfeeding: A Systematic Review of the Evidence. *Viruses 13(1): 123.* h https://www.mdpi.com/1999-4915/13/1/123

CDC (2002). Possible West Nile Virus Transmission to an Infant through Breast-Feeding--Michigan, 2002. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report 51(39): 877–78*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12375687

CDC (2009). Transmission of Yellow Fever Vaccine Virus through Breast-Feeding - Brazil, 2009. *Morbidity and Mortality Weekly Report 59(5): 130–32.* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150888

CDC (2010). Yellow Fever Vaccine. https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5907a1.htm

Chaves-Carballo (2005). Carlos Finlay and Yellow Fever: Triumph over Adversity. *Military Medicine 170(10): 881–85*. https://academic.oup.com/milmed/article/170/10/881/4577690?login=true

Chen et al. (2017). Bovine Lactoferrin Inhibits Dengue Virus Infectivity by Interacting with Heparan Sulfate, Low-Density Lipoprotein Receptor, and DC-SIGN. *International Journal of Molecular Sciences 18(9).* https://www.mdpi.com/1422-0067/18/9/1957

Chien et al. (2008). Bovine Lactoferrin Inhibits Japanese Encephalitis Virus by Binding to Heparan Sulfate and Receptor for Low Density Lipoprotein. *Virology 379(1): 143–51*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682208004042?via%3Dihub

Chin et al. (2018). Polarized Secretion of Extracellular Vesicles by Mammary Epithelia. *Journal of mammary gland biology and neoplasia 23(3): 165–76.* https://link.springer.com/article/10.1007/s10911-018-9402-6

Ciota et al. (2018). Differential Effects of Temperature and Mosquito Genetics Determine Transmissibility of Arboviruses by Aedes Aegypti in Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 99(2): 417–24.* https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/99/2/article-p417.xml

Clarke & May (2000). Effect of Antimicrobial Factors in Human Milk on Rhinoviruses and Milk-Borne Cytomegalovirus in Vitro. *Journal of Medical Microbiology 49(8): 719–23*. https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/0022-1317-49-8-719

Conzelmann et al. 2019. Storage-Dependent Generation of Potent Anti-ZIKV Activity in Human Breast Milk. *Viruses 11(7): 591*. https://www.mdpi.com/1999-4915/11/7/591

Coombes & Powrie (2008). Dendritic Cells in Intestinal Immune Regulation. *Nature reviews. Immunology 8(6): 435*. https://www.nature.com/articles/nri2235

Cruz-Hernandez et al. (2013). Direct Quantification of Fatty Acids in Human Milk by Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A 1284: 174–79.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313002161

Damiens et al. (1998). Role of Heparan Sulphate Proteoglycans in the Regulation of Human Lactoferrin Binding and Activity in the MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line. *European Journal of Cell Biology 77(4): 344–51.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171933598800939?via%3Dihub

Danet et al. (2019). Midgut Barriers Prevent the Replication and Dissemination of the Yellow Fever Vaccine in Aedes Aegypti. *PLoS neglected tropical diseases 13(8).* h https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007299

Dao & Le (2022). Histology, Goblet Cells. *StatPearls.* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553208/

Davis et al. (2006). West Nile Virus Discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for Cellular Attachment and Infection. *Journal of virology 80(3): 1290–1301*. https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.80.3.1290-1301.2006

Desgraupes et al. (2021). Mother-to-Child Transmission of Arboviruses during Breastfeeding: From Epidemiology to Cellular Mechanisms. *Viruses 2021, Vol. 13, Page 1312 13(7): 1312*. https://www.mdpi.com/1999-4915/13/7/1312/htm

Dick, Kitchen & Haddow (1952). Zika Virus (I). Isolations and Serological Specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 46(5): 509–20.* https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(52)90042-4

Dickman et al. (2000). Rotavirus Alters Paracellular Permeability and Energy Metabolism in Caco-2 Cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpgi.2000.279.4.G757

Dillon & Lo (2019). M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Frontiers in Immunology 10(JUL): 1499.* https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01499/full

Dorosko & Connor (2010). Primary Human Mammary Epithelial Cells Endocytose HIV-1 and Facilitate Viral Infection of CD4+ T Lymphocytes. *Journal of Virology 84(20): 10533–42*. http://jvi.asm.org/

Dowall et al. (2016). A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases 10(5): e0004658.* https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004658

Dupont-Rouzeyrol et al. (2016). Infectious Zika Viral Particles in Breastmilk. *The Lancet 387(10023): 1051*. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616006243

Dzięgelewska & Gajewska (2018). Stromal-Epithelial Interactions during Mammary Gland Development. https://www.intechopen.com/chapters/63044

ECDC (2021). Aedes Albopictus - Current Known Distribution: March 2021. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-march-2021

Farache et al. (2013). Contributions of Dendritic Cells and Macrophages to Intestinal Homeostasis and Immune Defense. *Immunology and Cell Biology 91(3): 232–39*. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/icb.2012.79

Fotopoulos et al. (2002). Transepithelial Transport of HIV-1 by M Cells Is Receptor-Mediated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.142586899

Francese et al. (2020). Anti-Zika Virus and Anti-Usutu Virus Activity of Human Milk and Its Components. *PLoS Neglected Tropical Diseases 14(10): 1–24*. https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008713

Frierson (2010). The Yellow Fever Vaccine: A History. *The Yale Journal of Biology and Medicine 83(2): 77*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2892770/

Friis & Andersen (1982). Rate of Inactivation of Cytomegalovirus in Raw Banked Milk during Storage at -20 Degrees C and Pasteurisation. *British medical journal (Clinical research ed.) 285(6355): 1604–5.*

Galler et al. (1997). The Yellow Fever 17D Vaccine Virus: Molecular Basis of Viral Attenuation and Its Use as an Expression Vector. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research 30(2): 157–68*. http://www.scielo.br/j/bjmbr/a/wmdBdwRWbtCmrt596wp3nxS/?lang=en

Ghrici et al. (2013). Induction of Apoptosis in MCF-7 Cells by the Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein of Newcastle Disease Virus Malaysian Strain AF2240. *Oncology Reports 30(3): 1035–44*. http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2013.2573/abstract

Gianchecchi et al. (2022). Yellow Fever: Origin, Epidemiology, Preventive Strategies and Future Prospects. *Vaccines 10(3).* https://www.mdpi.com/2076-393X/10/3/372

Giovanetti et al. (2018). Genetic Evidence of Zika Virus in Mother's Breast Milk and Body Fluids of a Newborn with Severe Congenital Defects. *Clinical Microbiology and Infection 24(10): 1111–12.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X18304671?via%3Dihub

Global Health CDC. Newsroom - Yellow Fever. https://www.cdc.gov/globalhealth/newsroom/topics/yellowfever/index.html

Gonzalez-Hernandez et al. (2014). Efficient Norovirus and Reovirus Replication in the Mouse Intestine Requires Microfold (M) Cells. *Journal of Virology 88(12): 6934–43*. https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00204-14

Gonzalez-Hernandez et al. (2013). Murine Norovirus Transcytosis across an In Vitro Polarized Murine Intestinal Epithelial Monolayer Is Mediated by M-Like Cells. *Journal of Virology 87(23): 12685–93.* https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02378-13

Gresikova-Kohutova (1959). Effect of PH on Infectivity of the Tick-Borne Encephalitis Virus. *Acta virologica 3: 159–67*. https://europepmc.org/article/med/13851762

Haddow et al. (2012). Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS neglected tropical diseases 6(2).* https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001477

Hamel et al. (2015). Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology 89(17): 8880–96*. https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00354-15

Hammer & Gutteberg (2000). Bovine Lactoferrin Is More Efficient than Bovine Lactoferricin in Inhibiting HSV-I/-II Replication in Vitro. *In lactoferrin: structure, function and applications, 239–43*. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013020597

Hasegawa et al. (1994). Inhibition with Lactoferrin of in Vitro Infection with Human Herpes virus. *Japanese Journal of Medical Science and Biology 47(2): 73–85*. https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken1952/47/2/47_2_73/_article

Hassan et al. (2022). Transmission of Yellow Fever Vaccine Virus from Breast Feeding Mothers to Their Infants: Reporting of Yellow Fever Virus (YFV) RNA Detection in Milk. https://f1000research.com/articles/11-76

Hemachudha et al. (2019). Lack of Transmission of Zika Virus Infection to Breastfed Infant. *Clinical Medicine Insights: Case Reports 12: 1179547619835179*. https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1179547619835179

Hendel et al. (2022). Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. *Frontiers in Immunology 13: 462.* https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.822867/full

Hinckley et al. (2007). Transmission of West Nile Virus Through Human Breast Milk Seems to Be Rare. *PEDIATRICS 119(3): e666–71.* https://publications.aap.org/pediatrics/article/119/3/e666/70435/Transmission-of-West-Nile-Virus-Through-Human

Holmes et al. (2006). Claudin Profiling in the Mouse during Postnatal Intestinal Development and along the Gastrointestinal Tract Reveals Complex Expression Patterns. *Gene expression patterns: GEP 6(6): 581–88*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567133X05001675?via%3Dihub

Howley (2021). Flaviviridae. *Fields Virology: Emerging Viruses, 7e.*

Hubálek et al. (2014). Arboviruses Pathogenic for Domestic and Wild Animals. *Advances in virus research 89: 201–75*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001721000057?via%3Dihub

Hubert et al. (2019). Productive Infection of Mouse Mammary Glands and Human Mammary Epithelial Cells by Zika Virus. *Viruses 11(10).* https://www.mdpi.com/1999-4915/11/10/950

Hubert et al. (2020). Evidence That Zika Virus Is Transmitted by Breastfeeding to Newborn A129 (Ifnar1 Knock-Out) Mice and Is Able to Infect and Cross a Tight Monolayer of Human Intestinal Epithelial Cells. *Frontiers in Microbiology 11.* https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.524678/full

Hubert Thèse. Tropisme et Dissémination Du Virus Zika de La Mère à l'enfant Lors de l'allaitement Maternel. http://www.theses.fr

Hunyady et al. (2000). Gastrointestinal Immunology: Cell Types in the Lamina Propria--a Morphological Review. *Acta Physiol Hung*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11732886/

Ikeda et al. (1998). Lactoferrin Markedly Inhibits Hepatitis C Virus Infection in Cultured Human Hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications 245(2): 549–53*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X98984819?via%3Dihub

Ikeda et al. (2000). Characterization of Antiviral Activity of Lactoferrin against Hepatitis C Virus Infection in Human Cultured Cells. *Virus Research 66(1): 51–63. https*://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170299001215

Inman et al. (2015). Mammary Gland Development: Cell Fate Specification, Stem Cells and the Microenvironment. *Development 142(6): 1028–42.* https://journals.biologists.com/dev/article/142/6/1028/47198/Mammary-gland-development-cell-fate-specification

Isaacs, Thormar & Pessolano (1986). Membrane-Disruptive Effect of Human Milk: Inactivation of Enveloped Viruses. *Journal of Infectious Diseases 154(6): 966–71*. https://academic.oup.com/jid/article/154/6/966/840085

Johansson et al. (2014). The Whole Iceberg: Estimating the Incidence of Yellow Fever Virus Infection from the Number of Severe Cases. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 108(8): 482–87.* https://academic.oup.com/trstmh/article/108/8/482/2765182

Jones et al. (2008). Cell-Free HTLV-1 Infects Dendritic Cells Leading to Transmission and Transformation of CD4+ T Cells. *Nature Medicine 2008 14:4 14(4): 429–36*. https://www.nature.com/articles/nm1745

Kalogianni et al. (2020). Etiology, Epizootiology and Control of Maedi-Visna in Dairy Sheep: A Review. *Animals: an Open Access Journal from MDPI 10(4): 616*. https://www.mdpi.com/2076-2615/10/4/616

Khaiboullina et al. (2019). Zika Virus Transmission through Blood Tissue Barriers. *Frontiers in Microbiology 10(JULY): 1465.* https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01465/full

Kim et al. (2017). Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. *Pharmaceuticals 10(2).* https://www.mdpi.com/1424-8247/10/2/44

Kinoshita et al. (1984). Demonstration of adult t-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. *GANN Japanese Journal of Cancer Research 75(2): 103–5.* https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6329875/

Kobayashi et al. (2019). The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology 10: 2345*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02345/full

Kohn et al. (1980). Unsaturated Free Fatty Acids Inactivate Animal Enveloped Viruses. *Archives of Virology 66(4): 301–7.* http://link.springer.com/10.1007/BF01320626

Koletzko et al. (2001). Physiological Aspects of Human Milk Lipids. *Early Human Development 65(SUPPL. 2): S3–18.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378378201002043?via%3Dihub

Koulinska et al. (2006). Transmission of Cell-Free and Cell-Associated HIV-1 through Breast-Feeding. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 41(1): 93–99.* https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0051493

Kraemer et al. (2015). The Global Distribution of the Arbovirus Vectors Aedes Aegypti and Ae. Albopictus. *eLife 4.* https://elifesciences.org/articles/08347

Kucharzik et al. (2000). Role of M Cells in Intestinal Barrier Function. *Annals of the New York Academy of Sciences 915: 171–83*. https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05240.x

Kuhn et al. (2011). Case Report: Probable Transmission of Vaccine Strain of Yellow Fever Virus to an Infant via Breast Milk. *CMAJ 183(4): E243–45.* https://www.cmaj.ca/content/183/4/E243

Lawrence & Lawrence (2004). Breast Milk and Infection. *Clinics in Perinatology 31(3): 501–28*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009551080400020X?via%3Dihub

Lee et al. (2009). Oxytocin: The Great Facilitator of Life. *Progress in neurobiology 88(2): 127–51*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030100820900046X?via%3Dihub

LeVasseur et al. (1998). Mammary Epithelial Cells Support and Transfer Productive Human T-Cell Lymphotropic Virus Infections. *Journal of human virology 1(3): 214–23*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195245

Loureiro et al. (2000). Clinicopathological Studies of a Patient With Adult T-Cell Leukemia and Pseudogynecomasty. *J. Hematol 65: 256–59.* https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1096-8652(200011)65:3%3C256::AID-AJH14%3E3.0.CO;2-V

Lozach et al. (2005). Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Non-Integrin (DC-SIGN)-Mediated Enhancement of Dengue Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. *The Journal of biological chemistry 280(25): 23698–708.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002192582067421X?via%3Dihub

Lueschow et al. (2020). The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Frontiers in Immunology 11: 587*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7145889/

Ma et al. (2021). Comparing Immunogenicity and Protective Efficacy of the Yellow Fever 17D Vaccine in Mice. *Emerging Microbes and Infections 10(1): 2279–90.* https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/22221751.2021.2008772

Mabuka et al. (2012). HIV-Specific Antibodies Capable of ADCC Are Common in Breastmilk and Are Associated with Reduced Risk of Transmission in Women with High Viral Loads. *PLoS Pathogens 8(6): e1002739.* https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002739

Macias & Hinck (2012). Mammary Gland Development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology 1(4): 533–57.* https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wdev.35

Maidji et al. (2017). Replication of CMV in the Gut of HIV-Infected Individuals and Epithelial Barrier Dysfunction. *PLoS Pathogens 13(2).* https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006202

Mann & Migliorini (1994). Delineation of the Glycosaminoglycan-Binding Site in the Human Inflammatory Response Protein Lactoferrin. *The Journal of biological chemistry 269(38): 23661–67*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089135

Mann et al. (2018). Breast Milk Transmission of Flaviviruses in the Context of Zika Virus: A Systematic Review. *Paediatric and Perinatal Epidemiology 32(4): 358–68.* https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppe.12478

Marchetti et al. (1996). Lactoferrin Inhibits Herpes Simplex Virus Type 1 Adsorption to Vero Cells. *Antiviral Research 29(2–3): 221–31*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166354295008403?via%3Dihub

Marchetti et al. (1998). Metal Complexes of Bovine Lactoferrin Inhibit in vitro Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and 2. BioMetals 11(2): 89–94. http://link.springer.com/10.1023/A:1009217709851

Marchetti et al. (1999). Inhibition of Poliovirus Type 1 Infection by Iron-, Manganese and Zinc Saturated Lactoferrin. *Medical Microbiology and Immunology 187(4): 199–204.* *https://link.springer.com/article/10.1007/s004300050093*

Marshall et al. (2009). In Vitro Multipotent Differentiation and Barrier Function of a Human Mammary Epithelium. *Cell and tissue research 335(2): 383–95.* https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-008-0719-0

Martin-Latil et al. (2007). Bax Is Activated during Rotavirus-Induced Apoptosis through the Mitochondrial Pathway. *Journal of virology 81(9): 4457–64.* https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02344-06

Medline Plus. Stomach Acid Test: MedlinePlus Medical Encyclopedia. https://medlineplus.gov/ency/article/003883.htm

Lucas et al. (2012). Transcytosis of HTLV-1 across a Tight Human Epithelial Barrier and Infection of Subepithelial Dendritic Cells. *Blood 120(3): 572–80.* https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/neu.1990.7.169

May et al. (2016). Breastfeeding and Maternal Alcohol Use: Prevalence and Effects on Child Outcomes and Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Reproductive Toxicology 63: 13–21*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623816301083

McNally & Stein (2017). Overview of Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human. *Methods in Molecular Biology 1501: 1–17*. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6475-8_1

Meier et al. (2009). A Mouse Model for Studying Viscerotropic Disease Caused by Yellow Fever Virus Infection. *PLOS Pathogens 5(10): e1000614.* https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000614

Miclat, Hodgkinson & Marx (1978). Neonatal Gastric PH. A*nesthesia and analgesia 57(1): 98–101.* https://journals.lww.com/anesthesia-analgesia/Abstract/1978/01000/Neonatal_Gastric_pH.18.aspx

Mier-Y-Teran-Romero et al. (2018). Guillain-Barré Syndrome Risk among Individuals Infected with Zika Virus: A Multi-Country Assessment. https://doi.org/10.1186/s12916-018-1052-4

Millen et al. (2022). Milk Transmission of HTLV-1 and the Need for Innovative Prevention Strategies. *Frontiers in Medicine 9: 651.* https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.867147/full

Molès et al. (2017a) Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatr Allergy Immunol. 2018; 29: 133– 143*. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pai.12841

Molès et al. (2017b) Breastfeeding-related maternal microchimerism. *Nat Rev Immunol 17, 729.* https://www.nature.com/articles/nri.2017.115#citeas

Monath et al. (2003). Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever. *Advances in Virus Research 60: 343–95.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352703600096?via%3Dihub

Moriuchi et al. (2001). A Milk Protein Lactoferrin Enhances Human T Cell Leukemia Virus Type I and Suppresses HIV-1 Infection. *The Journal of Immunology 166(6): 4231–36.* http://www.jimmunol.org/content/166/6/4231http://www.jimmunol.org/content/166/6/4231.full#ref-list-1

Moriuchi et al. (2006). Induction of Lactoferrin Gene Expression in Myeloid or Mammary Gland Cells by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Tax: Implications for Milk-Borne Transmission of HTLV-1. *Journal of Virology 80(14): 7118–26*. https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00409-06

Müller et al. (2016). Inactivation and Environmental Stability of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases 22(9): 1685–87.* https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/9/16-0664_article

Narayan et al. (1985). Lentiviral Diseases of Sheep and Goats: Chronic Pneumonia Leukoencephalomyelitis and Arthritis. *Reviews of infectious diseases 7(1): 89–98*. https://academic.oup.com/cid/article/7/1/89/483875

Newberry et al. (2016). Anatomy and Function of the Gut Immune System. *Encyclopedia of Immunobiology 3: 427–33.* https://profiles.wustl.edu/en/publications/anatomy-and-function-of-the-gut-immune-system

Ng et al. (2001). Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase, Protease and Integrase by Bovine Milk Proteins. *Life Sciences 69(19): 2217–23*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002432050101311X?via%3Dihub

Ng et al. (2015). Applied Microbiology and Biotechnology Antiviral Activities of Whey Proteins. Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-6818-4

Nguyen et al. (2019). Clonal Analysis of Mouse Mammary Luminal Epithelial Cell Transplants. *Stem Cells and Development 28(5): 353.* https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2018.0158

Orr et al. (2019). Alteration in the MRNA Expression of Genes Associated with Gastrointestinal Permeability and Ileal TNF-α Secretion Due to the Exposure of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Journal of Nanobiotechnology 17(1): 1–10.* https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-019-0499-6

Ouzilou et al. (2002). Poliovirus Transcytosis through M-like Cells. *Journal of General Virology 83(9): 2177–82*. http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-83-9-2177

PAHO (2016). Timeline of Emergence of Zika Virus in the Americas. https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11959:timeline-of-emergence-of-zika-virus-in-the-americas&Itemid=41711&lang=fr#gsc.tab=0

Parisi et al. (2022). Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) and MMTV-like Viruses: An In-Depth Look at a Controversial Issue. *Viruses 2022, Vol. 14, Page 977 14(5): 977*. https://www.mdpi.com/1999-4915/14/5/977/htm

Pellacani et al. (2019). Transcriptional regulation of normal human mammary cell heterogeneity and its perturbation in breast cancer. *The EMBO Journal*. https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.2018100330

Percher et al. (2016). Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. *Viruses 8(2): 40.* https://www.mdpi.com/1999-4915/8/2/40

Perera-Lecoin et al. (2014). Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses 6(1): 69*. https://www.mdpi.com/1999-4915/6/1/69

Perrier et al. (2011). Gut Permeability and Food Allergies. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 41(1): 20–28.* https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2222.2010.03639.x

Pfaender et al. (2013). Inactivation of Hepatitis C Virus Infectivity by Human Breast Milk. *Journal of Infectious Diseases 208(12): 1943–52*. https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jit519

Pfaender et al. (2017). Inactivation of Zika Virus in Human Breast Milk by Prolonged Storage or Pasteurization. *Virus Research 228: 58–60.* https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170216306542

Phillips et al. (2014). SLUG: Critical Regulator of Epithelial Cell Identity in Breast Development and Cancer. *Cell Adhesion & Migration 8(6): 578.* https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/19336918.2014.972740

Pietrantoni et al. (2015). Bovine Lactoferrin Inhibits Toscana Virus Infection by Binding to Heparan Sulphate. *Viruses 7(2): 480–95.* https://www.mdpi.com/1999-4915/7/2/480

Pogodina (1958). The Resistance of Tick-Borne Encephalitis Virus to the Effects of Gastric Juice. *Problems of Virology 3(5/6): 295–99*. https://www.semanticscholar.org/paper/%5BResistance-of-tick-borne-encephalitis-virus-to-Pogodina/1e26f756adcb9361d26b811755525af2fde7a310

Prendergast et al. (2019). Transmission of CMV, HTLV-1, and HIV through Breastmilk. *The Lancet Child and Adolescent Health 3(4): 264–73.* https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352464219300240?via%3Dihub

Primo et al. (2013). Efeitos Da Nicotina Materna Na Criança Em Amamentação. *Revista Paulista de Pediatria 31(3): 392–97*. https://www.scielo.br/j/rpp/a/8ypbbPhTtPFpY47yQnjbCnJ/?lang=pt

Puddu et al. (1998). Antiviral Effect of Bovine Lactoferrin Saturated with Metal Ions on Early Steps of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology 30(9): 1055–63.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272598000661?via%3Dihub

Regla-Nava et al. (2019). Detection of Zika Virus in Mouse Mammary Gland and Breast Milk. *PLoS Neglected Tropical Diseases 13(2): e0007080*. http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007080

Ren et al. (2021). Loss of Nitric Oxide Induces Fibrogenic Response in Organotypic 3D Co-Culture of Mammary Epithelia and Fibroblasts-An Indicator for Breast Carcinogenesis. *Cancers 13(11).* https://www.mdpi.com/2072-6694/13/11/2815

Ribeiro et al. (2020). Detection of Wild-Type Yellow Fever Virus in Breast Milk. *The Pediatric infectious disease journal 39(1): 68–69.* https://journals.lww.com/10.1097/INF.0000000000002496

Rigourd et al. (2020). Role of Daily Milk Volume and Period of Lactation in Nutrient Content of Human Milk: Results from a Prospective Study. *Nutrients 2020, Vol. 12, Page 421 12(2): 421*. https://www.mdpi.com/2072-6643/12/2/421/htm

Ross (2010). Mouse Mammary Tumor Virus Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses 2(9): 2000*. https://www.mdpi.com/1999-4915/2/9/2000

Sabbatani & Fiorino. La Febbre Amarilla Yellow Fever. *Le Infezioni in Medicina, n. 2, 129-141, 2007*. https://www.infezmed.it/media/journal/Vol_15_2_2007_9.pdf

Santiana et al. (2018). Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-Organismal Viral Transmission. *Cell Host and Microbe 24(2): 208-220.e8*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312818303767?via%3Dihub

Santos-Silva et al. (2022). Detection of Hepatitis E Virus in Milk: Current Evidence for Viral Excretion in a Wide Range of Mammalian Hosts. *Transboundary and Emerging Diseases*. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tbed.14683

Seganti et al. (2004). Antiviral Activity of Lactoferrin towards Naked Viruses. *Biometals 2004 17:3 17(3): 295–99.* https://link.springer.com/article/10.1023/B:BIOM.0000027708.27142.bc

Sharif al et al. (2020). Extracellular Vesicles in HTLV-1 Communication: The Story of an Invisible Messenger. *Viruses 12(12).* https://www.mdpi.com/1999-4915/12/12/1422

Sheridan & Lefrançois (2010). Intraepithelial Lymphocytes: To Serve and Protect. *Current gastroenterology reports 12(6): 513*. https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-010-0148-6

Shimojima et al. (2014). Distinct Usage of Three C-Type Lectins by Japanese Encephalitis Virus: DC-SIGN, DC-SIGNR, and LSECtin. *Archives of Virology 159(8): 2023*. https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-014-2042-2

Siciliano et al. (1999). Bovine Lactoferrin Peptidic Fragments Involved in Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications 264(1): 19–23*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X99913189?via%3Dihub

Silva et al. (2020). Dengue and Zika Viruses: Epidemiological History, Potential Therapies, and Promising Vaccines. *Tropical Medicine and Infectious Disease 2020, Vol. 5, Page 150 5(4): 150*. https://www.mdpi.com/2414-6366/5/4/150/htm

Siqueira Mello et al. (2019). Development of Secondary Microcephaly After Delivery: Possible Consequence of Mother-Baby Transmission of Zika Virus in Breast Milk. *American Journal of Case Reports 20: 723–25. https://amjcaserep.com/abstract/index/idArt/915726*

Siziba et al. (2019). Changes in Human Milk Fatty Acid Composition during Lactation: The Ulm SPATZ Health Study. *Nutrients 2019, Vol. 11, Page 2842 11(12): 2842.* https://www.mdpi.com/2072-6643/11/12/2842/htm

Sleeman et al. (2006). CD24 Staining of Mouse Mammary Gland Cells Defines Luminal Epithelial, Myoepithelial/Basal and Non-Epithelial Cells. *Breast cancer research: BCR 8(1*). https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1371

Sotelo et al. (2017). Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy. *Emerging infectious diseases 23(5): 856–57*. https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/5/16-1538_article

Southern & Southern (1998). Persistent HTLV-I Infection of Breast Luminal Epithelial Cells: A Role in HTLV Transmission. *Virology 241(2): 200–214.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682297989789

Srinivasan et al. (2015). TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *Journal of Laboratory Automation 20(2): 107–26*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2472630322014613?via%3Dihub

Superti et al. (1997).nAntirotaviral Activity of Milk Proteins: Lactoferrin Prevents Rotavirus Infection in the Enterocyte-like Cell Line HT-29. *Medical microbiology and immunology 186(2–3): 83–91.* https://link.springer.com/article/10.1007/s004300050049

Swart et al. (1996). Antiviral Effects of Milk Proteins: Acylation Results in Polyanionic Compounds with Potent Activity against Human Immunodeficiency Virus Types 1 and 2 in Vitro. *AIDS Research and Human Retroviruses 12(9): 769–75*. https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/aid.1996.12.769

Swart et al. (1999). Charge Modification of Plasma and Milk Proteins Results in Antiviral Active Compounds. *Journal of Peptide Science 5(12): 563–76*. http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291099-1387%28199912%295%3A12%3C563%3A%3AAID-PSC226%3E3.0.CO%3B2-3

Takahashi et al. (2008). Nonhuman Primate Intestinal Villous M-like Cells: An Effective Poliovirus Entry Site. *Biochemical and biophysical research communications 368(3): 501–7*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X08001563?via%3Dihub

Thormar et al. (1987). Inactivation of Enveloped Viruses and Killing of Cells by Fatty Acids and Monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy 31(1): 27–31*. https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.31.1.27

Traiber et al. (2011). Infant Meningoencephalitis Probably Caused by Yellow Fever Vaccine Virus Transmitted via Breastmilk. *Jornal de Pediatria 0(0): 0–0*. http://jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=2168&cod=&idSecao=1

Trend et al. (2015). Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PLOS ONE 10(8): e0135580*. https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0135580

Université de Californie, USA. Medicine LibreTexts. Anatomy of the Digestive System. *Medicine LibreTexts*

https://med.libretexts.org/Bookshelves/Anatomy_and_Physiology/Book%3A_Anatomy_and_Physiology_(Boundless)/22%3A_Digestive_System/22.01%3A_Overview_of_the_Digestive_System/22.1A%3A_Anatomy_of_the_Digestive_System

Université de Vigo, Espagne. Cell Types. Enterocyte. Atlas of Plant and Animal Histology. https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/8-tipos-celulares/enterocito.php

Uwaezuoke et al. (2017). Relationship Between Exclusive Breastfeeding and Lower Risk of Childhood Obesity: A Narrative Review of Published Evidence. *Clinical Medicine Insights. Pediatrics 11: 117955651769019*. https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1179556517690196

Van Berkel et al. (1997). N-Terminal Stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of Human Lactoferrin Is Essential for Binding to Heparin, Bacterial Lipopolysaccharide, Human Lysozyme and DNA. *Biochemical Journal 328(1): 145–51*. https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/328/1/145/92346/N-terminal-stretch-Arg2-Arg3-Arg4-and-Arg5-of?redirectedFrom=fulltext

Van de Perre et al. (2012). HIV-1 Reservoirs in Breast Milk and Challenges to Elimination of Breast-Feeding Transmission of HIV-1. *Science Translational Medicine 4(143).* https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3003327

Van de Perre et al. (2021). Revisiting Koch's Postulate to Determine the Plausibility of Viral Transmission by Human Milk. *Pediatric Allergy and Immunology*. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pai.13473

Van den Broek et al. (1995). Immune Defence in Mice Lacking Type I and/or Type II Interferon Receptors. *Immunological reviews 148(1): 5–18.* https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.1995.tb00090.x

Van den Elsen et al. (2021). Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses*. https://www.mdpi.com/1999-4915/13/6/956

Veltmaat et al. (2013). Positional Variations in Mammary Gland Development and Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 18(2): 179* https://link.springer.com/article/10.1007/s10911-013-9287-3

Victor et al. (2017). Microcephaly Prevalence in Infants Born to Zika Virus-Infected Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecular Sciences*. www.mdpi.com/journal/ijms

Visvader (2009). Keeping Abreast of the Mammary Epithelial Hierarchy and Breast Tumorigenesis. *Genes & Development 23(22): 2563.* https://genesdev.cshlp.org/content/23/22/2563

Waarts et al. (2005). Antiviral Activity of Human Lactoferrin: Inhibition of Alphavirus Interaction with Heparan Sulfate. *Virology 333(2): 284–92*. h https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682205000176?via%3Dihub

Wahl et al. (2012). Human Breast Milk and Antiretrovirals Dramatically Reduce Oral HIV-1 Transmission in BLT Humanized Mice. *PLoS Pathogens 8(6): e1002732*. https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002732

Weaver & Reisen (2010). Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Research 85(2): 328–45*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354209004951?via%3Dihub

Welsh et al. (1978). Use of Semliki Forest Virus to Identify Lipid-Mediated Antiviral Activity and Anti-Alphavirus Immunoglobulin A in Human Milk. *Infection and Immunity 19(2): 395–401*. https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.19.2.395-401.1978

Whitman (1939). Failure of Aëdes Aegypti to Transmit Yellow Fever Cultured Virus (17D). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene s1-19(1): 19–26*. https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/s1-19/1/article-p19.xml

Wiktor et al. (1997). Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I Associated with Prolonged Breast-Feeding. *Journal of human virology 1(1): 37–44*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195229

Witkowska-Zimny (2017). Cells of Human Breast Milk. *Cellular and Molecular Biology Letters 22(1): 1–11*. https://cmbl.biomedcentral.com/articles/10.1186/s11658-017-0042-4

Worthington (2015). The Intestinal Immunoendocrine Axis: Novel Cross-Talk between Enteroendocrine Cells and the Immune System during Infection and Inflammatory Disease. *Biochemical Society Transactions 43(4): 727–33*. https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/43/4/727/88727/The-intestinal-immunoendocrine-axis-novel-cross

Wu et al. (2011). Transmission of Murine Cytomegalovirus in Breast Milk: A Model of Natural Infection in Neonates. *Journal of Virology 85(10): 5115–24.* http://jvi.asm.org/

Yadav et al. (2019). Zika Virus Outbreak in Rajasthan, India in 2018 Was Caused by a Virus Endemic to Asia. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 69: 199–202.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134819300048?via%3Dihub

Yan et al. (2020). A Yellow Fever Virus 17D Infection and Disease Mouse Model Used to Evaluate a Chimeric Binjari-Yellow Fever Virus Vaccine. *Vaccines 8(3): 1–14*. https://www.mdpi.com/2076-393X/8/3/368

Wikidata. Yellow Fever; History of the Disease in the Eighteenth and Nineteenth Century. https://www.wikidata.org/wiki/Q41003679

WHO 1983. Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Diseases : Report of a WHO Scientific Group [meeting Held in Geneva from 28 February to 4 March 1983] https://apps.who.int/iris/handle/10665/39922

WHO 2017. Global Burden of Major Vector-Borne Diseases, as of March 2017. *Global Vector Control Response 2017-2030 (March): 2*. http://www.who.int/vector-control/burden_vector-borne_diseases.pdf

WHO 2016. WHO Director-General Summarizes the Outcome of the Emergency Committee Regarding Clusters of Microcephaly and Guillain-Barré Syndrome. https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barr%C3%A9-syndrome

WHO Breastfeeding. https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_2

WHO - Disease Outbreak News. https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news

WHO 2022. Zika Epidemiology Update - February 2022. https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update---february-2022

Yellow et al. (2022). Yellow Fever: Roles of Animal Models and Arthropod Vector Studies in Understanding Epidemic Emergence. *Microorganisms 2022, Vol. 10, Page 1578 10(8): 1578*. https://www.mdpi.com/2076-2607/10/8/1578/htm

Yi et al. (1997). Hepatitis C Virus Envelope Proteins Bind Lactoferrin. *Journal of virology 71(8): 5997–6002.* https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.71.8.5997-6002.1997

Yu et al. (2014). Tick-Borne Encephalitis Virus Replication, Intracellular Trafficking, and Pathogenicity in Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *PLoS ONE 9(5).* https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096957

Zachos et al. (2016). Human Enteroids/Colonoids and Intestinal Organoids Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology. *The Journal of Biological Chemistry 291(8): 3759.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820436877?via%3Dihub

Zanluca et al. (2015). First Report of Autochthonous Transmission of Zika Virus In The Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 110(4): 569*. https://www.scielo.br/j/mioc/a/XpyZfLm7yZbBckwwqWjWxnz/?lang=en

Zhang et al. (2022). An in Vitro Human Mammary Epithelial Cell Permeability Assay to Assess Drug Secretion into Breast Milk. *International journal of pharmaceutics: X 4.* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590156722000111?via%3Dihub

Zhou et al. (2009). Intestinal Membrane Permeability and Hypersensitivity In the Irritable Bowel Syndrome. *Pain 146(1–2): 41*. https://journals.lww.com/pain/Abstract/2009/11000/Intestinal_membrane_permeability_and.12.aspx

Zou et al. (1992). Heparin-Binding Properties of Lactoferrin and Lysozyme. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and 103(4): 889–95*. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030504919290210I?via%3Dihub

Annexes

Ci-après sont présentés les articles scientifiques publiés dans la littérature au cours de ces travaux de thèse.

viruses

MDPI

Review

Mother-to-Child Transmission of Arboviruses during Breastfeeding: From Epidemiology to Cellular Mechanisms

Sophie Desgraupes [1,2,3,*], Mathieu Hubert [1,2,3], Antoine Gessain [1,2,3], Pierre-Emmanuel Ceccaldi [1,2,3] and Aurore Vidy [1,2,3,*]

1 Unité Épidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, Département Virologie, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; mathieu.hubert@pasteur.fr (M.H.); antoine.gessain@pasteur.fr (A.G.); pierre-emmanuel.ceccaldi@pasteur.fr (P.-E.C.)
2 Université de Paris, 75013 Paris, France
3 UMR Centre National de la Recherche Scientifique 3569, Institut Pasteur, 75015 Paris, France
* Correspondence: sophie.desgraupes@pasteur.fr (S.D.); aurore.vidy@pasteur.fr (A.V.)

Abstract: Most viruses use several entry sites and modes of transmission to infect their host (parenteral, sexual, respiratory, oro-fecal, transplacental, transcutaneous, etc.). Some of them are known to be essentially transmitted via arthropod bites (mosquitoes, ticks, phlebotomes, sandflies, etc.), and are thus named arthropod-borne viruses, or arboviruses. During the last decades, several arboviruses have emerged or re-emerged in different countries in the form of notable outbreaks, resulting in a growing interest from scientific and medical communities as well as an increase in epidemiological studies. These studies have highlighted the existence of other modes of transmission. Among them, mother-to-child transmission (MTCT) during breastfeeding was highlighted for the vaccine strain of yellow fever virus (YFV) and Zika virus (ZIKV), and suggested for other arboviruses such as Chikungunya virus (CHIKV), dengue virus (DENV), and West Nile virus (WNV). In this review, we summarize all epidemiological and clinical clues that suggest the existence of breastfeeding as a neglected route for MTCT of arboviruses and we decipher some of the mechanisms that chronologically occur during MTCT via breastfeeding by focusing on ZIKV transmission process.

Keywords: arboviruses; mother-to-child transmission; breastfeeding; breast milk; intestinal epithelium; mammary epithelium; Zika virus; yellow fever virus; dengue virus; Chikungunya virus; West Nile virus; barrier crossing mechanisms; viral transmission

check for updates

Citation: Desgraupes, S.; Hubert, M.; Gessain, A.; Ceccaldi, P.-E.; Vidy, A. Mother-to-Child Transmission of Arboviruses during Breastfeeding: From Epidemiology to Cellular Mechanisms. *Viruses* **2021**, *13*, 1312. https://doi.org/10.3390/v13071312

Academic Editors: Bas B. Oude Munnink, Marietjie Venter and Luisa Barzon

Received: 22 April 2021
Accepted: 30 June 2021
Published: 7 July 2021

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

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

1. Introduction: Arboviruses, Breastfeeding, and Milk-Borne Viruses

In 1881, Carlos Finlay was the first to hypothesize that a virus, especially yellow fever virus (YFV), was able to be transmitted by mosquitoes [1]. As a revolution in the virology field, Finlay's hypothesis was furthermore confirmed in 1900. Thereafter, other viruses were found to be transmitted by mosquitoes and other arthropods, such as ticks, phlebotomes, or sandflies. In this context, the World Health Organization (WHO) [2] defined in 1967 arthropod-borne viruses or "arboviruses" as viruses that are naturally maintained through biological transmission between susceptible vertebrate hosts by hematophagous arthropods. Nowadays, more than 500 arboviruses have been identified, belonging to different viral families and orders (*Flaviviridae, Togaviridae, Rhabdoviridae, Reoviridae, Bunyavirales*) but sharing the characteristic of being transmitted by arthropod vectors. About 20% of them are known to be pathogenic for humans [3].

In humans, arbovirus infections are essentially characterized by an asymptomatic carriage or the development of mild non-specific symptoms such as fever, rash, arthralgia, myalgia, or conjunctivitis [4]. More specifically, some arboviruses can also cause severe symptoms such as brain disorders (West Nile virus (WNV), tick-borne encephalitis virus (TBEV), Zika virus (ZIKV), etc.), hemorrhagic fevers (Crimea-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), YFV, dengue virus (DENV), etc.) [5], and/or severe arthritis (Chikungunya

virus (CHIKV), Sindbis virus (SINV), Ross River virus (RRV), etc.) [6]. Although arboviruses are transmitted via arthropod bites, other modes of transmission have been highlighted during the last ten years.

Since ZIKV infections of pregnant women were revealed to be associated with severe outcomes in fetuses (called congenital Zika syndromes (CZS)), mother-to-child transmission (MTCT) of arboviruses must be further studied. MTCT of arboviruses could occur before (antenatal or congenital), during (perinatal), and after (post-natal) delivery. While prenatal MTCT of arboviruses and underlying mechanisms are nowadays well studied, especially for ZIKV, perinatal and post-natal transmissions remain understudied. Perinatal transmission of arboviruses to newborns could occur during delivery in case of lesions that allow blood exchanges between a viremic mother and her infant. Nowadays, perinatal transmission of arboviruses during delivery is considered low but has not really been investigated.

In this review, we focus on post-natal transmission of arboviruses during breastfeeding and the associated mechanisms.

Breastfeeding is defined as a post-natal continuum of the link between the mother and the child. In opposition to the prenatal link of the mother–fetus dyad ensured by blood exchanges through the placenta, the post-natal link between the mother and her newborn(s) during breastfeeding is not systematic. This cultural practice is heterogeneously distributed across the world: according to UNICEF, 20% of children who live in high income countries never receive breast milk, against only 4% in low and middle income countries.

The WHO recommends to initiate breastfeeding within the first hour of life and keep exclusively breastfeeding during the first six months to a year of life, depending on the newborn's and mother's needs. Breastfeeding has been shown to provide many benefits to the newborns. Not only does it meet the infant's nutritional needs by providing energy and nutrients, but it also promotes cognitive development and protects the newborn against infectious and chronic diseases [7]. In order to meet the changing needs of the infant as it grows, the composition of breast milk evolves between the first hours and weeks after delivery. The first milk, called colostrum, plays an essential role in the post-natal maternal immunity transfer as it is rich in blood factors such as maternal immune cells. As the colostrum's composition in lactose and lipids increases, the milk becomes more nutritious and is first called "transitional", then "mature" [8].

Although breast milk provides the newborn with nutritious, developmental, and protective factors, it can also transmit deleterious chemical agents from the maternal bloodstream such as nicotine [9], alcohol [10], and drugs [11], or pathogens such as bacteria or viruses [12]. Historically, the first milk-borne virus identified was the Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) [13]. Since then, three viruses were recognized to be efficiently transmitted from mother to child during breastfeeding in humans, resulting in a chronic infection in the newborn: cytomegalovirus (CMV), human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) [12,14]. Because components of other viruses were detected in the colostrum and the breast milk (infectious viral particles, viral genome, viral proteins), questions concerning the potential transmission of other viruses during breastfeeding have been raised. Several arboviruses have been detected in breast milk of infected mothers, raising alarm concerning the risk of transmission of arboviruses to newborns during breastfeeding [15–25].

2. Epidemiological and Clinical Aspects of Milk-Borne Arboviruses

Several arboviruses have been described as being excreted in breast milk. In most cases, only the viral genome was detected, but isolation of infectious particles from some samples raises important questions regarding the risk of transmission to the infant through breastfeeding. To date, the presence of four flaviviruses (WNV, DENV, YFV, ZIKV) and one alphavirus (CHIKV) have been reported in colostrum and/or human breast milk (Table 1).

CHIKV—After returning from a region endemic for CHIKV, DENV, and ZIKV, a 28-year-old woman developed non-specific symptoms such as rashes and headaches with

asthenia [15]. Three days after the onset of symptoms, only CHIKV infection was confirmed by RT-PCR. CHIKV viral genome was also detected in breast milk 3 and 23 days after the onset of symptoms, including after viral clearance from the bloodstream, demonstrating viral persistence of CHIKV in breast milk. Breastfeeding of the 3-month-old infant was interrupted as soon as the symptoms appeared, thus avoiding infection of the baby.

DENV—The viral genome of DENV has been detected in breast milk of infected women from the first day to 14 days after onset of symptoms. The viral excretion kinetics of DENV in breast milk of infected women was monitored a few days before or after delivery during a dengue epidemic in New Caledonia (December 2012 to October 2013) [16]. Unlike viremia, whose representative curve over time has the appearance of a peak, the viral excretion of DENV RNA in breast milk is characterized by a plateau associated with prolonged detection of the viral genome 18 days after birth [16]. In this study, neonatal infection associated with lack of viremia in umbilical cord blood suggests potential transmission through breast milk. In another study, infectious particles of DENV were isolated from breast milk, and MTCT of DENV during breastfeeding was strongly suggested in an infant with DENV infection after being breastfed by an infected woman [18].

WNV—On 2 September 2002, a 40-year-old woman gave birth and received two red blood cell concentrates from a donor, later diagnosed as infected with WNV. Thirteen days later, anti-WNV-specific immunoglobulins M (IgM) were detected in the cerebrospinal fluid (CSF), confirming mother's infection with WNV. At day 16, WNV genome was detected in her breast milk. Since breastfeeding was started on the day of birth, molecular and serological diagnosis tests were performed on the infant, and no viral RNA was detected but WNV-specific IgM were present [19]. The viral genome of WNV was also detected in the colostrum of other women who had been infected before delivery [20].

YFV—Following vaccination against yellow fever, three cases of MTCT of the YFV 17DD vaccine strain via breastfeeding were suspected [22], of which one case was confirmed [21]. On 7 April 2009, a 22-year-old woman who gave birth by caesarean section went to the hospital for post-surgical intervention and received the vaccine strain 17DD of YFV because of the endemic context of yellow fever in Brazil. From 15 April, 23 days after delivery, the breastfed infant developed fever accompanied by increasingly frequent and intense convulsions. On 19 April, viral RNA from the 17DD strain as well as YFV-specific IgM were detected in the cerebrospinal fluid (CSF) of the infant. Although the breast milk was not tested, transmission of the YFV vaccine strain 17DD by breastfeeding was confirmed following sequencing of the isolate from the infant's CSF. Although the presence of the 17DD vaccine strain was not investigated in breast milk, it was found that wild-type YFV is excreted in breast milk four days after the onset of symptoms [26]. The transmission of the 17DD vaccine strain to infants through breastfeeding was accompanied by severe neurological pathogenicity, forcing authorities to contraindicate vaccination against yellow fever during breastfeeding.

ZIKV—Due to the amplitude of recent ZIKV outbreaks, especially in Latin America in 2015–2016, the WHO declared a public health emergency of international concern (PHEIC) and more studies were conducted on ZIKV. The viral genome of ZIKV has been detected in the breast milk of several infected women [17,22,23,25,27–32]. This was quantified in several studies, revealing substantial viral loads ($2.9.10^4$ to $2.4.10^6$ copies/mL) [17,25,27], significantly higher than those detected in the blood circulation (0 to $7.0.10^4$ copies/mL) [22]. Large viral loads were mostly detected in breast milk between 3 and 5 days after the onset of symptoms, however they could also persist far longer [17,30] and even after viral clearance from the blood stream [17,27]. Thus, Sotelo et al. found a viral excretion of ZIKV in breast milk 14 days ($2.4.10^6$ copies/mL), 23 days, and more than 30 days ($2.2.10^5$ copies/mL) after the onset of symptoms, demonstrating the ability of ZIKV to persist in this biological fluid and to be excreted during lactation [17]. The presence of infectious particles in breast milk has also been repeatedly demonstrated in both colostrum and breast milk [17,23,25,28] but, to our knowledge, the viral titer was never determined. Among the studies reporting the presence of viral genome and/or infectious particles in breast milk, four cases of

probable transmission of ZIKV from mother to infant through breast milk have been found [23,27,31]. The newborns' infections were demonstrated either by positive RT-qPCR in serum and urine/saliva samples, or by the development of secondary microcephaly (post-natal microcephaly) by one infant. Although vector-borne transmission can never be excluded, one case [24] of ZIKV transmission to a newborn strongly suggests transmission during breastfeeding as ZIKV vRNAs extracted from breast milk of the infected mother and urine of the 5-month-old infant showed sequence identity to 99% [23,24]. In addition, the advanced age of the infant (5 months) and the fact that he was sheltered from potential vectors (air-conditioned housing) strengthen the plausibility of this mode of transmission. Viral transmission during breastfeeding could therefore have been involved in the increase of infected infants during the ZIKV epidemic in Latin America (2015–2016), though any quantitation is impossible due to mosquito vectors pervasiveness.

Table 1. Epidemiological and clinical evidence of milk-borne arboviruses.

Virus	Genus	Evidence of MTCT during Breastfeeding	References
CHIKV	*Alphavirus*	• Viral genome detected in breast milk 3 and 23 days after symptom onset. • Persistence in breast milk after viral clearance from the blood stream.	[15]
DENV	*Flavivirus*	• Viral genome detected in breast milk 1 to 14 days after symptom onset. • Persistence of viral genome in breast milk. • Infection of breastfed newborn but absence of viremia in umbilical cord blood.	[16]
		• Viral genome and infectious viral particles in breast milk. • Infection of breastfed newborns (while absence of viremia in umbilical cord blood of one of them).	[18]
WNV	*Flavivirus*	• Viral genome detected in breast milk 16 days after transfusion.	[19]
		• Viral genome detected in colostrum.	[20]
YFV	*Flavivirus*	• Vaccination of breastfeeding mothers after delivery led to the presence of viral genome in their infant's CSF.	[21,22]
		• Vaccination of breastfeeding mothers after delivery led to the development of meningoencephalitis by her newborn.	[33,34]
		• Viral genome of wild-type YFV detected in breast milk.	[26]
ZIKV	*Flavivirus*	• Viral genome and infectious particles detected in breast milk. • Persistence up to 33 days after symptom onset. • Persistence after clearance from the blood stream. • No transmission to the newborn but breastfeeding was avoided.	[17]
		• Viral genome and infectious particles detected in breast milk. • Transmission unclear (the only serum sample tested gave ambiguous results).	[25]

Table 1. *Cont.*

Virus	Genus	Evidence of MTCT during Breastfeeding	References
		• Viral genome and infectious particles detected in breast milk. • Transmission to the newborn (RT-qPCR+: serum and urine). • Limited contact of the newborn with the exterior. Air-conditioned house. • 99% of sequence identity between mother's breast milk and infant's urine isolates.	[23,24]
		Case 1: • Viral genome but no infectious particles detected in breast milk (day 5 post-symptom onset). • Transmission to the newborn (RT-qPCR+: serum and saliva). Case 2: • Viral genome but no infectious particles detected in breast milk (day 5 post-symptom onset). • Persistence after clearance from the blood stream. • Transmission to the newborn (RT-qPCR+: serum and urine).	[27,35]
		Case 1: • Viral genome and infectious particles detected in breast milk. • No transmission to the newborn (RT-qPCR-: urine). Cases 2–3–4: • No viral genome in breast milk.	[28]
		• Viral genome detected in breast milk. • Persistence? Mother presented symptoms at 9 weeks of gestation but viral genome detected 2 days post-delivery. • Sequences of mother's breast milk and infant's urine clustered together.	[30]
		• Viral genome detected in breast milk. • Transmission to the newborn? (development of secondary microcephaly. But RT-qPCR-: serum).	[31]
		• Viral genome detected in breast milk. • No transmission to the newborn (RT-qPCR-: urine).	[32]

Abbreviations: Chikungunya virus (CHIKV), Dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV), Yellow fever virus (YFV), Zika virus (ZIKV), Cerebrospinal fluid (CSF), Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR).

Thus, MTCT of arboviruses, although difficult to demonstrate, has so far been confirmed for YFV and strongly suggested for ZIKV. As breastfeeding is essential for the development and survival of infants in many underdeveloped countries, abstinence from this practice due to maternal viral infection can be fatal for the infant. Therefore, it is necessary to understand the molecular and cellular mechanisms involved in the transmission of these viruses during breastfeeding in order to propose appropriate therapeutic strategies while maintaining the breastfeeding process.

3. Mother-to-Child Transmission of Arboviruses during Breastfeeding and Underlying Mechanisms

Conceptually, three main steps chronologically occur during MTCT of viruses during breastfeeding (Figure 1). First, viral tropism and/or dissemination to the mother's mammary glands is a prerequisite for the virus to be excreted in breast milk. Then, viral

particles need to cross the mammary epithelium to be delivered into the breast milk. Mechanisms involved in the productive infection of epithelial cells, their associated secretory machinery as well as the physiology of the blood–milk barrier are important elements to better understand this first step. Secondly, sufficient structural stability and persistence of viral infectivity in breast milk need to be guaranteed for a virus to be transmitted during breastfeeding. The efficiency of several treatments of contaminated breast milk (pasteurization, freezing, etc.) to decrease viral infectivity are also addressed. Third, transmissibility of milk-borne arboviruses to the breastfed newborn relies on the ability of the virus to cross anatomical epithelial barriers of the tonsillar, respiratory, and/or gastro-intestinal tracts. Identification of entry sites and facilitating factors could help to implement prevention strategies. Since MTCT of arboviruses during breastfeeding has been neglected for a long time, we emphasized this section on ZIKV, for which data were obtained in our laboratory and others.

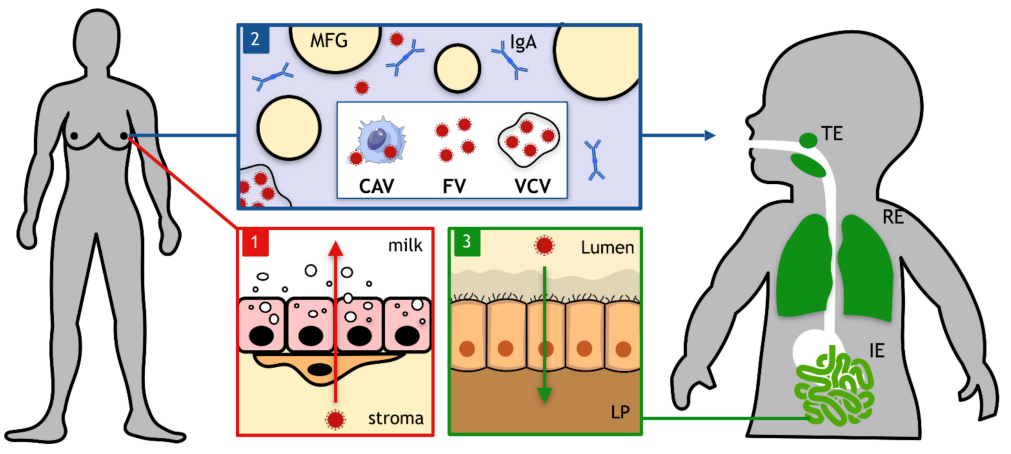


Figure 1. A chronology of the three main events occurring during viral mother-to-child transmission by breastfeeding. The first event consists of viral dissemination to mother's mammary glands where viral infectious entities need to cross the mammary epithelium to be excreted in breast milk (red box). Then, viral infectious entities that could be either cell-associated viruses (CAVs), free viruses (FVs) or vesicle-cloaked viruses (VCVs) transit in breast milk in the presence of diverse components such as milk fat globules (MFGs) or immunoglobulins A (IgA). At this stage, conservation of viral infectivity needs to be ensured in breast milk (blue box). Finally, viral infectious entities can cross tonsillar (TE), respiratory (RE), and/or intestinal (IE) epithelia to infect the breastfed newborn. As an example, viral infectious entities present in the small intestine's lumen need to cross the monostratified intestinal epithelium to reach the lamina propria (LP) (green box).

Step 1. Viral dissemination to mammary glands and excretion in breast milk.

The mammary gland structure and cell—The presence of mammary glands is an exclusive characteristic of mammals. Unlike other organs, they develop both before and after birth and undergo numerous structural and functional changes during the life of female mammals, making them a dynamic organ. As exocrine glands, their main function is to produce and excrete breast milk [36].

Like most organs, the mammary glands are made up of different cell types (stem cells, epithelial cells, fibroblasts, adipocytes, endothelial cells, immune cells, neural cells) participating in the structure and function of the organ [36]. Epithelial cells form a ramified milk-producing structure that is anchored in a mass of fibro-adipose connective tissue, the mammary stroma, which is composed of fibroblasts and adipocytes (Figure 2). Endothelial, immune, and neural cells are primarily involved in the vascular supply, lymphatic

drainage, and innervation of the mammary glands, and are essential for their development and functioning.

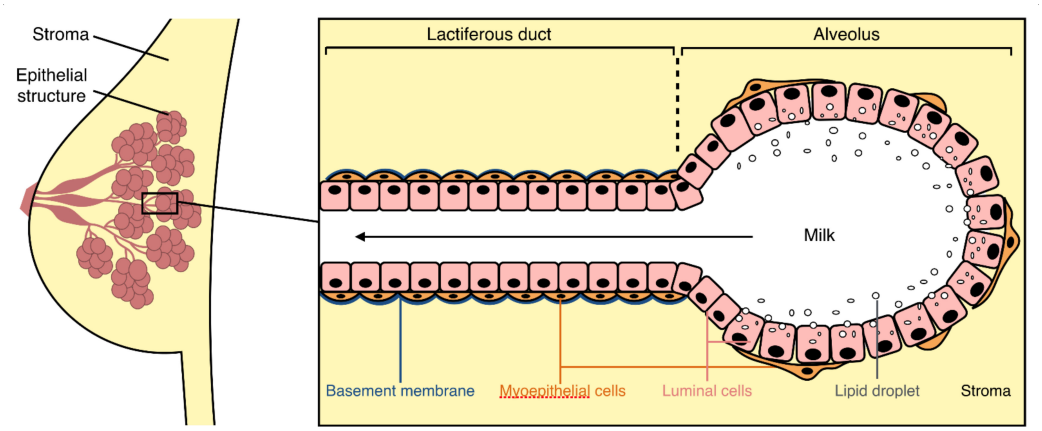


Figure 2. General organization of the mammary gland and its epithelium. The mammary epithelium (pink) is a ramified structure embedded in a fibro-adipose connective tissue: the mammary stroma (yellow). The epithelial structure is ramified into different levels of lactiferous ducts leading to milk-producing alveoli. The bistratified mammary epithelium (black box) is composed of luminal cells (pink) in contact with the lumen (white) and myoepithelial cells (orange) in contact with both the basement membrane (blue) and the stroma.

The structure of the mammary epithelium varies between the milk ducts and the mammary alveoli, but its general composition is common to both structures (Figure 2). The mammary epithelium is composed of two cellular layers linked by intercellular junctions: an internal layer in contact with the lumen of the mammary alveoli and lactiferous ducts (luminal cells), and an outer layer resting on basal lamina in contact with the mammary stroma (myoepithelial cells) [36].

The mammary gland as a target of viral infection—The excretion of viral particles into breast milk requires viral spread from the bloodstream to mammary glands. Mammary alveoli are surrounded by a network of blood capillaries that allow exchanges of nutrients, oxygen, and also pathogens between the bloodstream and the mammary epithelial cells. To be excreted into breast milk, viruses need to cross a barrier (e.g., blood–milk barrier).

For HIV, mammary barrier crossing does not occur by direct infection of the epithelium as mammary epithelial cells do not express the CD4 receptor at their surface [37,38] and are not susceptible to HIV-1 infection [38]. Viral particles in breast milk could be produced by local immune cells or could have transcytosed across the mammary epithelium as endocytosed virions were observed in primary mammary epithelial cells [38].

For HTLV-1, the virus in breast milk is cell-associated [39]. Leukocytes [39] that transmigrated across the blood–milk barrier and mammary epithelial cells [40] are found infected in breast milk.

For CMV, local viral reactivation in lactating mammary glands leads to CMV shedding into breast milk [41]. Infected leukocytes also cross the blood–milk barrier as they are detected in breast milk [42].

To this day, dissemination of arboviruses to female mammary glands and subsequent excretion in breast milk are understudied. Therefore we put the emphasis on ZIKV, for which data were obtained in our laboratory [43] and by Regla-Nava et al. [44].

In our laboratory, we showed that ZIKV disseminates to the mammary glands of 129S2/SvPas- *Ifnar1*^{tm1Agt} mice (A129) after intra-peritoneal or sub-cutaneous inoculation. We also demonstrated that primary human mammary epithelial cells are permissive to a

productive ZIKV infection, suggesting that the human mammary epithelium could be the source for viral particles detected in the breast milk of infected mothers. As the mammary epithelium is composed of two types of epithelial cells, we assessed whether ZIKV infects myoepithelial or luminal cells. Using luminal-like and myoepithelial-like cell lines, we showed that both cell types are productively infected by ZIKV [43]. Myoepithelial cells were also shown to be infected in vivo after systemic infection of AG129 mice by ZIKV [44], confirming our results. As luminal cells specialize in the excretion of various molecules (proteins, lipids, lactose, etc.) in breast milk, their secretory mechanisms could be exploited by ZIKV for the viral shedding into breast milk. Since viral RNA has been detected in the breast milk of an infected woman up to 33 days after the onset of symptoms, it would be interesting to perform a long-term study to determine how long ZIKV is detected in mammary glands. Indeed, mammary glands could play the role of reservoir and explain the persistence of the virus in breast milk, since vRNA was absent from the woman's bloodstream while present in breast milk.

Furthermore, our experiments were carried out on non-lactating mice so it would be interesting to study viral dissemination to mammary glands at other stages of its development (during gestation or lactation), as important structural and metabolic changes occur. The effect of lactation was studied by Regla-Nava et al. who observed high viral loads in mammary glands of lactating mice at 5 to at least 11 days after inoculation. The abundance and proliferation of breast epithelial cells during lactation could contribute to the role of reservoir of the lactating mammary glands. In addition, phenotypic changes induced by cell differentiation occurring during the lactation phase could allow the luminal alveolar epithelial cells to be more susceptible to ZIKV infection.

Finally, we observed that pups breastfed by ZIKV-infected mothers did not gain weight over time while pups breastfed by non-infected mothers grew well. In contrast, orally infected pups through intra-gastric inoculation did not show any weight loss or stagnation compared to non-infected pups. Therefore, these results suggest an effect of ZIKV infection either on the mother's behavior regarding breastfeeding or on milk composition and/or excretion from the milk ducts. To address this hypothesis, it could be of interest to study the effect of ZIKV infection on the mammary gland architecture as well as its milk secretion and ejection functions.

Taken together, these results suggest a role of the mammary epithelium in the production and excretion of viral particles into breast milk, but we cannot exclude that circulating immune cells infected by ZIKV (e.g., monocytes, lymphocytes, etc.) could contribute to the entry of ZIKV into the lactiferous compartment during their transmigration from the bloodstream to breast milk, with the so-called "Trojan horse" mechanism. However, persistence of viral RNA in breast milk suggests the existence of a reservoir within the mammary gland. Infected immune cells could transmigrate through the mammary epithelium during the viremic state, then newly produced particles could infect luminal epithelial cells in the alveolar compartment, serving as a reservoir in the mammary gland as long as the lactation state is maintained (Figure 3). As the nature of infectious viral entities (free, cell-associated, or vesicle-cloaked particles) in breast milk is unknown, these three mechanisms are plausible to this day.

Step 2. Effect of human breast milk on viral infectivity.

Breast milk composition—Breast milk is a biological fluid synthesized by the mammary glands of all female mammals after delivery. Biochemically, whole breast milk is defined as an emulsion of fatty globules rich in triglycerides (cream) and immersed in a plasma solution. This plasma solution, or skim milk, is a suspension of insoluble casein micelles bathed in the lactoserum, also called whey. The lactoserum is particularly rich in carbohydrates (lactose), proteins (α-lactalbumin, lactoferrin, lysozyme, Igs, etc.), mineral salts, and vitamins. Breast milk contains maternal immune cells (mainly myeloid precursors, neutrophils, immature granulocytes, and T lymphocytes) [45] and maternal breast epithelial cells.

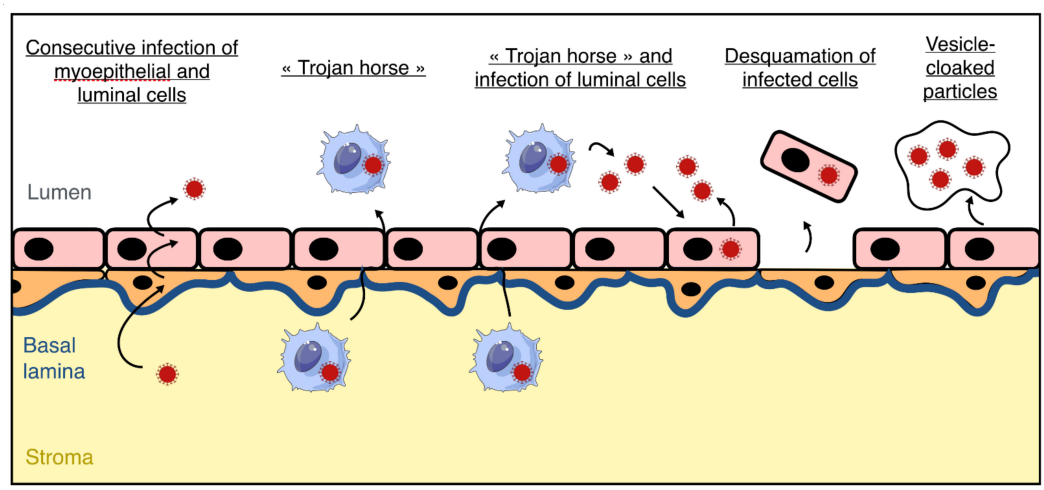


Figure 3. Hypothetical mechanisms of blood–milk barrier crossing by Zika Virus (ZIKV). In order to explain the presence of ZIKV particles in breast milk of infected mothers, several mechanisms could occur. Free viral particles (dark red) present in the bloodstream could sequentially infect myoepithelial cells (orange) and luminal cells (pink), resulting in the production of free viral particles in breast milk. Infected immune cells from the bloodstream (blue) could cross the epithelial barrier via the paracellular route by the « Trojan horse » mechanism, resulting in the presence of infected cells in breast milk that could produce viral particles. The viral particles produced could productively infect the luminal cells of the epithelium resulting in the presence of both cell-free and cell-associated ZIKV in breast milk. Infected epithelial cells could also be found in breast milk after being split off from the epithelium. Finally, it cannot be excluded that vesicles containing multiple virions could be produced by the mammary epithelium.

Many studies have reported the benefits of breastfeeding, such as protection against respiratory infections, obesity, and sudden infant death syndrome [46]. However, although breastfeeding provides many benefits to the infant, it may also not be recommended in some cases of viral infection of the mother, as breast milk is a source of transmission of several viruses [12]. These viruses can be transmitted as free viral particles like HIV-1 [47] and CMV [48], or in a cell-associated form, such as HIV-1 [47] and HTLV-1 [39]. Other viruses could be transmitted through extracellular vesicles, since epithelial cells were shown to be able to produce vesicle-cloaked viral clusters of rotavirus (RV) or norovirus (NV). These vesicle-cloaked viral clusters provide an increase in viral stability and multiplicity of infection [49].

The simultaneous presence of breast milk components and viral entities could lead to interactions inducing an enhanced or decreased viral transmission to the newborn through breastfeeding.

Effect of breast milk on the three main milk-borne viruses—The effect of human breast milk on viral infectivity has been investigated in several studies, on the three main milk-borne viruses: HIV-1, CMV, and HTLV-1.

It was demonstrated, in vivo and in vitro, that human breast milk induces a decrease in HIV-1 infectivity. Pre-incubation of HIV-1 with human breast milk leads to a dose-dependent reduction of HIV-1 infectivity in vitro, and a reduction of oral transmission to mice in vivo [50]. An antiviral mechanism was suggested by Mabuka et al., as they showed that HIV-specific antibodies capable of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) are common in breast milk and are associated with a reduced risk of transmission in women with high viral loads [51]. Another breast milk component, the lactoferrin (LF), was shown to interfere with HIV-1 infection [52,53], probably by inhibiting viral adsorption (Figure 4).

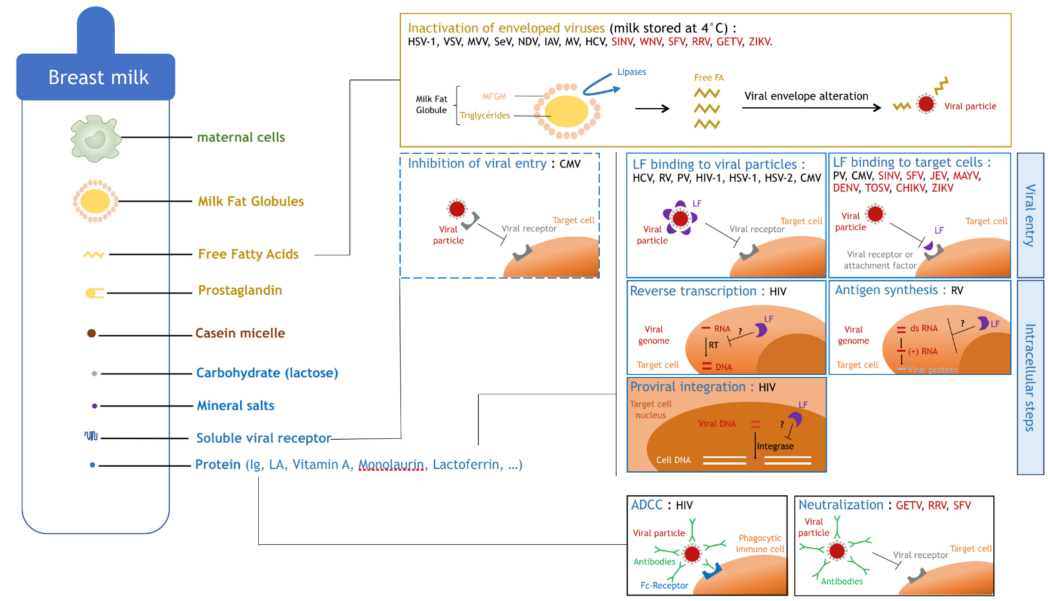


Figure 4. Inhibitory mechanisms of viral infectivity by breast milk components. Human breast milk contains components of different natures such as maternal cells (in green), the cream fraction (in yellow), the skim milk fraction composed of lactoserum (in blue) and casein micelles (in brown) (Figure 4). The cream fraction contains milk fat globules, free fatty acids (free FAs), and prosta-glandins. The lactoserum contains carbohydrates such as lactose, mineral salts, and a high diversity of proteins such as immunoglobulins (Ig), lactalbumin (LA), vitamin A, monolaurin, lactoferrin (LF), soluble viral receptors, and others. Lipases contained in breast milk digest triglyceride hearts of MFG when the milk fat globule membrane (MFGM) is altered, generating free FA (yellow box). Free FA inactivate enveloped viruses such as Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), Vesicular stomatitis virus (VSV), Maëdi–Visna virus (MVV), Sendaï virus (SeV), Newcastle disease virus (NDV), type A Influenza virus (IAV), Measles virus (MV), Hepatitis C virus (HCV), and arboviruses (red) such as Sindbis virus (SINV), West Nile virus (WNV), Semliki forest virus (SFV), Ross river virus (RRV), Getah virus (GETV), and Zika virus (ZIKV) by interacting with the viral envelope and altering viral particle integrity (yellow box). Soluble viral receptors present in breast milk inhibit viral entry of viruses such as Cytomegalovirus (CMV) by interacting with viral par-ticles contained in breast milk, thus inhibiting viral binding to cell receptors on target cells (blue box, dashed line). LF inhibits viral entry by binding either to viral particles or to target cells (blue boxes, full line, first row). LF binds to HCV, Rotavirus (RV), Poliovirus (PV), type 1 Human immunodeficiency virus (HIV-1), HSV-1, Herpes simplex virus type 2 (HSV-2), or CMV. LF binds to target cells, inhibiting infection by PV, CMV, and arboviruses (red) such as SINV, SFV, Japanese encephalitis virus (JEV), Mayaro virus (MAYV), dengue virus (DENV), Toscana virus (TOSV), Chikungunya virus (CHIKV), or ZIKV. LF supposedly inhibits intracellular steps of the viral cycle like reverse transcription (RT), antigen synthesis, or proviral integration into the host cell genome by yet unknown mechanisms (blue boxes, full line, second and third rows). Maternal Igs present in breast milk can bind to viral particles, thus inhibiting their infectivity either by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or by neutralizing (black boxes, full line) arboviruses (red) such as GETV, RRV, and SFV.

Concerning the transmission of CMV during breastfeeding, it was shown that different breast milk components have opposite effects on viral transmission. Clarke et al. showed that vitamin A, monolaurin, and LF have an antiviral effect, while prostaglandins PGE2 and PGF2α promote viral replication [48]. They also found that soluble forms of viral receptors compete with cellular receptors for binding of CMV, leading to a reduced adsorption of viral particles to the target cell membrane (Figure 4).

Finally, it has been largely determined that breastfeeding over 6 months is associated with MTCT of HTLV-1 [54]. The effect of breast milk or its components on HTLV-1 infectivity has

not yet been studied but, as component concentrations vary over time during breastfeeding, it is quite plausible that some of them may have an effect on HTLV-1 transmission.

Effect of lactoferrin on viral infectivity—The decrease in viral infectivity has often been associated with the presence of LF (mentioned above), an iron-binding protein present in breast milk. Indeed, it has been widely accepted since the 1990s that LF inhibits viral replication by interfering with viral adsorption at the cell membrane (Hepatitis C virus (HCV) [55,56], RV [57], Poliovirus (PV) [58], HIV-1 [52,53,59], Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) [60–64], Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) [60,62], and CMV [48,53,65,66]) (Figure 4). Several mechanisms have been described at different steps of the viral cycle. LF most probably inhibits the viral entry by binding either to viral particles or to target cells, thus preventing their interaction. Indeed, it was demonstrated that LF is capable of binding to viral envelope proteins such as E1 and E2 of HCV [67] or gp120 of HIV-1 [68], as well as heparins of the target cell membrane during CMV infection [69–72]. Other teams also found that LF can act during later steps of the viral cycle. Superti et al. suggested that LF not only interferes with viral entry but also with viral antigen synthesis during active RV infection, maintaining an antiviral effect after entry [57]. Finally, Ng et al. suggested that LF could inhibit HIV-1 reverse transcriptase in a dose-dependent manner, and weakly inhibits HIV-1 protease and integrase [73] (Figure 4).

On the other hand, LF has also been shown to exert a proviral effect on HTLV-1 replication. LF upregulates HTLV-1 LTR promoter activity resulting in an enhanced viral expression [59]. Moriuchi et al. also found that the viral protein Tax transactivates the LF gene promoter in myeloid-differentiated cells (HL-60) or mammary epithelial cells (MCF-7), inducing the expression of LF and thus facilitating milk-borne transmission of HTLV-1 [74].

The effect of LF on arboviruses is detailed in a further paragraph.

Effect of free fatty acids on viral infectivity—The reduction of viral infectivity can also be associated with an antiviral activity of lipids in breast milk. Welsh et al. showed that unsaturated fatty acids and monoglycerides present in breast milk inactivate enveloped viruses but not non-enveloped ones [75], suggesting that breast milk lipids disorganize the viral envelope. Thormar et al. confirmed these results but also found that free fatty acids become antiviral after breast milk storage at 4 °C and in infants' stomachs within 1 h of feeding [76]. It was shown by Pfaender et al. that after storage at 4 °C, concentrations of free fatty acids in breast milk increase, which could explain the antiviral effect observed. They suggested that, upon freezing and thawing, milk fat globule membranes surrounding milk fat globules (MFGs) become altered and triglycerides inside the MFGs become accessible to lipases present in breast milk, resulting in an increase of free fatty acids [77,78]. The pre-incubation of enveloped viruses with free fatty acids impairs the integrity of the viral envelope [76,79], confirming their antiviral role. The enveloped viruses tested were Vesicular stomatitis virus (VSV), HSV-1, Maëdi–Visna virus (MVV) [76], Sendaï virus (SeV), Newcastle disease virus (NDV), type A influenza virus (IAV), SINV and WNV [79]. Another observation confirming this model was made by Thormar et al. who observed that the skim fraction is needed for the lipids to become antiviral, suggesting that the lipases present in the skim fraction alter MFG integrity in the cream fraction [76] (Figure 4).

The effect of free fatty acids on arboviruses is discussed in the next paragraph.

Effect of breast milk on arboviruses—The effect of human breast milk on arboviral infectivity was first studied in 1977 by Welsh et al., who showed that breast milk has an antiviral activity on the replication of Getah virus (GETV), RRV, Semliki forest virus (SFV), SINV and Bebaru virus (BEBV). They identified the origin of the antiviral activity as being IgA neutralization for GETV, RRV, and SFV (but none was observed for SINV or BEBV) and the cream fraction for SFV [75] (Figure 4). Then, in 1980, Kohn et al. identified the free fatty acids as being responsible for the inhibition of SINV and WNV infectivity [79]. Free fatty acids also interact with HCV, as found by Pfaender et al. Although HCV is not an arbovirus, it is part of the *Flaviviridae* family and presents many similarities with arboviruses belonging to the *Flavivirus* genus, such as ZIKV, YFV, and DENV. It was shown that the storage of breast milk at 4 °C was responsible for both anti-HCV [77] and anti-

ZIKV [80] activities. Finally, it was recently shown that the cream fraction is responsible for anti-ZIKV activity of human breast milk stored at −20 °C, +4 °C, +22 °C, or +37 °C by altering viral particle integrity [81].

In addition, LF was shown to have an antiviral effect on mosquito-borne viruses such as SINV [82], SFV [82], Japanese encephalitis virus (JEV) [83], Mayaro virus (MAYV) [84], DENV [85], Toscana virus (TOSV) [86], CHIKV [87], and ZIKV [87]. LF mostly interferes with viral entry by interacting with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) that are bound by flaviviruses before the receptor-mediated entry into the cell [88] (Figure 4).

Finally, it was recently suggested that components of the whey fraction can also be antiviral. Extracellular vesicles and glycosaminoglycans contained in breast milk prevent viral attachment to the cell surface of ZIKV and Usutu virus (USUV) [89].

It is essential to investigate the effect of breast milk on arbovirus stability and infectivity as high viral loads are present and persist in breast milk of infected mothers, thus representing a risk of transmission to the newborn and development of severe symptoms. Although the effect of breast milk has been studied on arboviruses such as GETV, RRV, SFV, SINV, WNV, BEBV, and recently, ZIKV, no data are yet available concerning other arboviruses that are probably transmitted during breastfeeding, such as YFV [33,34], DENV [90], and CHIKV [15].

Milk treatment strategies to inactivate milk-borne viruses—Different strategies, based on heating or freezing milk, have been tested to find efficient ways to neutralize viral infectivity in breast milk samples (Table 2) and allow women of any country to provide their infants with the benefits of breastfeeding, despite their infection. Eradication methods of viruses from breast milk that would not impair the structure or the amount of immunological and nutritional factors in breast milk would be a crucial tool to protect newborns from chronic infection.

The effect of long or rapid heating of milk samples containing infectious particles from CMV-positive mothers has been assessed. The Holder pasteurization process consists of heating at 62.5 °C for 30 min and was shown to effectively inactivate CMV particles in breast milk [91,92]. High-temperature short time (HTST) treatment consists of heating the milk samples at 72 °C for a few seconds and was also shown to efficiently neutralize CMV particles contained in breast milk [93]. Finally, freezing milk samples at −20 °C provided unclear results concerning the risk of transmission of CMV through breastfeeding. Although it was observed that milk storage at −20 °C for 3 days decreases 99% of viral infectivity [91], several research teams observed contradictory effects. Either the infectivity was not completely eliminated [94], or it was not eliminated in all the samples tested [95]. Therefore, CMV particles were not efficiently eliminated from breast milk stored at −20 °C, regardless of the length of storage from 4 to 10 days [94–96]. When the length of freezing was extended to 20 days, viral particles were completely inactivated in the milk samples [96]. The differences observed between these studies could depend on the viral load in the different breast milk samples. Among these strategies, only HTST treatment and freezing at −20 °C do not significantly impair breast milk composition in immunological and nutritional components [93,97].

The effect of different breast milk heating strategies on HIV-1 infectivity has been studied. The Holder pasteurization process was proven effective at viral inactivation in breast milk [98] but it leads to a decrease of IgA [99], vitamins [100], and LF [101]. Pretoria pasteurization consists of bringing water to a boil and immediately placing a jar of milk inside (while having removed the water from the heat source). This technique heats the milk to about 56 to 62.5 °C for 10 to 15 min. This technique is effective at viral inactivation [102] and does not significantly impair the immunological factor content of breast milk [103]. Flash-heat treatment consists of placing a jar of milk in water, then bringing it to a boil. This process was shown to efficiently inactivate HIV-1 particles in breast milk [103,104] without decreasing immunological components [105]. Although some of these treatments are effective and feasible at home, the WHO does not recommend any of

these heat strategies but favors that HIV-positive mothers keep breastfeeding their infants while receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) [106].

Table 2. Viral inactivation strategies in breast milk.

Virus	Treatment	Viral Inactivation	Immunological (IgA, LF, Lysozyme) or Nutritional Components Composition	References
CMV	**Holder Pasteurization** (62.5 °C-30 min)	+	Decrease of immunological components	[91,97,100,101]
	HTST (72 °C-5–15 s)	+	No significant decrease of immunological components	[93]
	Freezing (−20 °C)	~	No significant decrease of immunological components	[97]
			Viral inactivation	**References**
		3 days	+	[91]
		4–10 days	+/−	[94]
		7 days	+/−	[95]
		10 days	-	[96]
		20 days	+	[96]
HIV-1	**Holder Pasteurization** (62.5 °C-30 min)	+	Decrease of immunological components	[97–101]
	Pretoria pasteurization (56–62.5 °C-10–15 min)	+	No significant decrease of immunological components	[102,103]
	Flash-heat	+	No significant decrease of immunological components	[103–105]
HTLV-1	**Freezing** (−20 °C–12 h)	+	ND	[107]
ZIKV	**+4 °C** (at least 1 day)	+	ND	[81]
	+37 °C (at least 2 h)	+	ND	[81]
	−20 °C (at least 10 h)	+	ND	[81]
	+22 °C (at least 10 h)	+	ND	[81]
	Pasteurization (62.5 °C-30 min)	+	ND	[80]

Legend: +: successful inactivation of viral infectivity. -: unsuccessful inactivation of viral infectivity. ~: unclear. +/−: not completely inactivated. ND: not determined.

The effect of milk treatment strategies on HTLV-1 infectivity has unfortunately been understudied. To our knowledge, only freezing at −20 °C has been studied. This technique destroys the HTLV-1-infected cell content in breast milk [107]. In endemic regions such as Japan, pregnant women are screened for HTLV-1 antibodies [108]. When a mother is identified as infected, bottle feeding is recommended. Although this strategy was proven to be effective at decreasing MTCT of HTLV-1 during breastfeeding [109], it deprives newborns of the benefits of breastfeeding. Thus, milk treatment strategies would enable infected mothers to keep breastfeeding.

Very few studies have investigated the effect of milk treatment strategies on arboviruses. To our knowledge, the effect of different milk storage temperatures on viral infectivity has only been studied on ZIKV. As mentioned previously, breast milk storage at –20 °C, +4 °C, +22 °C, or +37 °C [81] and breast milk pasteurization [80] successfully inactivate viral particles. Although these studies provide valuable information, viral inactivation was observed using breast milk from healthy mothers after incubating free viral particles. In breast milk of infected mothers, however, the virus could be cell-free, cell-associated,

or even vesicle-cloaked, possibly making these milk treatments inefficient against ZIKV in vivo.

Step 3. Transmission to the newborn via oral route.

After ingestion of breast milk, milk-borne viruses need to cross an epithelial barrier in order to disseminate into the host organism. They can cross the tonsillar and intestinal barriers, which are located on the way of infected breast milk in the digestive tract, or they could even cross the respiratory barrier as many newborns are affected by dysphagia. Dysphagia is characterized by a difficulty in swallowing and can result in the penetration of breast milk into the lungs. Although it is difficult to evaluate the incidence of dysphagia among infants, it was reported that it may affect up to 25% of all children [110].

3.1. Viral Crossing of the Tonsillar Barrier

The tonsillar barrier—Tonsils are lymphoid organs located in both the nasal and buccal cavities and play an important role in the immune response against respiratory and orally transmitted microorganisms.

In the buccal cavity, the tonsillar barrier is a pluristratified squamous epithelium that forms deep tonsillar crypts, at the base of which are found micropore cells that are specialized in antigen transport. Beneath the epithelium are located lymphatic nodules with germinal centers that participate in the immune function of the tonsils by producing new lymphocytes and activating the immune response [111]. Although tonsils allow recognition and elimination of foreign organisms, some viruses are able to cross them, either by infection or by transcytosis.

Tonsillar barrier crossing by orally transmitted viruses—Tonsillar barrier crossing has been determined for Epstein–Barr virus (EBV) and HIV.

It has been well documented that EBV particles are secreted into patients' saliva [112–115] at high viral loads [113]. Two mechanisms of oral transmission were found. First, Tugizov et al. showed that EBV can cross an in vitro model of the tonsillar barrier through both apical-to-basolateral (AP-to-BL) and basolateral-to-apical (BL-to-AP) transcytosis, with approximative efficiencies of 10 and 20%, respectively. AP-to-BL transcytosis of EBV is initiated by macropinocytosis while caveolin-dependent endocytosis mediates BL-to-AP transcytosis [116]. Secondly, it was found that EBV infects the epithelial barrier, using primary tonsillar epithelial cells [117] or a stratified epithelium in vitro [118], resulting in a release of infectious viral particles by the BL pole.

HIV, a milk-borne virus, targets different cell types in the tonsils. In the late 1990s, HIV was shown to infect tonsillar leucocytes either on infected patients [119,120] or when exposed in vitro to cell-free HIV [121]. Another study identified HIV-infected immune cells in mechanically disaggregated human tonsillar tissue after in vitro infection as expressing CD4 (T cells), CD11c (dendritic cells), or CD68 (monocytes) [122]. However, in order to reach these immune target cells in vivo, the virus would have to cross the external epithelium. No mechanism has yet been determined but Maher et al. showed that HIV particles are capable of binding to external epithelial cells [123]. Although the mechanism of HIV crossing is not known, it was shown using simian models that cell-free HIV infects external epithelial cells within the tonsils of infected macaques [124], suggesting that the virus could reach the germinal centers by productively infecting the epithelial barrier. As viral entities of HIV from breast milk can be either cell-free or cell-associated [47], several mechanisms could co-exist to enable HIV crossing through the tonsillar barrier.

3.2. Viral Crossing of the Respiratory Barrier

In the first instance, it might seem peculiar to address interactions between milk-borne viruses and the respiratory barrier. However, the respiratory barrier crossing by milk-borne viruses could be relevant in the context of MTCT of arboviruses during breastfeeding as newborns are often affected by dysphagia, a process implicating breast milk penetration into the respiratory tract during drinking [110]. As breast milk of arbovirus-infected mothers

contains high viral loads and/or infectious particles, this biological fluid may thus represent a risk of transmission to the newborn via the respiratory tract during breastfeeding.

The respiratory system is composed of the upper and lower respiratory tracts. The upper part refers to the nasal cavity, pharynx, and larynx. The lower part refers to the trachea, bronchi, bronchioles, and alveoli.

The respiratory epithelium varies in structure throughout the respiratory tract. Four different structures are found: the pseudo-stratified epithelium (in the nasal cavity and in the highest part of the lower tract), the stratified squamous epithelium that lines the pharynx, the simple cuboidal epithelium located in the bronchioles, and the simple squamous epithelium that allows gas exchanges in the alveoli [125]. Although different defense mechanisms co-exist along the respiratory tract, some viruses have acquired the ability to bypass them in order to infect the organism. Among them, rhinoviruses [126], coronaviruses [127,128], Respiratory Syncytial Virus (RSV) [129,130], and influenza viruses [131] alter the respiratory barrier integrity resulting in its disruption, while MERS-CoV [132] can also productively infect the respiratory epithelium and be released from its BL side.

Concerning arboviruses, ZIKV, JEV, WNV, and USUV were shown to productively infect primary nasal epithelial cells cultivated in air–liquid interface (ALI) conditions [133]. While no disruption of the barrier function was observed, only JEV and WNV were shown to efficiently be released basolaterally and cross the respiratory barrier. Those first data, in accordance with the detection of arboviral RNA in nasopharyngeal swabs, could also be a clue for potential infection of the newborn respiratory epithelium through exposure to contaminated breast milk.

3.3. Viral Crossing of the Intestinal Barrier

The intestinal barrier—The intestinal barrier is a vast semi-permeable barrier that allows the absorption of nutrients while preventing the transport of pathogens. The intestinal barrier is a monostratified epithelium composed of different cell types. The most abundant cells are enterocytes, but other cells are found such as goblet cells, Paneth cells, and microfold cells (M cells) that all differentiate from intestinal stem cells located at the bottom of deep intestinal crypts (Figure 5). Under the epithelial monolayer is located the gut-associated lymphoid tissue (GALT), which is composed of isolated immune cells that are anchored to the monolayer or free in the lamina propria, lymphoid follicles such as Peyer patches and mesenteric lymph nodes. Overlying the follicles, the follicle-associated epithelium (FAE) is enriched by M cells that play a major role in the immune response and tolerance as they have a high capacity of transcytosis, thus allowing antigens crossing toward immune tissues. Although the intestinal epithelium is a tight monolayer expressing tight junction proteins that allow the barrier function, and containing the GALT that allows its immunologic function, some viruses have developed mechanisms to cross the intestinal barrier.

Intestinal barrier crossing by orally transmitted viruses—Several orally transmitted viruses have been found to cross the intestinal barrier: viruses transmitted through the oro-fecal route such as Hepatitis A virus (HAV), RV, PV, and NV, or viruses transmitted during breastfeeding such as HIV, CMV, and HTLV-1. A variety of mechanisms have been acquired by these viruses in order to cross the intestinal barrier (Figure 5). Some infect enterocytes without inducing a disruption of the monolayer, like HAV [134] or HIV [135], while others induce a loss of barrier integrity, like RV [136] and CMV [137]. Another viral crossing mechanism consists in transcytosis through enterocytes by viruses such as HIV [138] and HTLV-1 [139], or through M cells like HIV [135], PV [140], and NV [141] (Figure 5).

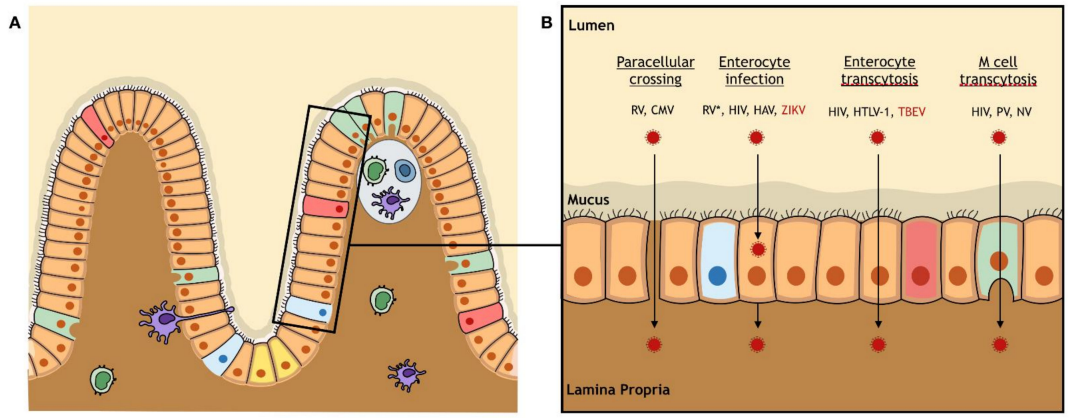


Figure 5. The intestinal barrier: anatomy and viral crossing. (**A**) The intestinal barrier is a monostratified epithelium composed of different cell types that all differentiate from pluripotent stem cells (yellow) located at the bottom of the crypts: enterocytes (orange), goblet cells (pink), Paneth cells (blue), and microfold cells (M cells) (green). Underlying the epithelium, the gut-associated lymphoid tissue is composed of free and anchored immune cells. Over the lymphoid follicles, the follicle-associated epithelium is enriched by M cells. (**B**) The intestinal barrier can be crossed by paracellular crossing by Rotavirus (RV), by enterocyte infection by RV (*: after paracellular crossing), Human immunodeficiency virus (HIV), Hepatitis A virus (HAV), and Zika virus (ZIKV), by transcytosis through enterocytes by HIV, type 1 Human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1), and Tick-borne encephalitis virus (TBEV), or by transcytosis through M cells by HIV, Poliovirus (PV), and Norovirus (NV). The only arboviruses (red) that were reported to cross the intestinal barrier are TBEV and ZIKV.

In the late 1980s, an in vitro model of an intestinal barrier was developed using the Caco-2 cell line (from a human colorectal adenocarcinoma). Caco-2 cells grown on polycarbonate filters for approximatively 20 days form a tight monolayer that allows studying viral crossing and barrier integrity. Using this model, the Caco-2 cell line was shown to be permissive to HAV [134], HIV [135], and RV [136]. The infection by HAV leads to a production of viral particles by both AP and BL sides with a lower production efficiency from the BL side and without loss of epithelium integrity. HIV infection of Caco-2 cells is dependent on the expression of a receptor called galactosyl-ceramide (GalCer) and leads to no disruption of the intestinal barrier. The infection of enterocytes by RV induces either an alteration of tight junctions or apoptosis in Caco-2 monolayers in vitro, and leads to a rupture of the intestinal barrier [136]. The apoptosis is induced through the mitochondrial pathway [142] and is dependent on the NSP4 viral protein. Interestingly, RV was shown to be produced in the form of large vesicles containing several virions in the feces of mice and pigs [49].

Other viruses cross the intestinal barrier by transcytosis through enterocytes. It was shown for HIV that the virus crosses a tight Caco-2 monolayer by transcytosis that is dependent on GalCer expression [138]. Bomsel et al. also showed that during BL-to-AP transcytosis, intracellular Igs target the viral particles, thus inhibiting the viral transport across the cell [143]. Transcytosis of HTLV-1 was demonstrated by our team using the in vitro model of Caco-2 tight monolayer [139]. We showed that transcytosis of HTLV-1 through enterocytes does not alter barrier integrity or the virus's ability to infect underlying human dendritic cells.

Transcytosis of viral particles across the intestinal barrier was also shown to occur in M cells. It was shown on an in vitro model of Caco-2 monolayers enriched with M cells that HIV particles are transported across M cells by transcytosis. Briefly, to induce M cell differentiation, B cells were added to the BL side of Caco-2 monolayers and M cell differentiation was checked by microscopy and by measuring the transcytosis capacity

of the monolayers. Only X4 virions were found to cross M cells by transcytosis [135]. PV was also shown to cross M cells by transcytosis [140]. It was found that after PV type 1 infection of human Peyer's patches explants, viral particles would preferentially adhere to M cells, and intracellular vesicles containing virions were observed by electron microscopy. The penetration of PV into M cells was also confirmed in vivo on a simian model [144]. NV was shown to cross polarized murine intestinal epithelia in vitro by transcytosis through M cells [141]. These results were confirmed in vivo on a mouse model. After oral inoculation of NV, transient depletion of M cells was associated with a decreased infection [145]. Interestingly, it was also shown that NV is shed in feces in the form of vesicles containing numerous viral particles that remain intact during feco-oral transmission [49].

3.4. Viral Crossing of Epithelial Barriers by Arboviruses

After inoculation of infected breast milk through the oral tract, milk-borne arboviruses could cross the three epithelial barriers mentioned above: the tonsillar, the respiratory, and the intestinal barriers.

No arbovirus has yet been found to cross the tonsillar barrier, possibly due to the lack of research on that topic. The tonsillar epithelium could be an entry site for arboviruses as infected breast milk is in contact with the tonsils during its transit in the oral tract. The mechanisms described above for orally transmitted viruses could be used by milk-borne arboviruses to cross the tonsillar barrier.

Concerning the respiratory barrier crossing, several arboviruses (JEV and WNV) were shown to cross an in vitro model of the nasal epithelium, but no study was performed on primary human airway epithelia. Although the mechanisms described could be used by milk-borne arboviruses, viral dissemination into the host organism most likely occurs across the intestinal barrier.

In the context of breastfeeding, arboviruses are likely to reach the intestinal barrier as the pH of newborns' stomachs is buffered by breast milk and significantly higher than the pH of an adult stomach [146]. Arboviruses like ZIKV [147] or TBEV [148] were shown to be stable at low pH or even in gastric juices for TBEV [149]. To this day, TBEV and ZIKV are the only arboviruses that have been shown to cross the intestinal barrier in experimental models. Using the Caco-2 model, Yu et al. showed that TBEV crosses the monolayers via transcytosis during the early stage of infection, and via the paracellular route five days after infection because of an impaired barrier integrity [150] (Figure 5). In our laboratory, we showed that the exposure of different Caco-2 clones to several ZIKV strains (isolated in Brazil in 2016 or in French Polynesia in 2013) leads to their infection. Using the polarized Caco-2 monolayer model, we observed no alteration of the epithelial barrier integrity and found a production of infectious viral particles from both the AP and BL sides, with a lower production efficiency from the BL side (Figure 5). In vivo, we demonstrated that oral inoculation of ZIKV to newborn A129 mice leads to their infection associated with neuro-invasion and a high mortality rate [151]. Additionally, we showed that the infection of breastfeeding dams post-partum results in a transmission of ZIKV RNA to their pups [151], thus demonstrating that breastfeeding might be a transmission route of ZIKV.

4. Discussion, Unanswered Questions and Future Directions

Both epidemiological and physiological evidence has been obtained regarding MTCT of arboviruses during breastfeeding. Viral genomes of CHIKV, DENV, WNV, and ZIKV were detected in mature breast milk or colostrum of infected women and shown to persist for long periods of time, even after viral clearance from the bloodstream (CHIKV and ZIKV). Additionally, infectious viral particles of DENV and ZIKV were detected in breast milk. Due to either limited volumes or low viral loads, the infectious nature of breast milk was not assessed for CHIKV, WNV, and YFV, but the existence of infectious particles in breast milk is not excluded. In several cases, newborns of arbovirus-infected mothers were also infected while no viral genome was detected from umbilical cord blood, eliminating the possibility

of transplacental transmission. Although it is difficult to exclude a possible vector-borne transmission, two arguments demonstrate YFV transmission through breastfeeding and strongly suggest ZIKV transmission. First, three cases of transmission of the vaccine strain 17DD of YFV (17DD-YFV) occurred after post-partum vaccination of breastfeeding mothers, leading to the infection of their newborn with 17DD-YFV. Because the 17DD-YFV can infect the *Aedes aegypti* midgut but does not disseminate to the salivary glands, preventing its transmission to a novel host [152–155], the infection of the newborns with this vaccine strain demonstrates the transmission through breastfeeding. In parallel, WT YFV was shown to be excreted in breast milk, as vRNA was recently detected in mature milk [26]. Secondly, ZIKV was transmitted from a mother to her child and sequencing of breast milk and urine isolates revealed 99% of sequence identity. The advanced age of the child (5-month-old) excludes transplacental transmission and his very limited contact with the exterior, as well as the air-conditioning, limit a possible mosquito-borne transmission.

To explain MTCT during breastfeeding, three mechanisms are mandatory: viral dissemination to the mammary gland, viral stability in breast milk, and epithelial barrier crossing.

Due to the lack of studies on viral infection of the mammary glands, only ZIKV was shown, by our team, to disseminate to mammary glands after sub-cutaneous infection. Although we showed an important role of the mammary epithelium in viral replication and excretion into breast milk, other mechanisms cannot be excluded. As maternal immune cells cross the blood–milk barrier during lactation, infected immune cells could be present in breast milk. Immune cells in lactiferous ducts could also produce viral particles that could infect the epithelium, creating a viral reservoir that would explain the persistence of ZIKV in breast milk after its clearance from the bloodstream [17]. Finally, a desquamation of the mammary epithelium could lead to the presence of infected epithelial cells in breast milk. To determine which mechanism is responsible for breast milk infectivity, the form of the virus in breast milk should be identified using milk from infected mothers. As there is no ongoing epidemic, mice models are essential. Mouse milking was described in several publications [156–158] but the process is delicate and provides small volumes of breast milk, making it complicated to determine whether infected cells are present.

For breast milk to be infectious, viral stability needs to be maintained. Several studies have found an antiviral effect of breast milk on arboviruses. Since 1977, the cream fraction has been thought to be responsible for inactivating enveloped viruses in breast milk but recent data have challenged this assumption, as it was determined in several studies that the antiviral activity is only observed after milk treatment (4 °C or heat treatment). Fresh milk did not show any antiviral activity on ZIKV (or HCV) and still represents a risk in transmission of infectious particles to the newborn during breastfeeding.

LF was shown to inhibit the infection by many mosquito-borne viruses by interacting with HSPG, but all studies (except one [85]) were performed in vitro, in the absence of breast milk and its multiple components. One study was performed on mice models but the virus was pretreated with LF alone in vitro before being injected intra-cranially. The study of each breast milk component on its own is not relevant to the overall effect of breast milk on viral infectivity. For CMV and HIV-1, different breast milk components were shown to be antiviral on their own; however, both these viruses are still transmitted during breastfeeding. Therefore, two approaches should be prioritized to appropriately investigate the effect of breast milk on viral infectivity: the study of viral inactivation in vitro should be performed in the presence of fresh breast milk from either infected or non-infected mothers (as it was shown by Conzelmann et al. that preincubation of ZIKV with fresh breast milk does not result in viral inactivation), and in vivo studies should be carried out to study transmission and infection of breastfed pups. Animal models were used to demonstrate the transmission during breastfeeding of DENV [90], WNV [159], and SFV [159] using hamster pups, as well as ZIKV [151] and WNV [160] using mouse pups.

After oral inoculation, arboviruses present in breast milk need to cross an epithelial barrier. It could be either the tonsillar, intestinal, or respiratory barrier, but milk-borne

arboviruses most likely cross the intestinal barrier. Today, the only arbovirus for which MTCT through breastfeeding has been studied, in an experimental murine model, is ZIKV. We showed, in vivo, that ZIKV is transmitted from infected mothers to breastfed newborn mice and we identified, in vitro, that the intestinal barrier allows viral replication and excretion of infectious virions from both AP and BL sides of polarized enterocyte-like cells. Although ZIKV crosses the intestinal barrier, it does not exclude a potential role of the other epithelial barriers as the ability of ZIKV to cross them has not been investigated. For other flaviviruses potentially transmitted during breastfeeding, such as DENV or YFV, the intestinal barrier could be an entry site as they share many similarities with ZIKV.

5. Conclusions

Although the main transmission route of arboviruses is vector-borne, other modes of transmission have been determined following large outbreaks that occurred in the last decades. Neglected for long, MTCT during breastfeeding was found for the vaccine strain of YFV, strongly highlighted for ZIKV, and suggested for CHIKV, DENV, and WNV. Additionally, a milk-borne transmission of TBEV to humans following the consumption of infected dairy products was also demonstrated, thus highlighting viral stability in milk. However, the only arbovirus for which MTCT during breastfeeding has been studied at this point is ZIKV, which disseminates to the mammary glands of infected mothers, is excreted into breast milk, and crosses the intestinal barrier, infecting newborn mice. Understanding the mechanisms of dissemination to the mammary gland, excretion into breast milk, and epithelial barrier crossing is essential to develop efficient tools to prevent the transmission of infectious viral particles to the newborn. Breast milk from infected mothers would allow us to determine the nature of viral entities, and more advanced culture tools such as organoids could bring new insight concerning the associated mechanisms. Finally, the study of the mechanisms associated with viral inactivation in breast milk could allow us to improve milk treatment strategies.

Additionnal remark about the search strategy: The search strategy was devised on the PubMed database for articles published up to 28 February 2021. Briefly, it included searches for the following items: $1 ("Arbovirus Infections" [Mesh]) OR (arbovirus OR arbovirus infections OR flavivirus OR togavirus OR bunyavirus OR reovirus); $2 ("Breast Feeding" [Mesh:NoExp] OR "Milk, Human" [Mesh]) OR (breast feeding OR breastmilk OR breast milk OR breast fed OR breastfed OR human milk OR lactation); the combination of these two search strategies produced 405 results. A second search strategy included a combination of $3 ("Arbovirus Infections" [Mesh]) OR (arbovirus OR arbovirus infections OR flavivirus OR togavirus OR bunyavirus OR reovirus)) AND (("Breast Feeding" [Mesh:NoExp] OR "Milk, Human" [Mesh]) OR (breast feeding OR breastmilk OR breast milk OR breast fed OR breastfed OR human milk OR lactation)) with $4 (("Disease Transmission, Infectious" [Mesh:NoExp]) OR "Infectious Disease Transmission, Vertical" [Mesh]) OR ((transmission OR detection OR persistence) AND (virus)) that led to 196 references. The search strategy was initiated by C. Cecilio and one author (S.D.) screened the titles and abstracts of articles identified from the database search. For potentially eligible articles, full-text papers were obtained and independently processed for data extraction by S.D., P.E.C and A.V. In very few cases, responding to such requirements, works found on Google Search were also included.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We thank Catherine Cecilio (Bibliothèque-CeRIS, Institut Pasteur, Paris) for help and fruitful advice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Chaves-Carballo, E. Carlos Finlay and yellow fever: Triumph over adversity. *Mil. Med.* **2005**, *170*, 881–885. [CrossRef]
2. WHO. *Arboviruses and Human Disease*; WHO: Geneva, Switzerland, 1967; Volume 21, pp. 460–462.
3. Artsob, H.; Lindsay, R.; Drebot, M. Arboviruses. In *International Encyclopedia of Public Health*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 154–160. [CrossRef]
4. Centers for Disease Control and Prevention. Arboviral Diseases, Neuroinvasive and Non-Neuroinvasive 2015 Case Definition. Available online: https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/arboviral-diseases-neuroinvasive-and-non-neuroinvasive/ (accessed on 16 April 2021).
5. Viral Hemorrhagic Fevers—Chapter 4—2020 Yellow Book, Travelers' Health, CDC. Available online: https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/viral-hemorrhagic-fevers (accessed on 16 April 2021).
6. Marks, M.; Marks, J.L. Viral arthritis. *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians Lond.* **2016**, *16*, 129–134. [CrossRef]
7. WHO. *Breastfeeding*; WHO: Geneva, Switzerland, 2018.
8. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human milk composition. Nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2013**, *60*, 49–74. [CrossRef] [PubMed]
9. Primo, C.C.; Ruela, P.B.F.; Brotto, L.D.d.A.; Garcia, T.R.; Lima, E.d.F. Efeitos da nicotina materna na criança em amamentação. *Rev. Paul. Pediatr.* **2013**, *31*, 392–397. [CrossRef]
10. May, P.A.; Hasken, J.M.; Blankenship, J.; Marais, A.-S.; Joubert, B.; Cloete, M.; de Vries, M.M.; Barnard, R.; Botha, I.; Roux, S.; et al. Breastfeeding and maternal alcohol use: Prevalence and effects on child outcomes and fetal alcohol spectrum disorders. *Reprod. Toxicol.* **2016**, *63*, 13–21. [CrossRef]
11. Bartu, A.; Dusci, L.J.; Ilett, K.F. Transfer of methylamphetamine and amphetamine into breast milk following recreational use of methylamphetamine. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *67*, 455–459. [CrossRef]
12. Lawrence, R.M.; Lawrence, R.A. Breast milk and infection. *Clin. Perinatol.* **2004**, *31*, 501–528. [CrossRef] [PubMed]
13. Andervont, H.B. The mammary tumor agent and its implication in cancer research. *Yale J. Biol. Med.* **1946**, *18*, 333–344.
14. Van de Perre, P.; Molès, J.; Nagot, N.; Tuaillon, E.; Ceccaldi, P.; Goga, A.; Prendergast, A.J.; Rollins, N. Revisiting Koch's postulate to determine the plausibility of viral transmission by human milk. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2021**, *32*, 835–842. [CrossRef] [PubMed]
15. Campos, G.S.; Bandeira, A.C.A.; Rocha, V.F.D.; Dias, J.P.; Carvalho, R.H.; Sardi, S.I. First detection of Chikungunya virus in breast milk. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 1015–1017. [CrossRef] [PubMed]
16. Arragain, L.; Dupont-Rouzeyrol, M.; O'Connor, O.; Sigur, N.; Grangeon, J.-P.; Huguon, E.; Dechanet, C.; Cazorla, C.; Gourinat, A.-C.; Descloux, E. Vertical transmission of Dengue virus in the peripartum period and viral kinetics in newborns and breast milk: New data. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* **2017**, *6*, 324–331. [CrossRef]
17. Sotelo, J.R.; Sotelo, A.B.; Sotelo, F.J.; Doi, A.M.; Pinho, J.; Oliveira, R.D.C.; Bezerra, A.M.; Deutsch, A.D.; Villas-Boas, L.S.; Felix, A.C.; et al. Persistence of Zika virus in breast milk after infection in late stage of pregnancy. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 856–857. [CrossRef] [PubMed]
18. Barthel, A.; Gourinat, A.-C.; Cazorla, C.; Joubert, C.; Dupont-Rouzeyrol, M.; Descloux, E. Breast milk as a possible route of vertical transmission of dengue virus? *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *57*, 415–417. [CrossRef]
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding—Michigan, 2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2002**, *51*, 877–878.
20. Hinckley, A.F.; O'Leary, D.R.; Hayes, E.B. Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics* **2007**, *119*, e666–e671. [CrossRef] [PubMed]
21. Couto, A.M.; Salomão, M.R.; Schermann, M.T.; Mohrdieck, R.; Suzuki, A.; Carvalho, S.M.D.; de Assis, D.M.; Araújo, W.N.; Flannery, B. Transmission of yellow fever vaccine virus through breast-feeding—Brazil, 2009. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2010**, *59*, 130–132.
22. Mann, T.Z.; Haddad, L.B.; Williams, T.R.; Hills, S.L.; Read, J.S.; Dee, D.L.; Dziuban, E.J.; Pérez-Padilla, J.; Jamieson, D.J.; Honein, M.A.; et al. Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: A systematic review. *Paediatr. Périnat. Epidemiol.* **2018**, *32*, 358–368. [CrossRef] [PubMed]
23. Blohm, G.M.; Lednicky, J.A.; Márquez, M.; White, S.K.; Loeb, J.C.; Pacheco, C.A.; Nolan, D.J.; Paisie, T.; Salemi, M.; Rodríguez-Morales, A.J.; et al. Complete genome sequences of identical Zika virus isolates in a nursing mother and her infant. *Genome Announc.* **2017**, *5*. [CrossRef] [PubMed]
24. Blohm, G.M.; Lednicky, J.A.; Márquez, M.; White, S.K.; Loeb, J.C.; Pacheco, C.A.; Nolan, D.J.; Paisie, T.; Salemi, M.; Rodríguez-Morales, A.J.; et al. Evidence for mother-to-child transmission of Zika virus through breast milk. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66*, 1120–1121. [CrossRef]
25. Dupont-Rouzeyrol, M.; Biron, A.; O'Connor, O.; Huguon, E.; Descloux, E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet* **2016**, *387*, 1051. [CrossRef]
26. Ribeiro, A.F.; Brasil, L.M.C.D.R.; Prada, R.M.; Nogueira, J.S.; Maeda, A.Y.; Sztajnbok, J. Detection of wild-type yellow fever virus in breast milk. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2020**, *39*, 68–69. [CrossRef] [PubMed]
27. Besnard, M.; Lastère, S.; Teissier, A.; Cao-Lormeau, V.-M.; Musso, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, 8–11. [CrossRef]

28. Cavalcanti, M.G.; Cabral-Castro, M.J.; Gonçalves, J.L.; Santana, L.S.; Pimenta, E.S.; Peralta, J.M. Zika virus shedding in human milk during lactation: An unlikely source of infection? *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *57*, 70–72. [CrossRef]
29. Centeno-Tablante, E.; Medina-Rivera, M.; Finkelstein, J.; Herman, H.; Rayco-Solon, P.; Garcia-Casal, M.; Rogers, L.; Ghezzi-Kopel, K.; Leal, M.Z.; Velasquez, J.A.; et al. Update on the transmission of Zika virus through breast milk and breastfeeding: A systematic review of the evidence. *Viruses* **2021**, *13*, 123. [CrossRef]
30. Giovanetti, M.; De Jesus, J.G.; De Maia, M.L.; Junior, J.; Amarante, M.C.; Viana, P.; Barreto, F.K.; De Cerqueira, E.; Santos, N.P.; Falcão, M.B.; et al. Genetic evidence of Zika virus in mother's breast milk and body fluids of a newborn with severe congenital defects. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 1111–1112. [CrossRef] [PubMed]
31. Siqueira Mello, A.; Bertozzi, A.P.A.P.; Rodrigues, M.M.D.; Gazeta, R.E.; Moron, A.F.; Soriano-Arandes, A.; Sarmento, S.G.P.; Vedovello, D.; Silva, A.C.B.; Fajardo, T.; et al. Development of secondary microcephaly after delivery: Possible consequence of mother-baby transmission of Zika virus in breast milk. *Am. J. Case Rep.* **2019**, *20*, 723–725. [CrossRef] [PubMed]
32. Hemachudha, P.; Wacharapluesadee, S.; Buathong, R.; Petcharat, S.; Bunprakob, S.; Ruchiseesarod, C.; Roeksomtawin, P.; Hemachudha, T. Lack of transmission of Zika virus infection to breastfed infant. *Clin. Med. Insights Case Rep.* **2019**, *12*, 1179547619835179. [CrossRef] [PubMed]
33. Traiber, C.; Coelho-Amaral, P.; Ritter, V.R.F.; Winge, A. Infant meningoencephalitis probably caused by yellow fever vaccine virus transmitted via breastmilk. *J. Pediatr.* **2011**, *87*, 269–272. [CrossRef]
34. Kuhn, S.; Twele-Montecinos, L.; MacDonald, J.; Webster, P.; Law, B. Case report: Probable transmission of vaccine strain of yellow fever virus to an infant via breast milk. *CMAJ* **2011**, *183*, E243–E245. [CrossRef]
35. Besnard, M.; Dub, T.; Gérardin, P. Outcomes for 2 children after peripartum acquisition of Zika virus infection, French Polynesia, 2013–2014. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1421–1423. [CrossRef]
36. Inman, J.L.; Robertson, C.; Mott, J.D.; Bissell, M.J. Mammary gland development: Cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* **2015**, *142*, 1028–1042. [CrossRef]
37. Toniolo, A.; Serra, C.; Conaldi, P.G.; Basolo, F.; Falcone, V.; Dolei, A. Productive HIV-1 infection of normal human mammary epithelial cells. *AIDS* **1995**, *9*, 859–866. [CrossRef]
38. Dorosko, S.M.; Connor, R.I. Primary human mammary epithelial cells endocytose HIV-1 and facilitate viral infection of CD4 + T lymphocytes. *J. Virol.* **2010**, *84*, 10533–10542. [CrossRef]
39. Percher, F.; Jeannin, P.; Martin-Latil, S.; Gessain, A.; Afonso, P.V.; Vidy-Roche, A.; Ceccaldi, P.-E. Mother-to-child transmission of HTLV-1 epidemiological aspects, mechanisms and determinants of mother-to-child transmission. *Viruses* **2016**, *8*, 40. [CrossRef]
40. Southern, Š.O.; Southern, P.J. Persistent HTLV-I infection of breast luminal epithelial cells: A role in HTLV transmission. *Virology* **1998**, *241*, 200–214. [CrossRef] [PubMed]
41. Numazaki, K. Human cytomegalovirus infections in premature infants by breastfeeding. *Afr. J. Biotechnol.* **2005**, *4*, 867–872.
42. Wu, C.A.; Paveglio, S.A.; Lingenheld, E.G.; Zhu, L.; Lefrançois, L.; Puddington, L. Transmission of murine cytomegalovirus in breast milk: A model of natural infection in neonates. *J. Virol.* **2011**, *85*, 5115–5124. [CrossRef] [PubMed]
43. Hubert, M.; Chiche, A.; Legros, V.; Jeannin, P.; Montange, T.; Gessain, A.; Ceccaldi, P.-E.; Vidy, A. Productive infection of mouse mammary glands and human mammary epithelial cells by Zika virus. *Viruses* **2019**, *11*, 950. [CrossRef]
44. Regla-Nava, J.A.; Viramontes, K.M.; Vozdolska, T.; Huynh, A.-T.; Villani, T.; Gardner, G.; Johnson, M.; Ferro, P.J.; Shresta, S.; Kim, K. Detection of Zika virus in mouse mammary gland and breast milk. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007080. [CrossRef] [PubMed]
45. Witkowska-Zimny, M.; Kaminska-El-Hassan, E. Cells of human breast milk. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2017**, *22*, 1–11. [CrossRef]
46. Uwaezuoke, S.N.; Eneh, C.I.; Ndu, I.K. Relationship between exclusive breastfeeding and lower risk of childhood obesity: A narrative review of published evidence. *Clin. Med. Insights Pediatr.* **2017**, *11*, 117955651769019. [CrossRef] [PubMed]
47. Koulinska, I.N.; Villamor, E.; Chaplin, B.; Msamanga, G.; Fawzi, W.; Renjifo, B.; Essex, M. Transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 through breast-feeding. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2006**, *41*, 93–99. [CrossRef] [PubMed]
48. Clarke, N.; May, J. Effect of antimicrobial factors in human milk on rhinoviruses and milk-borne cytomegalovirus in vitro. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49*, 719–723. [CrossRef] [PubMed]
49. Santiana, M.; Ghosh, S.; Ho, B.; Rajasekaran, V.; Du, W.-L.; Mutsafi, Y.; De Jésus-Diaz, D.A.; Sosnovtsev, S.V.; Levenson, E.A.; Parra, G.I.; et al. Vesicle-cloaked virus clusters are optimal units for inter-organismal viral transmission. *Cell Host Microbe* **2018**, *24*, 208–220.e8. [CrossRef]
50. Wahl, A.; Swanson, M.D.; Nochi, T.; Olesen, R.; Denton, P.W.; Chateau, M.; Garcia, J.V. Human breast milk and antiretrovirals dramatically reduce oral HIV-1 transmission in BLT humanized mice. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002732. [CrossRef]
51. Mabuka, J.; Nduati, R.; Odem-Davis, K.; Peterson, D.; Overbaugh, J. HIV-specific antibodies capable of ADCC are common in breastmilk and are associated with reduced risk of transmission in women with high viral loads. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002739. [CrossRef]
52. Puddu, P.; Borghi, P.; Gessani, S.; Valenti, P.; Belardelli, F.; Seganti, L. Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30*, 1055–1063. [CrossRef]
53. Harmsen, M.C.; Swart, P.J.; de Béthune, M.P.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; The, T.H.; Meijer, D.K. Antiviral effects of plasma and milk proteins: Lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J. Infect. Dis.* **1995**, *172*, 380–388. [CrossRef]

54. Wiktor, S.Z.; Pate, E.J.; Rosenberg, P.; Barnett, M.; Palmer, P.; Medeiros, D.; Maloney, E.M.; Blattner, W.A. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding. *J. Hum. Virol.* **1997**, *1*, 37–44.
55. Ikeda, M.; Sugiyama, K.; Tanaka, T.; Tanaka, K.; Sekihara, H.; Shimotohno, K.; Kato, N. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *245*, 549–553. [CrossRef]
56. Ikeda, M.; Nozaki, A.; Sugiyama, K.; Tanaka, T.; Naganuma, A.; Tanaka, K.; Sekihara, H.; Shimotohno, K.; Saito, M.; Kato, N. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res.* **2000**, *66*, 51–63. [CrossRef]
57. Superti, F.; Ammendolia, M.G.; Valenti, P.; Seganti, L. Antirotaviral activity of milk proteins: Lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med. Microbiol. Immunol.* **1997**, *186*, 83–91. [CrossRef]
58. Marchetti, M.; Superti, F.; Ammendolia, M.G.; Rossi, P.; Valenti, P.; Seganti, L. Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese and zinc saturated lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.* **1999**, *187*, 199–204. [CrossRef]
59. Moriuchi, M.; Moriuchi, H. A milk protein lactoferrin enhances human T cell leukemia virus type I and suppresses HIV-1 infection. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 4231–4236. [CrossRef]
60. Hammer, J.; Haaheim, H.; Gutteberg, T.J. Bovine lactoferrin is more efficient than bovine lactoferricin in inhibiting HSV-I/-II replication in vitro. In *Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Proceedings of the 4th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Sapporo, Japan, 18–22 May 1999*; Elsevier Science BV: Amsterdam, The Netherlands, 2000; Volume 1195, pp. 239–243.
61. Marchetti, M.; Longhi, C.; Conte, M.P.; Pisani, S.; Valenti, P.; Seganti, L. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells. *Antivir. Res.* **1996**, *29*, 221–231. [CrossRef]
62. Marchetti, M.; Pisani, S.; Antonini, G.; Valenti, P.; Seganti, L.; Orsi, N. Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit in vitro replication of herpes simplex virus type 1 and 2. *BioMetals* **1998**, *11*, 89–94. [CrossRef]
63. Siciliano, R.; Regaa, B.; Marchettib, M.; Segantib, L.; Antoninic, G.; Valenti, P. Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of herpes simplex virus type 1 infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *264*, 19–23. [CrossRef] [PubMed]
64. Hasegawa, K.; Motsuchi, W.; Tanaka, S.; Dosako, S.-I. Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **1994**, *47*, 73–85. [CrossRef]
65. Swart, P.J.; Kuipers, E.M.; Smit, C.; Van Der Strate, B.W.; Harmsen, M.C.; Meijer, D.K. Lactoferrin. Antiviral activity of lactoferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *443*, 205–213. [PubMed]
66. Swart, P.J.; Harmsen, M.C.; Kuipers, M.E.; Van Dijk, A.A.; Van Der Strate, B.W.; Van Berkel, P.H.; Nuijens, J.H.; Smit, C.; Witvrouw, M.; De Clercq, E.; et al. Charge modification of plasma and milk proteins results in antiviral active compounds. *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 563–576. [CrossRef]
67. Yi, M.; Kaneko, S.; Yu, D.Y.; Murakami, S. Hepatitis C virus envelope proteins bind lactoferrin. *J. Virol.* **1997**, *71*, 5997–6002. [CrossRef]
68. Swart, P.; Kuipers, M.; Smit, C.; Pauwels, R.; De Béthune, M.; De Clercq, E.; Meijer, D.; Huisman, J. Antiviral effects of milk proteins: Acylation results in polyanionic compounds with potent activity against human immunodeficiency virus types 1 and 2 in vitro. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1996**, *12*, 769–775. [CrossRef]
69. Damiens, E.; Yazidi, I.E.; Mazurier, J.; Elass-Rochard, E.; Duthille, I.; Spik, G.; Boilly-Marer, Y. Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Eur. J. Cell Biol.* **1998**, *77*, 344–351. [CrossRef]
70. Mann, D.M.; Romm, E.; Migliorini, M. Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23661–23667. [CrossRef]
71. Van Berkel, P.H.C.; Geerts, E.J.M.; Van Veen, A.H.; Mericskay, M.; De Boer, A.H.; Nuijens, H.J. N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem. J.* **1997**, *328*, 145–151. [CrossRef]
72. Zou, S.; Magura, C.; Hurley, W. Heparin-binding properties of lactoferrin and lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem.* **1992**, *103*, 889–895. [CrossRef]
73. Ng, T.; Lam, T.; Au, T.; Ye, X.; Wan, C. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase by bovine milk proteins. *Life Sci.* **2001**, *69*, 2217–2223. [CrossRef]
74. Moriuchi, M.; Moriuchi, H. Induction of lactoferrin gene expression in myeloid or mammary gland cells by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax: Implications for milk-borne transmission of HTLV-1. *J. Virol.* **2006**, *80*, 7118–7126. [CrossRef]
75. Welsh, J.K.; Skurrie, I.J.; May, J.T. Use of Semliki forest virus to identify lipid-mediated antiviral activity and anti-alphavirus immunoglobulin A in human milk. *Infect. Immun.* **1978**, *19*, 395–401. [CrossRef]
76. Thormar, H.; Isaacs, C.E.; Brown, H.R.; Barshatzky, M.R.; Pessolano, T. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 27–31. [CrossRef] [PubMed]
77. Pfaender, S.; Heyden, J.; Friesland, M.; Ciesek, S.; Ejaz, A.; Steinmann, J.; Steinmann, J.; Malarski, A.; Stoiber, H.; Tsiavaliaris, G.; et al. Inactivation of hepatitis C virus infectivity by human breast milk. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1943–1952. [CrossRef] [PubMed]
78. Isaacs, C.E.; Thormar, H.; Pessolano, T. Membrane-disruptive effect of human milk: Inactivation of enveloped viruses. *J. Infect. Dis.* **1986**, *154*, 966–971. [CrossRef]

79. Kohn, A.; Gitelman, J.; Inbar, M. Unsaturated free fatty acids inactivate animal enveloped viruses. *Arch. Virol.* **1980**, *66*, 301–307. [CrossRef] [PubMed]
80. Pfaender, S.; Vielle, N.J.; Ebert, N.; Steinmann, E.; Alves, M.P.; Thiel, V. Inactivation of Zika virus in human breast milk by prolonged storage or pasteurization. *Virus Res.* **2017**, *228*, 58–60. [CrossRef] [PubMed]
81. Conzelmann, C.; Zou, M.; Groß, R.; Harms, M.; Röcker, A.; Riedel, C.U.; Münch, J.; Müller, J.A. Storage-dependent generation of potent anti-ZIKV activity in human breast milk. *Viruses* **2019**, *11*, 591. [CrossRef]
82. Waarts, B.L.; Aneke, O.J.C.; Smit, J.M.; Kimata, K.; Bittman, R.; Meijer, D.K.F.; Wilschut, J. Antiviral activity of human lactoferrin: Inhibition of alphavirus interaction with heparan sulfate. *Virology* **2005**, *333*, 284–292. [CrossRef]
83. Chien, Y.-J.; Chen, W.-J.; Hsu, W.-L.; Chiou, S.-S. Bovine lactoferrin inhibits Japanese encephalitis virus by binding to heparan sulfate and receptor for low density lipoprotein. *Virology* **2008**, *379*, 143–151. [CrossRef]
84. Carvalho, C.; Sousa, I.P.; Silva, J.; Oliveira, A.C.; Gonçalves, R.B.; Gomes, A.M. Inhibition of Mayaro virus infection by bovine lactoferrin. *Virology* **2014**, *452–453*, 297–302. [CrossRef]
85. Chen, J.-M.; Fan, Y.-C.; Lin, J.-W.; Chen, Y.-Y.; Hsu, W.-L.; Chiou, S.-S. Bovine lactoferrin inhibits dengue virus infectivity by interacting with heparan sulfate, low-density lipoprotein receptor, and DC-SIGN. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1957. [CrossRef]
86. Pietrantoni, A.; Fortuna, C.; Remoli, M.E.; Ciufolini, M.G.; Superti, F. Bovine lactoferrin inhibits Toscana virus infection by binding to heparan sulphate. *Viruses* **2015**, *7*, 480–495. [CrossRef]
87. Carvalho, C.; Casseb, S.M.M.; Gonçalves, R.B.; Silva, E.V.P.; Gomes, A.M.O.; Vasconcelos, P.F.C. Bovine lactoferrin activity against Chikungunya and Zika viruses. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 1749–1754. [CrossRef] [PubMed]
88. Kim, S.Y.; Li, B.; Linhardt, R.J. Pathogenesis and inhibition of flaviviruses from a carbohydrate perspective. *Pharmaceuticals* **2017**, *10*, 44. [CrossRef] [PubMed]
89. Francese, R.; Civra, A.; Donalisio, M.; Volpi, N.; Capitani, F.; Sottemano, S.; Tonetto, P.; Coscia, A.; Maiocco, G.; Moro, G.E.; et al. Anti-Zika virus and anti-Usutu virus activity of human milk and its components. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, 1–24. [CrossRef]
90. Reagan, R.L.; Brueckner, A.L.; Yancey, F.S. Studies of dengue fever virus (Hawaii mouse adapted) in lactating hamsters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1956**, *5*, 809–811. [CrossRef]
91. Friis, H.; Andersen, H.K. Rate of inactivation of cytomegalovirus in raw banked milk during storage at −20 degrees C and pasteurisation. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.* **1982**, *285*, 1604–1605. [CrossRef] [PubMed]
92. Welsh, J.K.; Arsenakis, M.; Coelen, R.J.; May, J.T. Effect of antiviral lipids, heat, and freezing on the activity of viruses in human milk. *J. Infect. Dis.* **1979**, *140*, 322–328. [CrossRef]
93. Goldblum, R.M.; Dill, C.W.; Albrecht, T.B.; Alford, E.S.; Garza, C.; Goldman, A.S. Rapid high-temperature treatment of human milk. *J. Pediatr.* **1984**, *104*, 380–385. [CrossRef]
94. Hamprecht, K.; Maschmann, J.; Muller, D.; Dietz, K.; Besenthal, I.; Goelz, R.; Middeldorp, J.M.; Speer, C.P.; Jahn, G. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: Reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr. Res.* **2004**, *56*, 529–535. [CrossRef]
95. Dworsky, M.; Stagno, S.; Pass, R.F.; Cassady, G.; Alford, C. Persistence of cytomegalovirus in human milk after storage. *J. Pediatr.* **1982**, *101*, 440–443. [CrossRef]
96. Curtis, N.; Chau, L.; Garland, S.; Tabrizi, S.; Alexander, R.; Morley, C. Cytomegalovirus remains viable in naturally infected breast milk despite being frozen for 10 days. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **2005**, *90*. [CrossRef]
97. Lawrence, R. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatr.* **2007**, *88*, 14–18. [CrossRef] [PubMed]
98. Orloff, S.L.; Wallingford, J.C.; McDougal, J.S. Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: Effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *J. Hum. Lact.* **1993**, *9*, 13–17. [CrossRef]
99. Ford, J.; Law, B.; Marshall, V.M.; Reiter, B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. *J. Pediatr.* **1977**, *90*, 29–35. [CrossRef]
100. Van Zoeren-Grobben, D.; Schrijver, J.; Berg, H.V.D.; Berger, H.M. Human milk vitamin content after pasteurisation, storage, or tube feeding. *Arch. Dis. Child.* **1987**, *62*, 161–165. [CrossRef] [PubMed]
101. Björkstén, B.; Burman, L.G.; De Château, P.; Fredrikzon, B.; Gothefors, L.; Hernell, O. Collecting and banking human milk: To heat or not to heat? *Br. Med. J.* **1980**, *281*, 765–769. [CrossRef]
102. Jeffery, B.S.; Webber, L.; Mokhondo, K.R.; Erasmus, D. Determination of the effectiveness of inactivation of human immunodeficiency virus by Pretoria pasteurization. *J. Trop. Pediatr.* **2001**, *47*, 345–349. [CrossRef]
103. Israel-Ballard, K.; Chantry, C.; Dewey, K.; Lönnerdal, B.; Sheppard, H.; Donovan, R.; Carlson, J.; Sage, A.; Abrams, B. Viral, nutritional, and bacterial safety of flash-heated and Pretoria-pasteurized breast milk to prevent mother-to-child transmission of HIV in resource-poor countries. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2005**, *40*, 175–181. [CrossRef]
104. Israel-Ballard, K.; Donovan, R.; Chantry, C.; Coutsoudis, A.; Sheppard, H.; Sibeko, L.; Abrams, B. Flash-heat inactivation of HIV-1 in human milk: A potential method to reduce postnatal transmission in developing countries. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2007**, *45*, 318–323. [CrossRef] [PubMed]
105. Israel-Ballard, K.A.; Abrams, B.F.; Coutsoudis, A.; Sibeko, L.N.; Cheryk, L.A.; Chantry, C.J. Vitamin content of breast milk from HIV-1-infected mothers before and after flash-heat treatment. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2008**, *48*, 444–449. [CrossRef]
106. Slater, M.; Stringer, E.M.; Stringer, J.S.A. Breastfeeding in HIV-positive women: What can be recommended? *Pediatr. Drugs* **2010**, *12*, 1–9. [CrossRef]

107. Ando, Y.; Kakimoto, K.; Tanigawa, T.; Furuki, K.; Saito, K.; Nakano, S.; Hashimoto, H.; Moriyama, I.; Ichijo, M.; Toyama, T. Effect of freeze-thawing breast milk on vertical HTLV-I transmission from seropositive mothers to children. *Jpn. J. Cancer Res.* **1989**, *80*, 405–407. [CrossRef]
108. Hino, S. Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): The ATL prevention program Nagasaki. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2011**, *87*, 152–166. [CrossRef] [PubMed]
109. Hino, S.; Katamine, S.; Miyata, H.; Tsuji, Y.; Yamabe, T.; Miyamoto, T. Primary prevention of HTLV-I in Japan. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovir.* **1996**, *13*. [CrossRef]
110. LaMantia, A.-S.; Moody, S.; Maynard, T.M.; Karpinski, B.A.; Zohn, I.E.; Mendelowitz, D.; Lee, N.H.; Popratiloff, A. Hard to swallow: Developmental biological insights into pediatric dysphagia. *Dev. Biol.* **2016**, *409*, 329–342. [CrossRef]
111. Perry, M.; Whyte, A. Immunology of the tonsils. *Immunol. Today* **1998**, *19*, 414–421. [CrossRef]
112. Dawson, D.R.; Wang, C.; Danaher, R.J.; Lin, Y.; Kryscio, R.J.; Jacob, R.J.; Miller, C.S. Salivary levels of Epstein-Barr virus DNA correlate with subgingival levels, not severity of periodontitis. *Oral Dis.* **2009**, *15*, 554–559. [CrossRef] [PubMed]
113. Hadinoto, V.; Shapiro, M.; Sun, C.C.; Thorley-Lawson, D.A. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*. [CrossRef] [PubMed]
114. Imbronito, A.V.; Grande, S.R.; De Freitas, N.M.; Okuda, O.; Lotufo, R.F.M.; Nunes, F.D. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: Comparison of three sampling methods. *J. Oral Sci.* **2008**, *50*, 25–31. [CrossRef]
115. Jiang, R.; Scott, R.S.; Hutt-Fletcher, L.M. Epstein-Barr virus shed in saliva is high in B-cell-tropic glycoprotein gp42. *J. Virol.* **2006**, *80*, 7281–7283. [CrossRef]
116. Tugizov, S.M.; Herrera, R.; Palefsky, J.M. Epstein-Barr virus transcytosis through polarized oral epithelial cells. *J. Virol.* **2013**, *87*, 8179–8194. [CrossRef]
117. Pegtel, D.M.; Middeldorp, J.; Thorley-Lawson, D.A. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J. Virol.* **2004**, *78*, 12613–12624. [CrossRef]
118. Temple, R.M.; Zhu, J.; Budgeon, L.; Christensen, N.D.; Meyers, C.; Sample, C.E. Efficient replication of Epstein-Barr virus in stratified epithelium in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 16544–16549. [CrossRef]
119. Frankel, S.S.; Wenig, B.M.; Burke, A.P.; Mannan, P.; Thompson, L.D.R.; Abbondanzo, S.L.; Nelson, A.M.; Pope, M.; Steinman, R.M. Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* **1996**, *272*, 115–117. [CrossRef]
120. Frankel, S.S.; Tenner-Racz, K.; Racz, P.; Wenig, B.M.; Hansen, C.H.; Heffner, D.; Nelson, A.M.; Pope, M.; Steinman, R.M. Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am. J. Pathol.* **1997**, *151*, 89–96. [PubMed]
121. Glushakova, S.; Baibakov, B.; Margolis, L.B.; Zimmerberg, J. Infection of human tonsil histocultures: A model for HIV pathogenesis. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1320–1322. [CrossRef]
122. Soto-Rivera, J.; Patterson, B.K.; Chen, Y.; Shen, C.; Ratner, D.; Ding, M.; Tumne, A.; Gupta, P. Study of HIV-1 transmission across cervical mucosa to tonsil tissue cells using an organ culture. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2013**, *69*, 52–63. [CrossRef]
123. Maher, D.; Schacker, T.; Larson, M.; Wu, X.; Southern, P. A model system of oral HIV exposure, using human palatine tonsil, reveals extensive binding of HIV infectivity, with limited progression to primary infection. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 1989–1997. [CrossRef]
124. Stahl-Hennig, C.; Steinman, R.M.; Tenner-Racz, K.; Pope, M.; Stolte, N.; Mätz-Rensing, K.; Grobschupff, G.; Raschdorff, B.; Hunsmann, G.; Racz, P. Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. *Science* **1999**, *285*, 1261–1265. [CrossRef] [PubMed]
125. Kia'i, N.; Bajaj, T. *Histology, Respiratory Epithelium*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2019.
126. Sajjan, U.; Wang, Q.; Zhao, Y.; Gruenert, D.C.; Hershenson, M.B. Rhinovirus disrupts the barrier function of polarized airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *178*, 1271–1281. [CrossRef]
127. Chilvers, M.; Mckean, M.; Rutman, A.; Myint, B.; Silverman, M.; O'Callaghan, C. The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur. Respir. J.* **2001**, *18*, 965–970. [CrossRef] [PubMed]
128. Hocke, A.C.; Becher, A.; Knepper, J.; Peter, A.; Holland, G.; Tönnies, M.; Bauer, T.T.; Schneider, P.; Neudecker, J.; Muth, D.; et al. Emerging human middle east respiratory syndrome coronavirus causes widespread infection and alveolar damage in human lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2013**, *188*, 882–886. [CrossRef]
129. Kast, J.I.; McFarlane, A.J.; Głobińska, A.; Sokolowska, M.; Wawrzyniak, P.; Sanak, M.; Schwarze, J.; Akdis, C.A.; Wanke, K. Respiratory syncytial virus infection influences tight junction integrity. *Clin. Exp. Immunol.* **2017**, *190*, 351–359. [CrossRef]
130. Smallcombe, C.C.; Linfield, D.T.; Harford, T.; Bokun, V.; Ivanov, A.I.; Piedimonte, G.; Rezaee, F. Disruption of the airway epithelial barrier in a murine model of respiratory syncytial virus infection. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2019**, *316*, L358–L368. [CrossRef]
131. Short, K.; Kasper, J.; Van Der Aa, S.; Andeweg, A.C.; Zaaraoui-Boutahar, F.; Goeijenbier, M.; Richard, M.; Herold, S.; Becker, C.; Scott, D.P.; et al. Influenza virus damages the alveolar barrier by disrupting epithelial cell tight junctions. *Eur. Respir. J.* **2016**, *47*, 954–966. [CrossRef]
132. Tao, X.; Hill, T.E.; Morimoto, C.; Peters, C.J.; Ksiazek, T.G.; Tseng, C.-T.K. Bilateral entry and release of Middle East respiratory syndrome coronavirus induces profound apoptosis of human bronchial epithelial cells. *J. Virol.* **2013**, *87*, 9953–9958. [CrossRef] [PubMed]

133. Vielle, N.J.; García-Nicolás, O.; Esteves, B.I.O.; Brügger, M.; Summerfield, A.; Alves, M.P. The human upper respiratory tract epithelium is susceptible to flaviviruses. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 811. [CrossRef] [PubMed]
134. Blank, C.A.; Anderson, D.A.; Beard, M.; Lemon, S.M. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: Vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J. Virol.* **2000**, *74*, 6476–6484. [CrossRef] [PubMed]
135. Fotopoulos, G.; Harari, A.; Michetti, P.; Trono, D.; Pantaleo, G.; Kraehenbuhl, J.-P. Transepithelial transport of HIV-1 by M cells is receptor-mediated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*. [CrossRef]
136. Dickman, K.G.; Hempson, S.J.; Anderson, J.; Lippe, S.; Zhao, L.; Burakoff, R.; Shaw, R.D. Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2000**, *279*. [CrossRef]
137. Maidji, E.; Somsouk, M.; Rivera, J.M.; Hunt, P.W.; Stoddart, C.A. Replication of CMV in the gut of HIV-infected individuals and epithelial barrier dysfunction. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*. [CrossRef]
138. Bomsel, M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 42–47. [CrossRef] [PubMed]
139. Martin-Latil, S.; Gnädig, N.F.; Mallet, A.; Desdouits, M.; Guivel-Benhassine, F.; Jeannin, P.; Prevost, M.-C.; Schwartz, O.; Gessain, A.; Ozden, S.; et al. Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood* **2012**, *120*, 572–580. [CrossRef]
140. Ouzilou, L.; Caliot, E.; Pelletier, I.; Prévost, M.-C.; Pringault, E.; Colbère-Garapin, F. Poliovirus transcytosis through M-like cells. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 2177–2182. [CrossRef]
141. Gonzalez-Hernandez, M.B.; Liu, T.; Blanco, L.P.; Auble, H.; Payne, H.C.; Wobus, C.E. Murine norovirus transcytosis across an in vitro polarized murine intestinal epithelial monolayer is mediated by M-like cells. *J. Virol.* **2013**, *87*, 12685–12693. [CrossRef]
142. Martin-Latil, S.; Mousson, L.; Autret, A.; Colbeère-Garapin, F.; Blondel, B. Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway. *J. Virol.* **2007**, *81*, 4457–4464. [CrossRef] [PubMed]
143. Bomsel, M.; Heyman, M.; Hocini, H.; Lagaye, S.; Belec, L.; Dupont, C.; Desgranges, C. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* **1998**, *9*, 277–287. [CrossRef]
144. Takahashi, Y.; Misumi, S.; Muneoka, A.; Masuyama, M.; Tokado, H.; Fukuzaki, K.; Takamune, N.; Shoji, S. Nonhuman primate intestinal villous M-like cells: An effective poliovirus entry site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *368*, 501–507. [CrossRef] [PubMed]
145. Gonzalez-Hernandez, M.B.; Liu, T.; Payne, H.C.; Stencel-Baerenwald, J.E.; Ikizler, M.; Yagita, H.; Dermody, T.S.; Williams, I.R.; Wobus, C.E. Efficient norovirus and reovirus replication in the mouse intestine requires microfold (M) cells. *J. Virol.* **2014**, *88*, 6934–6943. [CrossRef]
146. Miclat, N.N.; Hodgkinson, R.; Marx, G.F. Neonatal gastric pH. *Anesth. Analg.* **1978**, *57*, 98–101. [CrossRef]
147. Müller, J.A.; Harms, M.; Schubert, A.; Jansen, S.; Michel, D.; Mertens, T.; Schmidt-Chanasit, J.; Münch, J. Inactivation and environmental stability of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1685–1687. [CrossRef]
148. Gresikova-Kohutova, M. Effect of pH on infectivity of the tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol.* **1959**, *3*, 159–167. [PubMed]
149. Pogodina, V.V. The resistance of tick-borne encephalitis virus to the effects of gastric juice. *Probl. Virol.* **1958**, *3*, 295–299.
150. Yu, C.; Achazi, K.; Moller, L.; Schulzke, J.D.; Niedrig, M.; Bücker, R. Tick-borne encephalitis virus replication, intracellular trafficking, and pathogenicity in human intestinal caco-2 cell monolayers. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e096957. [CrossRef] [PubMed]
151. Hubert, M.; Jeannin, P.; Burlaud-Gaillard, J.; Roingeard, P.; Gessain, A.; Ceccaldi, P.-E.; Vidy, A. Evidence that Zika virus is transmitted by breastfeeding to newborn A129 (Ifnar1 knock-out) mice and is able to infect and cross a tight monolayer of human intestinal epithelial cells. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. [CrossRef]
152. Jennings, A.D.; Gibson, C.A.; Miller, B.R.; Mathews, J.H.; Mitchell, C.J.; Roehrig, J.T.; Wood, D.J.; Taffs, F.; Sil, B.K.; Whitby, S.N.; et al. Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine-associated human encephalitis. *J. Infect. Dis.* **1994**, *169*, 512–518. [CrossRef]
153. Miller, B.R.; Adkins, D. Biological characterization of plaque-size variants of yellow fever virus in mosquitoes and mice. *Acta Virol.* **1988**, *32*, 227–234. [PubMed]
154. Whitman, L. Failure of Aëdes aegypti to transmit yellow fever cultured virus (17D) 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1939**, *s1-19*, 19–26. [CrossRef]
155. McElroy, K.L.; Tsetsarkin, K.A.; VanLandingham, D.L.; Higgs, S. Role of the yellow fever virus structural protein genes in viral dissemination from the Aedes aegypti mosquito midgut. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 2993–3001. [CrossRef]
156. Willingham, K.; McNulty, E.; Anderson, K.; Hayes-Klug, J.; Nalls, A.; Mathiason, C. Milk collection methods for mice and Reeves' muntjac deer. *J. Vis. Exp.* **2014**, 89. [CrossRef]
157. Depeters, E.J.; Hovey, R.C. Methods for collecting milk from mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2009**, *14*, 397–400. [CrossRef]
158. Muranishi, Y.; Parry, L.; Averous, J.; Terrisse, A.; Maurin, A.-C.; Chaveroux, C.; Mesclon, F.; Carraro, V.; Bruhat, A.; Fafournoux, P.; et al. Method for collecting mouse milk without exogenous oxytocin stimulation. *Biotechniques* **2016**, *60*, 47–49. [CrossRef] [PubMed]
159. Reagan, R.L.; Yancey, F.S.; Chang, S.C.; Brueckner, A.L. Transmission of West Nile (B956 strain) and Semliki forest virus (MBB26146-M-404744-958 strain) to suckling hamsters during lactation. *J. Immunol.* **1956**, *76*, 243–245. [PubMed]
160. 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.* **2010**, *151*, 240–243. [CrossRef] [PubMed]

viruses

MDPI

Article

Excretion of Cell-Free and Cell-Associated Zika Virus into Breast Milk of Infected Dams and Identification of Antiviral Factors

Sophie Desgraupes, Patricia Jeannin, Antoine Gessain, Pierre-Emmanuel Ceccaldi * and Aurore Vidy *

Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR 3569, Unité Épidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, F-75015 Paris, France; sophie.desgraupes@pasteur.fr (S.D.); patricia.jeannin@pasteur.fr (P.J.); antoine.gessain@pasteur.fr (A.G.)

* Correspondence: pierre-emmanuel.ceccaldi@pasteur.fr (P.-E.C.); aurore.vidy@pasteur.fr (A.V.)

Abstract: Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne RNA virus belonging to the *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family. During the 60 years following its discovery in 1947, ZIKV caused little concern for public health as the associated infection was reported as mostly asymptomatic or inducing mild symptoms. However, since 2013, severe neurological symptoms have been associated with ZIKV infection, compelling the World Health Organization to declare a Public Health Emergency of International Concern. Among those symptoms, neurological birth defects may affect children born to mothers infected during pregnancy. Additionally, during the past 8 years, ZIKV transmission through breastfeeding has repeatedly been suggested in epidemiological studies and demonstrated on a mouse model by our team. To better understand the biological factors controlling ZIKV transmission through breastfeeding, we investigated the nature of the viral entities excreted in the breast milk of infected dams and evaluated viral transmission to breastfed pups. We show that both cell-free and cell-associated virus is excreted into breast milk and that ZIKV is efficiently transmitted to the breastfed pups. Additionally, we studied murine breast milk cell types, and identified a majority of mammary luminal cells. Finally, we investigated the effect on ZIKV infectivity of several breast milk components that are antiviral against different viruses such as lactoferrin (LF) and lactalbumin (LA), or free fatty acids (FFA). We showed no effect of LF and LA, whereas FFA inactivated the virus. These results bring new insight concerning the mechanisms of ZIKV transmission during breastfeeding and identify biological factors modulating it. These elements should be considered in risk assessment of ZIKV mother-to-child transmission.

Keywords: mother-to-child transmission; breastfeeding; milk cells; antiviral; fatty acids

check for updates

Citation: Desgraupes, S.; Jeannin, P.; Gessain, A.; Ceccaldi, P.-E.; Vidy, A. Excretion of Cell-Free and Cell-Associated Zika Virus into Breast Milk of Infected Dams and Identification of Antiviral Factors. *Viruses* **2022**, *14*, 851. https://doi.org/10.3390/v14050851

Academic Editor: Chao Shan

Received: 10 February 2022
Accepted: 17 April 2022
Published: 20 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

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) belonging to the *Flaviviridae* family and to the *Flavivirus* genus. It was first identified in 1947 in the Zika forest in Uganda and caused little concern for public health as ZIKV infection was reported as being mostly asymptomatic or associated with mild symptoms. During the following 60 years, only 14 human cases were reported in Southeast Asia and Africa [1]. In 2007, the first Zika fever outbreak ever described occurred in Yap islands, resulting in the infection of approximatively 5000 inhabitants (73% of the population) [2]. An even larger outbreak occurred in 2013–2014 in French Polynesia, causing approximatively 28,000 estimated cases of infection [3]. Two small outbreaks occurred that same year in New Caledonia where 1400 cases were described and in the Cook Islands where over 900 cases were reported [4]. Following the introduction of ZIKV in Brazil in 2015 [5], a large outbreak happened causing 440,000 to 1,300,000 cases [6], thus compelling the World Health Organization to declare a "Public Health Emergency of International Concern".

As 80% of ZIKV infected individuals remain asymptomatic, the number of cases estimated during these epidemics is undervalued. After a small incubation period, 20% of infected people developed mild symptoms such as fever, skin rashes, and joint pain. However, since 2013, severe neurological symptoms have been associated with ZIKV infection [7]. In adults, Guillain–Barre syndrome (GBS) is the most common neurological complication, but other pathologies have been reported such as sensory polyneuropathy, sensory neuronopathy [7], and meningitis [8]. During the French Polynesian outbreak, the risk of developing a ZIKV-related GBS was estimated to be 0.24 per 1000 cases of infection [9]. Neurological birth defects, called the congenital Zika syndrome, have also been associated to ZIKV infection: children born to mothers infected during pregnancy can develop severe microcephalies, ocular abnormalities, or show decreased brain tissue [10].

ZIKV is mostly transmitted to humans by *Aedes aegypti* mosquitoes but interhuman transmission can also occur during sexual intercourse or from mother-to-child in utero [11]. During the past 8 years, ZIKV transmission through breastfeeding has repeatedly been suggested in epidemiological studies [12] and has been demonstrated on a mouse model by our team [13]. Epidemiological studies have reported the presence of viral RNA (vRNA) and/or infectious particles in the breast milk of infected mothers as well as viral persistence in breast milk after clearance from the blood stream [12]. In addition, a case of secondary microcephaly was recently reported in a breastfed infant who was negative for ZIKV at birth and showed a normal head circumference. The newborn was exclusively breastfed and ZIKV was isolated in the mother's breast milk [14], raising concern about the transmission of ZIKV during breastfeeding.

Breast milk is mainly composed of water and contains maternal cells, carbohydrates (e.g., lactose), fat, proteins, and minerals [15]. In human breast milk, both breast-derived and blood-derived cells are found. Blood-derived immune cells represent a small minority of the milk cells (<2% in mature human milk), whereas the vast majority come from the mammary gland (luminal, myoepithelial, progenitor, and stem cells). Among those, luminal and myoepithelial cells represent 98% in human milk [16]. The different components of breast milk can be separated by centrifugation into a cell pellet, the lactoserum and the cream fraction. The lactoserum, also called whey, is the liquid fraction rich in proteins, lactose, and minerals, whereas the cream fraction contains the milk fat globules (MFG). The latter are composed of a triple-layered milk fat globule membrane (MFGM) surrounding a triglyceride core [17]. The composition of breast milk varies with different factors such as the species, nutrition, or stage of lactation [15]. Indeed, during the first hours after birth, the breast milk is rich in immunological components and called colostrum, whereas transitional and mature milk produced in the following weeks become richer in nutritional factors and poorer in leukocytes.

Although protective components are transmitted to the newborn during breastfeeding, deleterious factors such as drugs or pathogens can also be passed on. For humans, three viruses are recognized as efficiently transmitted during breastfeeding: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), and cytomegalovirus (CMV) [12]. These milk-borne viruses are excreted in human breast milk in a cell-free (HIV-1 [18], CMV [19]) or cell-associated (HIV-1 [18], CMV [19], HTLV-1 [20]) form and transmitted to the infant, resulting in a chronic infection.

As breast milk components and viral entities are simultaneously present in the milk, their interaction could lead to an enhanced or decreased viral transmission to the newborn during breastfeeding. Indeed, some breast milk components such as prostaglandins [21] have been shown to be proviral, whereas others such as lactoferrin (LF), monolaurin, or free fatty acids [12] are antiviral. Breast milk has been suggested to have an antiviral effect on some arboviruses [22], but it was further shown that the antiviral effect on ZIKV was caused by the storage of breast milk samples at 4 °C [23]. The authors showed that the storage of the samples leads to an increase in the free fatty acid content [24] and suggested a role of the latter in viral inactivation. Although milk stored at 4 °C exerted an antiviral

effect, fresh breast milk from healthy donors was then tested and shown not to inactivate ZIKV [25], raising alarm concerning its transmission during breastfeeding.

Although cases of probable transmission of ZIKV from infected mothers to breastfed newborns have been reported [12], other case reports showed a lack of transmission by breastfeeding [26]. Therefore, biological or genetic factors controlling the transmission should be investigated (viral load, viral form, immunological status, stage of lactation, etc.).

In this paper, by using an established murine model for ZIKV infection [27], we show the infectious nature of breast milk isolated from ZIKV-infected dams and we identify the nature of viral entities in breast milk as being both cell-free and cell-associated. We also determine that the majority of milk cells in murine breast milk are mammary epithelial cells. Finally, we investigate the effect of several breast milk components on ZIKV infectivity (LF, lactalbumin (LA), and free fatty acids) in order to better understand the biological factors regulating the transmission.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Model

A129 mice (129S2/SvPas-Ifnar1tm1Agt) were used to carry out the experiments, a well-established model to study ZIKV infection. They were housed and bred at the animal facilities of the Institut Pasteur which are accredited by the French Ministry of Agriculture for breeding and performing experiments on live rodents.

2.2. Ethics Statement

Experiments on animals were performed in compliance with French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 2010/63, French Law 2013-118, 6 February 2013). All experiments were approved by the Ethics Committee #89 and registered by the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation" under the reference "APAFIS#16119-2018071314475930 v1" (date of approval: 19 November 2018). Use of genetically modified mice (A129) was approved by the institutional instances and the French "Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation" under the reference no. 2194 (date of approval: 6 October 2017).

2.3. Virus Strains and Cell Lines

All experiments were carried out using two ZIKV strains belonging to the Asian lineage (Brazil/2016, GenBank: KU991811; H/PF13, GenBank: KX369547), amplified in Vero E6 cells as previously described [28]. ZIKV suspension was added to Vero E6 cell monolayers at 37 °C and 5% CO_2 for 2 h in DMEM supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After adsorption, the inoculum was removed and replaced by DMEM containing 2% FBS and 10 mM Hepes (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After 2 days of culture, supernatants were centrifuged at 500× *g* for 10 min and aliquoted for storage at −80 °C until titration by plaque forming assay. These supernatants were used as inoculum for animal infections and in vitro experiments.

Vero E6 cells (CRL-1586, ATCC) and Caco-2 cells (Clone TC7, SCC209, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) were grown in DMEM medium supplemented with L-glutamine (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10% FBS, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. They were maintained at 37 °C and 5% CO_2 for culture.

2.4. Mouse Infection and Sample Collection

For in vivo experiments, 6- to 13-week-old A129 females and males were housed and bred for mating according to animal welfare recommendations. Lactating A129 mice were infected subcutaneously from 1 to 11 days post-partum with 10^6 PFU of the Brazil/2016 strain of ZIKV. Blood samples were collected at 3 days post-infection in tubes containing 15 mM EDTA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and subjected to

plaque forming assays and RNA extractions to monitor the mothers' infection. For milk sample collection at 4 days post-infection, the dams were isolated from their pups for 2 h 30 to 3 h to allow the accumulation of milk in the mammary glands. To stimulate the ejection of milk from the alveoli into the lactiferous ducts, the dams were injected intra-peritoneally with 250 µL of ocytocine (Ocytovem, Ceva Santé Animale, Libourne, France) and put in contact with their pups during a few minutes. The dams were watched closely to let the pups start suckling but prevent them from drinking all the breast milk. After stimulation, the dams were anesthetized by intra-peritoneal injection with 100 µL of an anesthetic mix containing 5 mg/kg of xylazine (Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany) and 80 mg/kg of ketamine (Imalgene, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany). Breast milk was collected with a Pasteur pipette by massaging the mammary glands. To evaluate the transmission, spleens were collected from euthanized pups and subjected to RNA extraction and RT-qPCR.

2.5. Milk Fraction Isolation

To separate the different fractions of breast milk, whole milk samples were centrifuged at 5000× *g* for 15 min. The cream fraction, the whey, and the cell pellet were then separated and washed twice in PBS at 5000× *g* for 15 min in order to increase their purity.

2.6. Viral RNA Extraction

vRNAs were extracted from plasma samples (obtained by blood centrifugation at 2000× *g* for 15 min), whole milk, cream fractions, whey fractions, and spleens, using the QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Spleens were stored at −80 °C before vRNA extractions. Spleens were thawed in PBS and dissociated using the Bullet Blender Storm shredder (Dutscher, Bernolsheim, France) in the presence of 3.2 mm steel beads (Next Advance, Troy, MO, USA). Spleen suspensions were centrifuged at 2000× *g* for 10 min and the supernatants were used for vRNA extractions.

2.7. RT-qPCR

Reverse transcription was performed using random hexamers and the Maxima H Minus Reverse-Transcriptase kit (Invitrogen). Quantitative PCR was performed using 5 µL of template cDNA, with 10 µL of MasterMix (iTaq Universal SYBR Green Supermix, Biorad, Hercules, CA, USA), 500 nM of each ZIKV NS5-specific primer (Forward: 5′–AAR TAC ACA TAC CAR AAC AAA GTG GT–3′; Reverse: 5′–TCC RCT CCC YCT YTG GTC TTG–3′), and using the following program: 10 min/95 °C, followed by 40 cycles of 15 s/95 °C, 20 s/60 °C, and 30 s/72 °C (Mastercycler Eppendorf Realplex, Hamburg, Germany). Quantification analysis was realized using a standard curve of a ZIKV-encoding plasmid.

2.8. Viral Titration by Plaque Forming Assays

Vero cell monolayers were exposed to 10-fold dilutions of plasma, whole milk, cream, and whey samples in DMEM-2% FBS during 2 h at 37 °C and 5% CO_2. After viral adsorption, the inocula were removed and replaced with DMEM-2% FBS-1.6% carboxymethyl cellulose. The cells were cultured for 5 days at 37 °C and 5% CO_2. After three washes in PBS, Vero monolayers were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature (RT) and colored with crystal violet (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA).

2.9. Co-Culture

Infectious center assays were performed by co-culturing milk cells with Vero E6 cells after 3-fold dilutions of 1 million milk cells in DMEM-2% FBS for 2 h at 37 °C and 5% CO_2. DMEM-2% FBS-1.6% carboxymethyl cellulose was added and the co-cultures were kept for 6 days at 37 °C and 5% CO_2.

After three washes in PBS, Vero monolayers were fixed in 4% PFA for 15 min at RT and colored with crystal violet.

2.10. Immune Staining and Flow Cytometry

After washing the cell pellets from breast milk samples twice in PBS, anti-mouse CD16/CD32 antibodies (Invitrogen) were added for 20 min at RT in order to block mouse antibody recognition. They were diluted in MACS buffer (FBS-2% EDTA-0.5% BSA) at a ratio of 2:50. After a wash in PBS at 400× *g* for 4 min, the extracellular antigens were stained for 1 h at RT in the dark (ratio 1:50 for antibody:MACS) as follows: anti-mouse CD45 stained with eF450 (Invitrogen), anti-mouse CD24 stained with APC (Invitrogen), and anti-mouse CD49f stained with PE (Invitrogen). The following steps were all performed in the dark. After two washes in PBS, cells were fixed using 4% PFA for 15 min at RT. After two washes in PBS, cells were resuspended in PBS-10% cell fix (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.11. Cytotoxicity Assays

Vero or Caco-2 cells were incubated with DMEM-2% FBS, dimethyl sulfoxide (DMSO), or different concentrations of free fatty acids, LF or LA for 2 h at 37 °C. Cell layers were washed and cultured in DMEM-2% FBS at 37 °C and 5% CO_2. Cell viability was assessed at 48 h of culture by an MTT colorimetric assay (thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich). Cytotoxicity results can be found in Supplementary Figures S1 and S2.

2.12. Viral Particle Incubation with Lactoferrin, Lactalbumin, Ethanol, or DMSO

ZIKV particles were incubated with DMEM-2% FBS or different concentrations of LF, LA, ethanol, or DMSO for 1 h at 37 °C before infection at a multiplicity of infection (MOI) of 1. ZIKV infectivity was assessed using the Caco-2 cell line as, physiologically, ZIKV and breast milk are in contact with the newborn's intestinal barrier. Viral inocula were added to Caco-2 monolayers in DMEM-2% FBS for 2 h at 37 °C and 5% CO_2. The inocula were replaced by DMEM-2% FBS and the cells were cultured at 37 °C and 5% CO_2 for 48 h. Cell layers were washed twice in PBS and subjected to vRNA extraction and RT-qPCR as described above.

2.13. Viral Particle Incubation with Free Fatty Acids

Viral inocula were incubated at 37 °C for 0 h, 1 h, 4 h, or 6 h and titrated in triplicates by plaque forming assays as described below (Tables 1 and 2).

Table 1. Free fatty acids were purchased from Sigma and resuspended at the following concentrations either in ethanol or DMSO.

Fatty Acid	Stock Concentration (mg/mL)	Solvent	Reference
C10:0	30	Ethanol	Sigma C1875
C14:0	12	DMSO	Sigma M3128
C18:0	22	Ethanol	Sigma S4751
C18:1	100	DMSO	Sigma O1008
C18:2	100	DMSO	Sigma L1376
C18:3	100	DMSO	Sigma L2376

Table 2. ZIKV (10^6 PFU) was incubated either with DMEM-2% FBS, 4% PFA, or with the following non-cytotoxic concentrations of free fatty acids.

Fatty Acid	Assay Concentration (mg/mL)	Condition
C10:0	0.6	Physiological [29]
C14:0	2	Physiological [29]
C18:0	2	Physiological [29]
C18:1	4	Maximum non-cytotoxic
C18:2	3.5	Maximum non-cytotoxic
C18:3	0.5	Physiological [29]

2.14. Cell Incubation with Free Fatty Acids, Lactoferrin, or Lactalbumin

Caco-2 cells were incubated with DMEM-2% FBS or different concentrations of free fatty acids, LF, or LA for 1 h at 37 °C before ZIKV infection (MOI 1). Viral inocula were added to Caco-2 monolayers in DMEM-2% FBS for 2 h at 37 °C and 5% CO_2 then replaced by DMEM-2% FBS. The cells were cultured at 37 °C and 5% CO_2 for 48 h. Cell layers were washed twice in PBS and subjected to vRNA extraction and RT-qPCR as described above. The results can be found in Supplementary Figure S4.

2.15. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using Prism 9.1.0 software. The number of experiments and the statistical tests used are detailed in the legends of the figures and presented as mean ± SD.

3. Results

3.1. ZIKV Is Efficiently Transmitted to Breastfed Pups

In order to study the transmission of ZIKV to breastfed newborn pups, 6- to 13-week-old female mice were mated with male mice. They were infected once with ZIKV (10^6 PFU) through the subcutaneous route, between 1 and 11 days post-partum depending on the day of parturition. Infection was assessed by RT-qPCR and plaque assays performed on plasma samples collected at 3 days post-infection. Breast milk samples and pup spleens were collected at 4 days post-infection in order to investigate the presence of ZIKV (Figure 1A). Plasma samples were obtained by blood centrifugation and approximately 10^5 vRNA copies were detected per microliter of plasma and 10^8 infectious particles per milliliter of plasma, confirming the infection of the dams with ZIKV (Figure 1B).

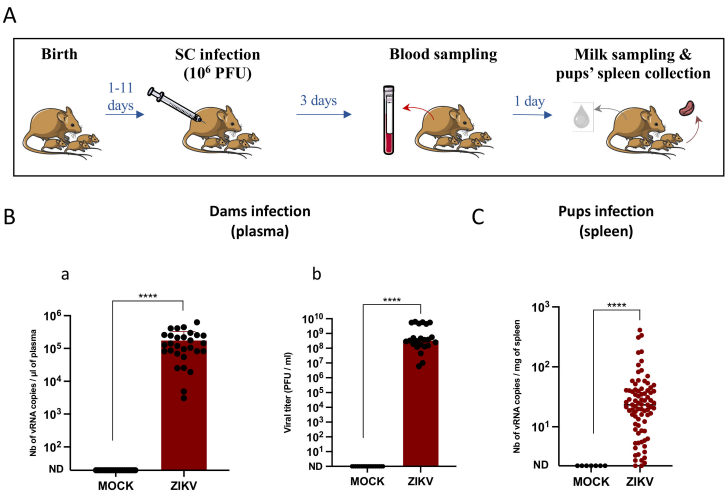


Figure 1. ZIKV is efficiently transmitted to breastfed pups. (**A**): Methodology of in vivo infections and sample collection for all mouse experiments. Female A129 dams were infected at 1 to 11 days post-partum with 10^6 PFU of the Brazil/2016 strain of Zika virus (ZIKV) through the subcutaneous route (SC). Blood samples were collected from the dams at 3 days post-infection to assess ZIKV infection. Milk samples and pups' spleens were collected at 4 days post-infection to investigate the presence of ZIKV. (**B**): Dam infection was assessed by RT-qPCR (**a**) (n = 33 mice) and plaque assays (**b**) (n = 23 mice) in the plasma. (**C**): Transmission was evaluated by RT-qPCR in the spleens of the pups (n = 83 pups). ****: Significantly different ($p < 0.0001$) by Mann–Whitney test ($p < 0.05$).

Pup infection was investigated by amplifying vRNA from pup spleens by RT-qPCR (Figure 1C). More than 90% of the pups that were breastfed by ZIKV-infected mothers were infected, with an average of 42.3 vRNA copies/mg of spleen.

3.2. Infectious Particles Are Excreted in Murine Breast Milk

To evaluate the risk of transmission of ZIKV to the newborn, the presence of ZIKV was investigated in breast milk samples of infected dams. The dam infections and sample collection were performed as previously described and murine breast milk was harvested at 4 days post-infection (Figure 1A). To assess the infectious nature of the breast milk, the presence of infectious particles was investigated by plaque assays. The tests were performed either in whole breast milk samples or in fractions isolated by three spin-wash cycles (Figure 2A). To assess infectivity of breast milk, the latter was subjected to plaque assays and revealed 3.41×10^8 PFU/mL (±standard deviation (SD) = 4.8×10^8, 11 samples) of whole milk. The cream and whey fractions contained, respectively, 1.09×10^7 (±SD = 10^7, 5 samples) and 1.12×10^9 (±SD = 1.4×10^9, 5 samples) PFU/mL, demonstrating a high concentration of free infectious viral particles in murine breast milk (Figure 2B).

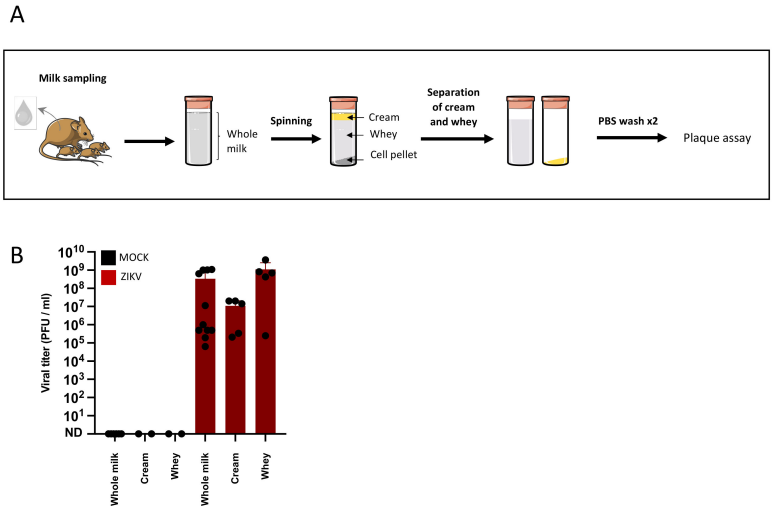


Figure 2. Infectious particles are excreted in murine breast milk. (**A**): Female dams were MOCK or ZIKV-infected with the Brazil/2016 strain as described in Figure 1. Breast milk samples were collected at 4 days post-infection and centrifuged to separate the cream fraction, the whey, and the cell pellet. The cream and whey fractions were isolated and further centrifuged twice with PBS to increase their purity. (**B**): The concentration of infectious viral particles in whole breast milk or breast milk fractions was determined by plaque assays (whole milk: $n = 11$; cream and whey: $n = 5$).

3.3. Murine Breast Milk Cells Are in Majority Mammary Epithelial Cells

To determine which cell types are present in murine breast milk, we isolated the cell content from murine breast milk samples collected as previously described (Figure 1A). After separation of the different breast milk fractions by centrifugation, the cell pellet was washed twice in PBS in order to eliminate free viral particles. Immune staining and flow cytometry were performed to determine the cell types present in murine breast milk (Figure 3A). To detect epithelial and immune cells, anti-CD24 and anti-CD45 antibodies were used, respectively. An average of 70.9% ($n = 2$) and 88.5% ($n = 7$) of epithelial cells were detected in the breast milk of MOCK-infected and ZIKV-infected dams, respectively. An average of 2.85% and 1.28% of immune cells were detected in MOCK ($n = 2$) and

ZIKV (n = 7) breast milk samples (Figure 3B,D). To further characterize the epithelial cells detected in murine breast milk, CD49f expression was studied as it is differentially expressed by mammary epithelial cells. Indeed, luminal cells are $CD24^{high}/CD49f^{+}$ while myoepithelial cells are $CD24^{low}/CD49f^{+}$, and progenitor cells (immature luminal cells) are $CD24^{high}/CD49f^{high}$. In all breast milk samples, the majority of cells were $CD24^{high}/CD49f^{+}$ with an average of 68% in MOCK samples (n = 2) and 79.1% in ZIKV samples (n = 7). No clear population of $CD24^{low}/CD49f^{+}$ cells was detected in any of the samples, while some (MOCK: 2/2; ZIKV: 5/7) contained $CD24^{high}/CD49f^{high}$ cells ranging from 1.24% to 8.6% in MOCK samples and 1.88% to 15.2% in ZIKV samples (Figure 3C,E).

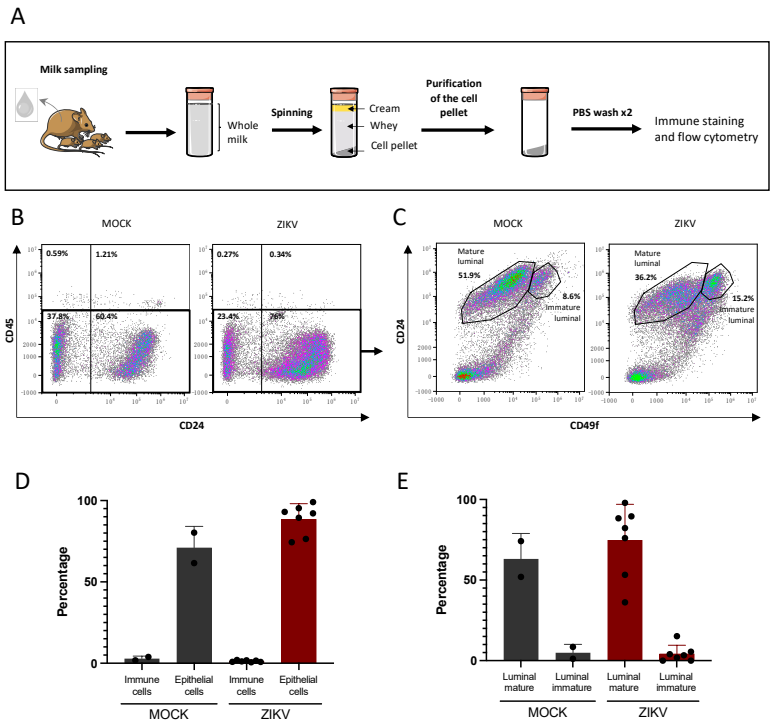


Figure 3. Breast milk cells of infected or non-infected mice are in majority mammary epithelial cells. (**A**): Breast milk samples collected from MOCK or ZIKV-infected dams with the Brazil/2016 strain at 4 days post-infection were centrifuged to separate the cream fraction, the whey, and the cell pellet. The cells were then subjected to two spin-wash cycles in PBS in order to eliminate any free viral particles left from the liquid fractions. Antigen expression was analyzed by immune staining and flow cytometry. (**B**): Anti-CD45 and anti-CD24 antibodies were used to detect and quantify immune and epithelial cells respectively. (**C**): CD49f expression was used to identify mammary epithelial cells among the CD45-negative cells determined in (**B**). The results of one experiment are presented (MOCK: n = 2, ZIKV: n = 7). (**D**): histogram representation of CD45-positive (immune) or CD24-positive (epithelial) cells in breast milk of MOCK or ZIKV-infected dams (MOCK: n = 2, ZIKV: n = 7). (**E**): histogram representation of mature and immature luminal mammary cells in breast milk, determined among the CD45-negative cells (MOCK: n = 2, ZIKV: n = 7).

3.4. Infectious Cell-Associated ZIKV Is Excreted in Murine Breast Milk

In order to determine whether cells present in the milk are capable of transmitting the infection, co-cultures were performed between milk cells (purified as previously)

and permissive target cells (Vero) in presence of carboxymethylcellulose (CMC). Vero cell infection was assessed by the observation of plaque formation after crystal violet staining (Figure 4A). In the same murine breast milk samples, the viral titers in whole milk (Figure 4B) and the number of infectious cells per million of total cells (Figure 4C) were determined. While viral titers in whole breast milk ranged from 6.33×10^4 to 1.08×10^9 PFU/mL (mean: 3.41×10^8 PFU/mL) in samples collected from ZIKV-infected dams, the number of cells capable of transmitting the infection ranged from 1.65×10^1 to 2.3×10^4 cells/10^6 cells (mean: 5×10^3 cells/10^6 cells), with a correlation between whole milk titers and the number of infectious cells (Spearman test, rho = 0.9).

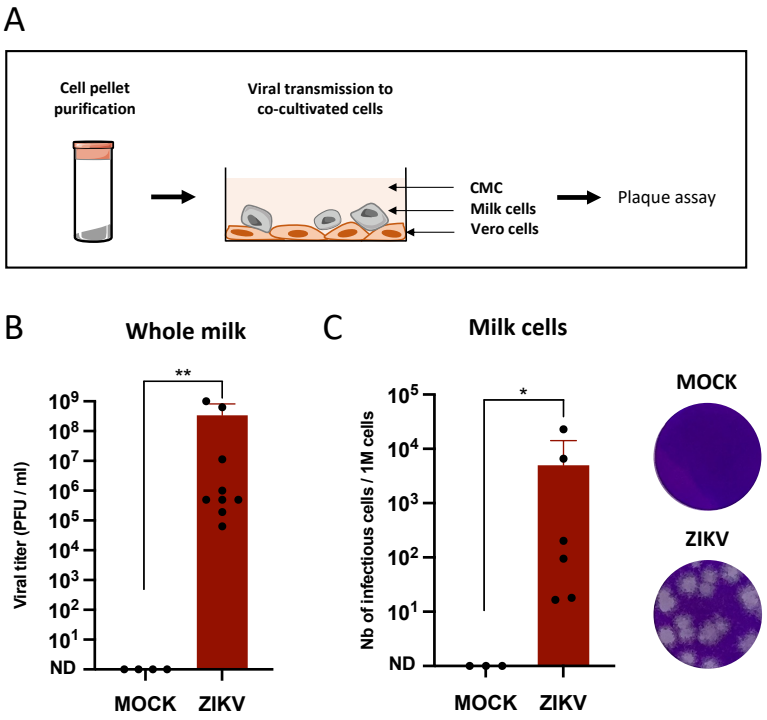


Figure 4. Infectious cell-associated ZIKV is excreted in murine breast milk. (**A**): Female dams were MOCK or ZIKV-infected with the Brazil/2016 strain as described in Figure 1. Breast milk samples were collected at 4 days post-infection and cell pellets were purified by three spin-wash cycles in PBS to eliminate free viral particles. (**B**): The viral titers in the same breast milk samples were determined by plaque assay on Vero cells. (**C**): For each sample (n = 6), duplicates of one million cells were serially diluted and co-cultured with Vero cells for 2 h at 37 °C. The cells were then co-cultured in medium containing carboxymethylcellulose for 6 days at 37 °C. After three PBS washes and PFA 4% fixation, the cell layers were stained with crystal violet and plaques were counted manually. * and **: Significantly different (**B**: $p = 0.0015$; **C**: $p = 0.023$) by Mann–Whitney test ($p < 0.05$).

3.5. Lactoferrin and Lactalbumin Are Not Antiviral against ZIKV

In order to identify proviral or antiviral breast milk factors, the effect of LF and LA on ZIKV infectivity was studied by pre-incubation of different physiological concentrations (as reported in human breast milk [30,31]) of these factors with viral particles and subsequent infection of Caco-2 cells. The Caco-2 cell line was chosen to assess ZIKV infectivity because, physiologically, ZIKV and breast milk are in contact with the newborn's intestinal barrier.

The infection of the target cells was quantified by RNA extraction and vRNA amplification by RT-qPCR (Figure 5). Approximatively 10^6 vRNA copies/µg of total RNA were detected in the Caco-2 cells with no significant difference between the non-treated, LF-treated, and LA-treated virus, suggesting the absence of effect of these factors on ZIKV infectivity.

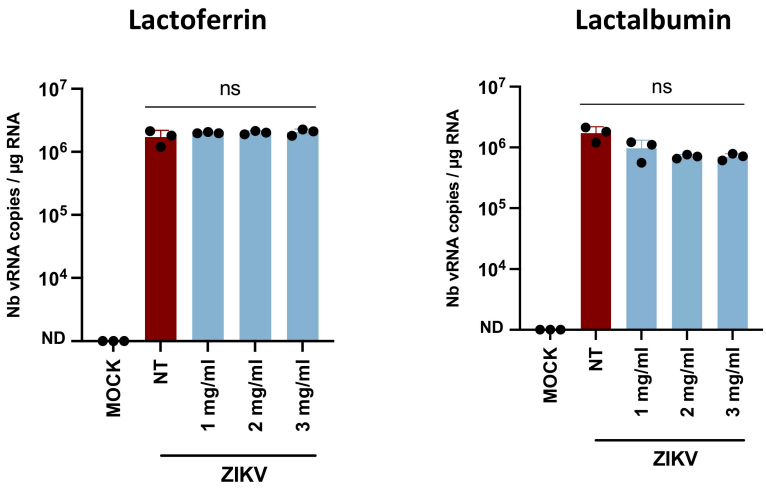
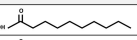
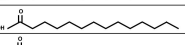
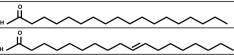
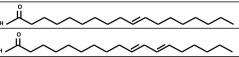
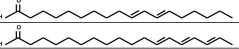
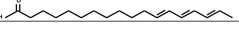


Figure 5. Lactoferrin and lactalbumin are not antiviral against ZIKV. ZIKV H/PF13 particles were incubated with culture medium (NT), lactoferrin, or lactalbumin (at physiological concentrations of human milk) for 1 h at 37 °C before infection of Caco-2 cells (MOI 1). At 48 h post-infection, cell layers were washed twice in PBS. After intracellular RNA extraction, viral RNAs were amplified by RT-qPCR (n = 3). ns: Non significantly different by Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$).

3.6. Free Fatty Acids Are Antiviral against ZIKV

In order to identify whether free fatty acids exert antiviral activity against ZIKV, as they have been shown to inactivate other enveloped viruses, viral particles were pre-incubated with six free fatty acids present in human breast milk (C10:0, C14:0, C18:0, C18:1, C18:2, and C18:3) before Vero cell infection and titration by plaque assay (Figure 6A). Viral particles were either pre-incubated with culture medium, PFA 4%, free fatty acids, or the solvent used to resuspend them (either ethanol or DMSO) (Table 1). The cytotoxicity assays of free fatty acids on target cells can be found in Supplementary Figure S1 and only non-cytotoxic concentrations were used for the antiviral assays (Table 2). No inactivation of the non-treated virus was observed over time, while pre-incubation with PFA 4% resulted in the inactivation of the virus in less than 1 h (first time point tested) as expected. The saturated fatty acids C10:0 and C14:0 exerted no effect on ZIKV infectivity for up to 6 h of incubation while C18:0 became antiviral after 4 h (Figure 6B). The mono-unsaturated fatty acid C18:1 inactivated ZIKV in less than 1 h of incubation, while the poly-unsaturated fatty acids C18:2 and C18:3 inactivated ZIKV in 4 h (Figure 6B), suggesting a role of the unsaturations in viral inactivation. The pre-incubation of the viral particles with ethanol or DMSO resulted in a slight decrease in viral infectivity for most of the concentrations tested except for the C18:0 control which decreased 5 log at 6 h of incubation. But as C18:0 inactivated ZIKV in less than 4 h of incubation (when the solvent did not), these results suggest an antiviral effect of C18:0.

A

Fatty acid	Saturation	Nomenclature	Structure	Concentration in human milk (mg/ml) *(Cruz-Hernandez 2013)*
Capric acid	SFA	C10:0		0.57
Myristic acid		C14:0		1.98
Stearic acid		C18:0		1.93
Oleic acid	MUFA	C18:1		12.33
Linoleic acid	PUFA	C18:2		5.66
Linolenic acid		C18:3		0.4

B

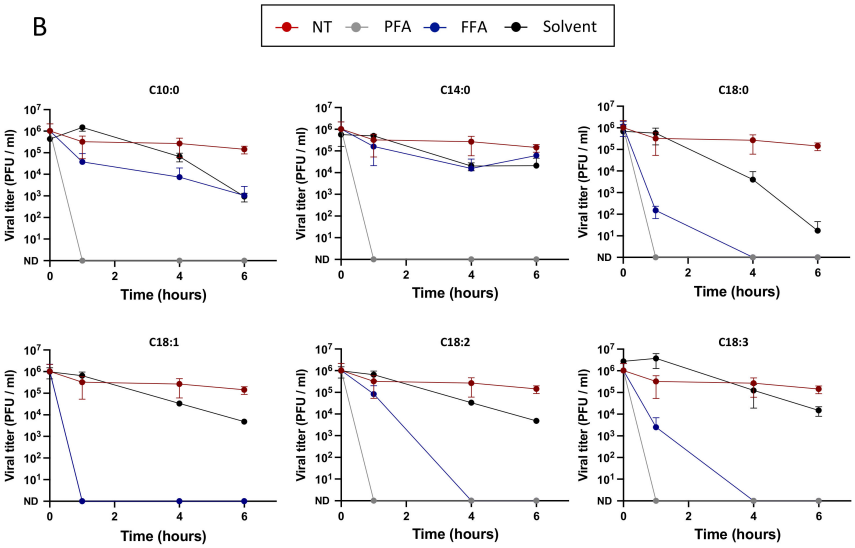


Figure 6. Free fatty acids are antiviral against ZIKV. (**A**): The fatty acids tested are either saturated fatty acids (SFA), mono-unsaturated fatty acids (MUFA), or polyunsaturated fatty acids (PUFA). Their nomenclature, structure, and abundance in human milk at 4 weeks after delivery (Cruz-Hernandez, 2013) are listed in the table. (**B**): To determine whether free fatty acids exert antiviral activity, 10^6 PFU of ZIKV particles (Brazil/2016) were incubated with culture medium (NT), paraformaldehyde 4% (PFA), free fatty acids (FFA), or the solvent used to dilute them (solvent) for 6 h. At several time points (0 h, 1 h, 4 h, and 6 h), the viral titers were determined by plaque assays (n = 3).

4. Discussion

Since the 2007 outbreak, it has repeatedly been suggested that ZIKV can be transmitted to newborns through breastfeeding [12]. However, since several case reports described no transmission of ZIKV from infected mothers to their newborn [26], biological factors regulating the efficiency of this route of transmission might exist (viral load, viral form, immunological status, stage of lactation, breast milk composition, etc.). We investigated the role of breast milk and its components in viral transmission using a well-described animal model for ZIKV infection: A129 mice.

ZIKV has previously been shown, by our team [28] and Regla-Nava et al. [32], to disseminate to the mammary glands of infected mice. Here, we investigated the ability of ZIKV to be excreted in breast milk. High viral titers (10^9 PFU/mL) were detected in the breast milk of infected breastfeeding dams. Between the 12 milk samples tested, viral titers ranged from 6.33×10^4 to 1.08×10^9 PFU/mL of milk. Infectious particles had also been detected by Regla-Nava et al. in the breast milk of AG129 mice after amplification

on Vero cells [32]. To better characterize the milk-associated virus, we separated different milk fractions. The cream and whey fractions were separated from the cell pellet by centrifugation and further isolated by several spin-wash cycles. Infectious viral particles were found in both fractions at 10^7 and 10^9 PFU/mL, respectively. These results demonstrate that infectious cell-free viral particles are present in breast milk, thus risking transmission to the offspring. Several mechanisms have been suggested to explain the origin of the viral particles in breast milk [12]: Free viral particles in breast milk could have been excreted by mammary luminal epithelial cells as they produce milk and are permissive to ZIKV infection [28]. Although it is less likely, viral particles could also be locally produced in breast milk by infected cells.

The cell pellet was also tested to investigate the ability of breast milk cells to transmit ZIKV. Infectious plaque forming units were detected when co-culturing milk-cells from infected dams with permissive Vero cells (whereas no plaques were observed using milk-cells from MOCK-infected mothers), suggesting the existence of cell-associated virus within breast milk.

To describe more accurately the cell content of the breast milk and thus identify the potentially infectious cell types, we performed flow cytometry experiments using epithelial (CD24) and immune (CD45) cell markers. We observed a majority of epithelial cells ranging from 74.4% to 99% versus an average of 1.28% of CD45-positive cells in breast milk from infected dams, comparable to values observed in breast milk from MOCK dams. These results, obtained using murine milk, are comparable to studies performed on human milk [16]: Witkowska-Zimny et al. detected from 60% to 98% of epithelial cells in mature human milk and less than 2% of immune cells. As the breast milk composition fluctuates during lactation, the epithelial–immune cell ratio varies over time. As described previously, the colostrum is rich in immunological factors whereas the transitional and mature milks are rich in nutritious elements. Here, in mature milk, we further characterized the epithelial cells to determine whether luminal, myoepithelial or progenitor cells from the mammary gland are found in breast milk. Using the CD49f marker, we showed that murine breast milk of ZIKV-infected mice contains mature luminal cells (74.8%) and immature progenitors (4.28%), but no clear population of myoepithelial cells was detected. These results seem coherent with the structure of the mammary epithelium as luminal and progenitor cells are in contact with the lumen of the lactiferous ducts while myoepithelial cells are found beneath the tight luminal cell monolayer [33]. As luminal mammary cells are permissive to ZIKV [28] and predominant in murine breast milk, they could be infected or carry adsorbed ZIKV particles at their surface in the milk. According to a mechanism we suggested [12], infected mammary luminal cells could detach from the mammary epithelium, thus introducing cell-associated ZIKV into the breast milk.

The transmission of ZIKV to breastfed pups was evaluated in the spleens and revealed a very high rate of viral transmission (>90%), with splenic viral loads ranging from 0.93 to 4×10^2 vRNA copies/mg. The viral loads remain relatively low, most probably due to the very early stage of the pups' infection [13].

According to our previous studies, ZIKV is produced in mouse mammary glands with a peak at 6 days post-subcutaneous infection [28]. Because we observed a reduction in milk production as early as day 5, breast milk samples had to be collected at day 4. As the dams were euthanized after harvesting as much breast milk as possible, pup spleens had to be collected at day 4 as well. However, to optimize the study of the transmission during breastfeeding and detect higher viral loads, pup spleens should be harvested a few days after the peak of production and excretion of ZIKV by the mammary gland. Previously, we already demonstrated that ZIKV is efficiently transmitted during breastfeeding to 1- to 3-day-old pups [13]. Here, we show that older pups are infected through breastfeeding as well (up to 11 days old), even as the impermeability of the intestinal barrier increases [34].

To understand which biological factors could regulate the transmission of ZIKV during breastfeeding, we investigated the effect of several antiviral factors of breast milk, such as LF, LA, and free fatty acids, on ZIKV infectivity. No antiviral effect of LF or LA was

observed on ZIKV, although they have been shown to decrease viral infectivity of multiple viruses, such as HIV-1 and CMV [12,35]: LF prevents viral adsorption at the cell membrane, either by interacting with the viral particle (e.g., with gp120 of HIV-1 [36]) or with the target cells (e.g., with heparins [37]). The effect of LF and LA on ZIKV target cells was also investigated (Supplementary Figure S4) but no antiviral effect was observed at any of the physiological concentrations tested. Free fatty acids were shown to inactivate enveloped viruses by interfering with the viral envelope [38]. Here, we studied their effect on ZIKV to better understand the antiviral mechanism of breast milk stored at 4 °C. Both the saturated fatty acid C18:0 and unsaturated fatty acids C18:1, C18:2, and C18:3 exerted an antiviral effect against ZIKV at physiological concentrations. These results confirm the hypothetical mechanism of viral inactivation in refrigerated or frozen breast milk suggested by Pfaender et al. [24]. Indeed, they suggested that upon refrigeration, the MFGM becomes altered, thus exposing the triglyceride core to lipases present in breast milk. The free fatty acids produced would then alter the viral envelope integrity. However, as breast milk storage is responsible for the increase in free fatty acids [24], fresh breast milk does not have an antiviral effect, as demonstrated by Conzelmann et al. [25]. Finally, free fatty acids did not decrease the infection when target cells were treated before viral adsorption, thus showing no effect on the cell receptors or on the early steps of the viral cycle.

5. Conclusions

ZIKV transmission through breastfeeding has been described in several cases in past years but is not systematic. In previous studies, we described the ability of ZIKV to cross the intestinal barrier of breastfed pups and to be transmitted by breastfeeding to very young pups (1 to 3 days old) [13]. Here, we show that even older pups (up to 11 days old) are also very susceptible to infection through breastfeeding. In order to understand the biological factors regulating this transmission, we performed in vivo infections of breastfeeding A129 dams and showed that ZIKV is excreted into breast milk as both cell-free and cell-associated virus. Among the different biological factors we investigated (LF, LA, and free fatty acids), the free fatty acids C18:0, C18:1, C18:2, and C18:3 were shown to exert an antiviral effect. As the free fatty acid content in breast milk varies with nutrition, these results should be considered in risk assessment of ZIKV transmission through breastfeeding in order to better advise infected mothers.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/v14050851/s1, Figure S1: Effect of free fatty acids on the cell viability.; Figure S2: Effect of Lactoferrin and lactalbumin on the cell viability.; Figure S3: Control of the effect of the solvents on ZIKV.; Figure S4: Effect of Caco-2 incubation with fatty acids, lactoferrin or lactalbumin before infection.

Author Contributions: Conceptualization, S.D., P.-E.C. and A.V.; methodology, S.D., P.J., P.-E.C. and A.V.; formal analysis, S.D.; validation, P.-E.C. and A.V.; investigation, S.D.; writing—original draft preparation, S.D.; writing—review and editing, S.D., P.-E.C., A.V. and A.G.; supervision, P.-E.C. and A.V.; visualization, S.D., P.-E.C. and A.V.; project administration, P.-E.C. and A.V.; funding acquisition, P.-E.C. and A.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: S.D. was the recipient of a PhD fellowship from the French ministry of education and research for this project.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institut Pasteur of Paris (dap 180026; 11/19/2018) and the French "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation" (APAFIS#16119-2018071314475930 v1).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Mathieu Hubert (Institut Pasteur) for his participation in the milk collection during the last experiment, Philippe Afonso (Institut Pasteur) for improving the manuscript, Emeline Perthame (Bioinformatics and Biostatistics HUB, Institut Pasteur) for improving the statistical analysis and Valérie Choumet (Institut Pasteur) for helpful advice.

Conflicts 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.

References

1. Faye, O.; Freire, C.C.; Iamarino, A.; Faye, O.; de Oliveira, J.V.; Diallo, M.; Zanotto, P.M. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 36. [CrossRef] [PubMed]
2. Duffy, M.R.; Chen, T.-H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; DuBray, C.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536–2543. [CrossRef] [PubMed]
3. Musso, D.; Nilles, E.J.; Cao-Lormeau, V.-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *20*, O595–O596. [CrossRef] [PubMed]
4. Roth, A.; Mercier, A.; Lepers, C.; Hoy, D.; Duituturaga, S.; Benyon, E.; Guillaumot, L.; Souarès, Y. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections—An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, 20929. [CrossRef]
5. Campos, G.S.; Bandeira, A.C.; Sardi, S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1885–1886. [CrossRef]
6. Hennessey, M.; Fischer, M.; Staples, J.E. Zika Virus Spreads to New Areas—Region of the Americas, May 2015–January 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 55–58. [CrossRef]
7. Carod-Artal, F.J. Neurological complications of Zika virus infection. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2018**, *16*, 399–410. [CrossRef]
8. Wright, J.K.; Castellani, L.; Lecce, C.; Khatib, A.; Bonta, M.; Boggild, A.K. Zika Virus-Associated Aseptic Meningitis and Guillain–Barre Syndrome in a Traveler Returning from Latin America: A Case Report and Mini-Review. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2019**, *21*, 3. [CrossRef]
9. Cao-Lormeau, V.-M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [CrossRef]
10. Rasmussen, S.A.; Jamieson, D.J.; Honein, M.A.; Petersen, L.R. Zika Virus and Birth Defects—Reviewing the Evidence for Causality. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1981–1987. [CrossRef]
11. Gregory, C.J.; Oduyebo, T.; Brault, A.C.; Brooks, J.T.; Chung, K.-W.; Hills, S.; Kuehnert, M.J.; Mead, P.; Meaney-Delman, D.; Rabe, I.; et al. Modes of Transmission of Zika Virus. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S875–S883. [CrossRef]
12. Desgraupes, S.; Hubert, M.; Gessain, A.; Ceccaldi, P.-E.; Vidy, A. Mother-to-Child Transmission of Arboviruses during Breastfeeding: From Epidemiology to Cellular Mechanisms. *Viruses* **2021**, *13*, 1312. [CrossRef]
13. Hubert, M.; Jeannin, P.; Burlaud-Gaillard, J.; Roingeard, P.; Gessain, A.; Ceccaldi, P.-E.; Vidy, A. Evidence That Zika Virus Is Transmitted by Breastfeeding to Newborn A129 (Ifnar1 Knock-Out) Mice and Is Able to Infect and Cross a Tight Monolayer of Human Intestinal Epithelial Cells. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 524678. [CrossRef]
14. Mello, A.S.; Bertozzi, A.P.A.P.; Rodrigues, M.M.D.; Gazeta, R.E.; Moron, A.F.; Soriano-Arandes, A.; Sarmento, S.G.P.; Vedovello, D.; Silva, A.C.B.; Fajardo, T.; et al. Development of Secondary Microcephaly After Delivery: Possible Consequence of Mother-Baby Transmission of Zika Virus in Breast Milk. *Am. J. Case Rep.* **2019**, *20*, 723–725. [CrossRef]
15. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2013**, *60*, 49–74. [CrossRef]
16. Witkowska-Zimny, M.; Kaminska-El-Hassan, E. Cells of human breast milk. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2017**, *22*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
17. Argov, N.; Lemay, D.G.; German, J.B. Milk Fat Globule structure & function; Nanosciece comes to milk production. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 617–623.
18. Ndirangu, J.; Viljoen, J.; Bland, R.M.; Danaviah, S.; Thorne, C.; Van de Perre, P.; Newell, M.-L. Cell-Free (RNA) and Cell-Associated (DNA) HIV-1 and Postnatal Transmission through Breastfeeding. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51493. [CrossRef]
19. Asanuma, H.; Numazaki, K.; Nagata, N.; Hotsubo, T.; Horino, K.; Chiba, S. Role of Milk Whey in the Transmission of Human Cytomegalovirus Infection by Breast Milk. *Microbiol. Immunol.* **1996**, *40*, 201–204. [CrossRef]
20. Ureta-Vidal, A.; Angelin-Duclos, C.; Tortevoye, P.; Murphy, E.; Jolly, N.; Joubert, M.; Carles, G.; Moreau, J.-P.; Gessain, A. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: Implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 832–836. [CrossRef]
21. Clarke, N.; May, J. Effect of antimicrobial factors in human milk on rhinoviruses and milk-borne cytomegalovirus in vitro. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49*, 719–723. [CrossRef] [PubMed]
22. Welsh, J.K.; Skurrie, I.J.; May, J.T. Use of Semliki forest virus to identify lipid-mediated antiviral activity and anti-alphavirus immunoglobulin A in human milk. *Infect. Immun.* **1978**, *19*, 395–401. [CrossRef] [PubMed]
23. Pfaender, S.; Vielle, N.J.; Ebert, N.; Steinmann, E.; Alves, M.P.; Thiel, V. Inactivation of Zika virus in human breast milk by prolonged storage or pasteurization. *Virus Res.* **2017**, *228*, 58–60. [CrossRef] [PubMed]
24. Pfaender, S.; Heyden, J.; Friesland, M.; Ciesek, S.; Ejaz, A.; Steinmann, J.; Steinmann, J.; Malarski, A.; Stoiber, H.; Tsiavaliaris, G.; et al. Inactivation of Hepatitis C Virus Infectivity by Human Breast Milk. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1943–1952. [CrossRef]

25. Conzelmann, C.; Zou, M.; Groß, R.; Harms, M.; Röcker, A.; Riedel, C.U.; Münch, J.; Müller, J.A. Storage-Dependent Generation of Potent Anti-ZIKV Activity in Human Breast Milk. *Viruses* **2019**, *11*, 591. [CrossRef]
26. Centeno-Tablante, E.; Medina-Rivera, M.; Finkelstein, J.; Herman, H.; Rayco-Solon, P.; Garcia-Casal, M.; Rogers, L.; Ghezzi-Kopel, K.; Leal, M.Z.; Velasquez, J.A.; et al. Update on the Transmission of Zika Virus Through Breast Milk and Breastfeeding: A Systematic Review of the Evidence. *Viruses* **2021**, *13*, 123. [CrossRef]
27. Dowall, S.D.; Graham, V.A.; Rayner, E.; Atkinson, B.; Hall, G.; Watson, R.J.; Bosworth, A.; Bonney, L.C.; Kitchen, S.; Hewson, R. A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004658. [CrossRef]
28. Hubert, M.; Chiche, A.; Legros, V.; Jeannin, P.; Montange, T.; Gessain, A.; Ceccaldi, P.-E.; Vidy, A. Productive Infection of Mouse Mammary Glands and Human Mammary Epithelial Cells by Zika Virus. *Viruses* **2019**, *11*, 950. [CrossRef]
29. Cruz-Hernandez, C.; Goeuriot, S.; Giuffrida, F.; Thakkar, S.K.; Destaillats, F. Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1284*, 174–179. [CrossRef]
30. Yang, Z.; Jiang, R.; Chen, Q.; Wang, J.; Duan, Y.; Pang, X.; Jiang, S.; Bi, Y.; Zhang, H.; Lönnerdal, B.; et al. Concentration of Lactoferrin in Human Milk and Its Variation during Lactation in Different Chinese Populations. *Nutrients* **2018**, *10*, 1235. [CrossRef]
31. Jackson, J.G.; Janszen, D.B.; Lonnerdal, B.; Lien, E.L.; Pramuk, K.P.; Kuhlman, C.F. A multinational study of α-lactalbumin concentrations in human milk. *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15*, 517–521. [CrossRef]
32. Regla-Nava, J.A.; Viramontes, K.M.; Vozdolska, T.; Huynh, A.-T.; Villani, T.; Gardner, G.; Johnson, M.; Ferro, P.J.; Shresta, S.; Kim, K. Detection of Zika virus in mouse mammary gland and breast milk. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007080. [CrossRef]
33. Huebner, R.J.; Lechler, T.; Ewald, A.J. Developmental stratification of the mammary epithelium occurs through symmetry-breaking vertical divisions of apically positioned luminal cells. *Development* **2014**, *141*, 1085–1094. [CrossRef]
34. Holmes, J.L.; Van Itallie, C.M.; Rasmussen, J.E.; Anderson, J.M. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr. Patterns* **2006**, *6*, 581–588. [CrossRef]
35. Ng, T.B.; Cheung, R.C.F.; Wong, J.H.; Wang, Y.; Ip, D.T.M.; Wan, D.C.C.; Xia, J. Antiviral activities of whey proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 6997–7008. [CrossRef]
36. Swart, P.; Kuipers, M.; Smit, C.; Pauwels, R.; De Béthune, M.; De Clercq, E.; Meijer, D.; Huisman, J. Antiviral Effects of Milk Proteins: Acylation Results in Polyanionic Compounds with Potent Activity against Human Immunodeficiency Virus Types 1 and 2in Vitro. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1996**, *12*, 769–775. [CrossRef]
37. Van Berkel, P.H.C.; Geerts, E.J.M.; Van Veen, A.H.; Mericskay, M.; De Boer, A.H.; Nuijens, H.J. N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem. J.* **1997**, *328*, 145–151. [CrossRef]
38. Thormar, H.; Isaacs, E.C.; Brown, H.R.; Barshatzky, M.R.; Pessolano, T. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 27–31. [CrossRef]

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Microbiology Spectrum

RESEARCH ARTICLE

Human Claudin-Derived Peptides Block the Membrane Fusion Process of Zika Virus and Are Broad Flavivirus Inhibitors

Jim Zoladek,[a] Julien Burlaud-Gaillard,[b,c] Maxime Chazal,[d] Sophie Desgraupes,[a] Patricia Jeannin,[a] Antoine Gessain,[a] Nathalie Pardigon,[e] Mathieu Hubert,[f] Philippe Roingeard,[b,c] Nolwenn Jouvenet,[d] Philippe V. Afonso[a]

[a]Unité Épidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR 3569, Paris, France
[b]Inserm U1259 MAVIVH, Université de Tours and CHRU de Tours, Tours, France
[c]Plate-Forme IBiSA de Microscopie Electronique, Université de Tours and CHRU de Tours, Tours, France
[d]Unité Signalisation Antivirale, Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR 3569, Paris, France
[e]Groupe Arbovirus, Unité Environnement et Risques Infectieux, Institut Pasteur, Université Paris Cité, Paris, France
[f]Unité Virus et Immunité, Institut Pasteur, Université Paris Cité, CNRS UMR 3569, Paris, France

ABSTRACT Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne flavivirus that emerged in the Pacific islands in 2007 and spread to the Americas in 2015. The infection remains asymptomatic in most cases but can be associated with severe neurological disorders. Despite massive efforts, no specific drug or vaccine against ZIKV infection is available to date. Claudins are tight-junction proteins that favor the entry of several flaviviruses, including ZIKV. In this study, we identified two peptides derived from the N-terminal sequences of claudin-7 and claudin-1, named CL7.1 and CL1.1, respectively, that inhibited ZIKV infection in a panel of human cell lines. Using cell-to-cell fusion assays, we demonstrated that these peptides blocked the ZIKV E-mediated membrane fusion. A comparison of the antiviral efficacy of CL1.1 and CL7.1 pointed to the importance of the peptide amphipathicity. Electron microscopic analysis revealed that CL1.1 altered the ultrastructure of the viral particles likely by binding the virus lipid envelope. However, amphipathicity could not fully explain the antiviral activity of CL1.1. *In silico* docking simulations suggested that CL1.1 may also interact with the E protein, near its stem region. Overall, our data suggested that claudin-derived peptides inhibition may be linked to simultaneous interaction with the E protein and the viral lipid envelope. Finally, we found that CL1.1 also blocked infection by yellow fever and Japanese encephalitis viruses but not by HIV-1 or SARS-CoV-2. Our results provide a basis for the future development of therapeutics against a wide range of endemic and emerging flaviviruses.

IMPORTANCE Zika virus (ZIKV) is a flavivirus transmitted by mosquito bites that have spread to the Pacific Islands and the Americas over the past decade. The infection remains asymptomatic in most cases but can cause severe neurological disorders. ZIKV is a major public health threat in areas of endemicity, and there is currently no specific antiviral drug or vaccine available. We identified two antiviral peptides deriving from the N-terminal sequences of claudin-7 and claudin-1 with the latter being the most effective. These peptides block the envelope-mediated membrane fusion. Our data suggested that the inhibition was likely achieved by simultaneously interacting with the viral lipid envelope and the E protein. The peptides also inhibited other flaviviruses. These results could provide the basis for the development of therapies that might target a wide array of flaviviruses from current epidemics and possibly future emergences.

KEYWORDS antimicrobial peptides, claudin, flavivirus, Zika

Many flaviviruses have been at the core of emergencies in recent years (1). The most recent is the Zika virus (ZIKV), which emerged on Yap Island in 2007, in French Polynesia in 2013, and in the Americas in 2015. These outbreaks have evidenced that ZIKV

Editor Vaithilingaraja Arumugaswami, David Geffen School of Medicine at UCLA

Copyright © 2022 Zoladek et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Philippe V. Afonso, philippe.afonso@pasteur.fr.

The authors declare no conflict of interest.

[This article was published on 30 August 2022 with errors in the affiliation line. The affiliation line was corrected in the current version, posted on 8 September 2022.]

Received 1 August 2022
Accepted 15 August 2022

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

infection can cause severe neurological disorders, including Guillain-Barré syndrome (2), congenital microcephaly (3), meningoencephalitis (4), and myelitis (5).

Other flaviviruses, such as yellow fever virus (YFV), Japanese encephalitis virus (JEV), and West Nile virus (WNV), are frequently associated with epidemics. While there are approved vaccines to prevent some of these infections, there is currently no vaccine available against ZIKV infection. Furthermore, there is no specific antiviral drug treatment for these infections. The development of a pan-flavivirus treatment is necessary for treating current epidemics and future emergencies (1).

Peptide-based treatments have gained much attention in recent years as these molecules may constitute potent and safe antiviral drugs (6). Over the past years, several peptides with anti-ZIKV properties have been described. Most have been designed from the sequences of flavivirus envelope (E) proteins. Their mechanisms of action are quite diverse. Some anti-ZIKV peptides disrupt the integrity of the viral particles, therefore preventing infection *in vitro* (7) and *in vivo* (8–10), while others have been shown to interact with viral proteins and interfere with their functions *in vitro* (11). In many cases, their mechanism remains unclear (12–14).

We have recently demonstrated that claudin-7 was required for optimal ZIKV replication in human endothelial cells (15). We showed that claudin-7 is involved in a post-internalization and pre-replication step, likely during viral sorting in endosomes where the fusion with endosomal membrane occurs (15). Consequently, we wondered whether targeting the interactions between claudin-7 and ZIKV could be used as a strategy to reduce ZIKV infection in human cells. The use of antibodies directed against claudin-7 was not possible. Indeed, the commercially available antibodies do not recognize the extracellular loops of claudin-7, where the binding domain to ZIKV is likely located since the extracellular loops of claudin-1 have been previously reported to interact with Dengue virus (DENV) (16, 17). Moreover, claudin-7 expression levels in endothelial cells are too low to be detected with antibodies (15, 18). Thus, antibodies would probably not disrupt the interaction between ZIKV and claudin-7. We, therefore, designed peptides based on the claudin-7 sequence to block the interaction.

We found that peptides derived from the N-terminal sequences of claudin-7 and claudin-1 exhibited antiviral properties against ZIKV in several human cell lines. Both peptides blocked E-mediated cell-to-cell membrane fusion, with the claudin-1-derived peptide being the most effective. These peptides did not correspond to the extracellular domains of the claudins. Therefore, we speculated that the inhibition was achieved by directly interfering with the interaction between the cellular claudin and the viral prM/E protein. We aimed at understanding the mechanism of such inhibition and focused primarily on CL1.1, the most effective peptide. We found that CL1.1 did not alter virus binding to host membranes or internalization in the target cells. We found that CL1.1 altered the ultrastructure of the viral particles, which was presumably the consequence of peptides interacting with the virus lipid envelope. Indeed, we found that peptide amphipathicity was crucial for efficient antiviral activity. However, amphipathicity was not sufficient to inhibit ZIKV infection as a control peptide with similar amphipathicity, CL7.4, did not inhibit ZIKV infection. *In silico* docking, predictions were performed and suggested that the peptides may also interact with the stem domain of the E protein. Our data suggested that the simultaneous interaction of the peptide with the lipid envelope and the E protein may inhibit virus fusion by preventing the lipid envelope curvature changes and/or the conformational changes of the E protein. We finally found that CL1.1 also blocked JEV and YFV infection but not unrelated enveloped viruses, such as HIV-1 and SARS-CoV-2. These findings provided a novel strategy for developing antiviral peptides that could potentially target a wide range of flaviviruses.

RESULTS

Claudin N-terminus-derived peptides CL1.1 and CL7.1 inhibited ZIKV replication. We designed 16 overlapping 18-mer peptides covering the entire sequence of human claudin-7 (S1 Table in Supplemental File 1). Eight peptides could not be synthesized and were therefore abandoned. We tested the capacity of the remaining peptides to

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

inhibit ZIKV infection in hCMEC/D3 cells, a human cerebral microvascular endothelial cell line, in which claudin-7 favors ZIKV replication (15).

ZIKV inocula from the African lineage (5×10^5 PFU/mL) were treated with 50 μM of the different peptides for 1 h and then led to the adsorption on hCMEC/D3 cells for 2 h (multiplicity of infection [MOI] of 1). Cells were washed and maintained in a fresh medium containing 50 μM peptides for 48 h, following a screening procedure previously developed to identify anti-HCV peptides (19). RT-qPCR analyses were performed to determine the levels of intracellular viral RNA, a readout for ZIKV replication. We found that a peptide derived from the N-terminus of claudin-7 (Fig. S1 in Supplemental File 1), termed CL7.1, induced a 2-fold reduction of viral RNA levels compared to untreated cells (Fig. 1A). Treatment with the other claudin-7-derived peptides had no significant impact on ZIKV infection (Fig. 1A). Of note, the antiviral activity of CL7.1 peptide was also detected in the absence of pretreatment, when virus and peptide were added simultaneously to the cell culture (Fig. S2 in Supplemental File 1).

Our data were in line with a previous study showing that a peptide derived from the N-terminus of claudin-1 (named herein CL1.1) exhibited antiviral activity against HCV infection of Huh7.5.1 cells (19). We tested the activity of CL1.1 against ZIKV infection and found that CL1.1 exhibited stronger antiviral activity than CL7.1. Intracellular viral RNA levels were below the threshold of detection in hCMEC/D3 cells treated with 50 μM CL1.1 (Fig. 1B). Inhibition was dose-dependent, with the IC_{50} values around 53 $\pm$ 13 μM for CL7.1 and 0.87 $\pm$ 0.11 μM for CL1.1 (Fig. 1C).

Infectious particle production was assessed in the supernatants of infected hCMEC/D3 cells. Consistent with the replication data (Fig. 1B), viral production was unaffected by 50 μM control CL7.4 (see Materials and Methods for justification), significantly reduced upon treatment with 50 μM CL7.1, and below the detection limit of the assay in the presence of 50 μM CL1.1 (Fig. 1D).

To assess whether the treatment was cell type-dependent, we tested the impact of the peptides on ZIKV infection of two human endothelial cell lines – umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and bone marrow endothelial cells (TrHBMEC) – and two human epithelial cell lines – alveolar basal cells (A549) and embryonic kidney cells (HEK 293T). ZIKV replication and production were significantly reduced in the presence of 50 μM CL7.1 in the four cell lines we tested, and undetectable in the presence of 50 μM CL1.1 (Fig. 1E and F). A control peptide (50 μM CL7.4) did not inhibit infection in any tested cell lines (Fig. 1E and F).

To ensure that the inhibition of viral replication and production in the presence of claudin-derived peptides were not biased by peptide-induced cell toxicity, we performed MTT assays on A549 cells treated with increasing concentrations of CL1.1, CL7.1, or CL7.4 (the control peptide) for 48 h. The assay showed no significant toxicity up to 100 μM for each peptide. The cytotoxic dose 50 (CD_{50}) was estimated at 250 $\pm$ 10 μM for every peptide (Fig. 1G). The treatment of differentiated monolayers of Caco-2 epithelial cells with 50 μM CL1.1 did not alter the electric transepithelial resistance, confirming the absence of toxicity (Fig. S3 in Supplemental File 1). Overall, our results suggested that the antiviral activity of CL1.1 was not due to peptide-induced cell toxicity.

These results indicated that both CL1.1 and CL7.1 displayed anti-ZIKV activity regardless of the target cell type, with CL1.1 being more potent. Hence, we prioritized our study on CL1.1.

CL1.1 neutralized ZIKV particles directly. We wondered whether CL1.1 acted via an interaction with the target cell or the viral particle. We found that pretreatment of hCMEC/D3 cells with 10 μM CL1.1 (which did suffice to significantly inhibit ZIKV in Fig. 1B) did not affect cell susceptibility to ZIKV. Viral replication was comparable between untreated cells and cells treated with CL1.1 or control peptides (Fig. 2A).

We incubated concentrated ZIKV stocks (1.5×10^7 PFU/mL) with 10 μM CL1.1 or control peptide for 1 h. The viral inoculum was then diluted by a factor of 30 so that the final concentrations of peptides were ineffective against ZIKV infection (see Fig. 1C). The hCMEC/D3 cells were then infected with the treated and diluted inocula.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

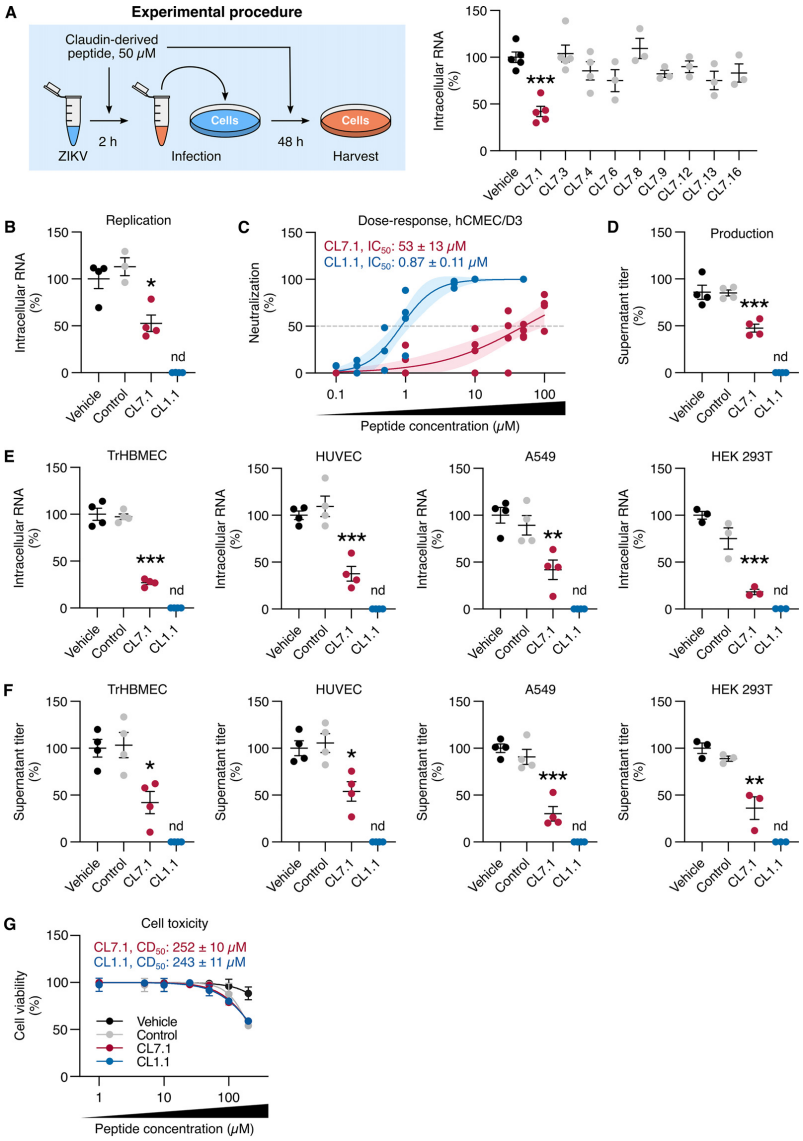


FIG 1 Claudin-derived peptides block ZIKV infection in different cell types. (A) ZIKV inoculum (5×10^5 PFU/mL, equivalent to an MOI of 1) was treated with 50 μM claudin-7-derived 18-mer peptides or an equivalent volume of vehicle (DMSO) for 1 h. These inocula were used to infect hCMEC/D3 cells for 2 h, which were subsequently washed and kept in a fresh medium containing peptides for 48 h. Viral replication was assessed by RT-qPCR on intracellular RNA. (B) The efficiency of 50 μM CL7.1 or CL1.1 to block ZIKV infection (MOI of 1) was assessed in hCMEC/D3. Viral replication was assessed by RT-qPCR on intracellular RNA (compared to control peptide CL7.4, or vehicle [DMSO] alone). (C) Dose-dependent effect of CL7.1 and CL1.1 on ZIKV infection (MOI of 1) in hCMEC/D3. The line represents the fitted dose-response model for each peptide and the light area represents the 95% confidence interval of the model. The dashed line represents 50% of viral neutralization. The calculated IC_{50} is indicated. R^2 values were 0.9 and 0.7 for CL1.1 and CL7.1, respectively. (D) Supernatants of the cells in (B) were titrated on Vero E6 cells to assess viral production. (E) The efficiency of 50 μM CL7.1 and CL1.1 to inhibit ZIKV infection (MOI of 1) was assessed in TrHBMEC,

(Continued on next page)

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

Forty-eight hours after infection, intracellular viral RNA levels were reduced by 80% upon treatment with CL1.1 (Fig. 2B).

These results suggested that CL1.1 inhibited viral infection by interacting with ZIKV particles rather than the target cell. This was consistent with the fact that the peptide-mediated viral inhibition was independent of the target cell type (Fig. 1E and F).

CL1.1 did not alter early ZIKV interactions with the cell. ZIKV inhibition could be achieved by preventing viral adsorption to or internalization in the cells. To investigate these steps of the ZIKV cycle, we used viral binding and internalization assays (Fig. 2C) that we previously established (15).

We incubated a ZIKV inoculum (5×10^6 PFU/mL) with 10 μM CL1.1 or control peptide (CL7.4) for 1 h and let it adsorb on hCMEC/D3 cells for 1 h at 4°C (MOI of 10). Viral binding was assessed by RT-qPCR after the removal of unbound viruses by PBS wash. We found that treatment with CL1.1 did not alter the binding of ZIKV to hCMEC/D3 cells (Fig. 2D). Heparin, a glycosaminoglycan known to interfere with viral binding to the cell (20), was used as a positive control and led to an 80% reduction of viral binding (Fig. 2D).

Following binding, the cells were incubated for 2 h at 37°C in a fresh medium containing peptides to enable endocytosis. Viral internalization was assessed by RT-qPCR after the removal of the viral particles that remained at the cell surface using trypsin. Treatment with 10 μM CL1.1 did not alter ZIKV internalization in hCMEC/D3 cells (Fig. 2E). Dynasore, an inhibitor of dynamin that blocks ZIKV internalization (21), was used as a positive control and led to a 95% reduction of viral internalization (Fig. 2E).

The data showed that CL1.1 blocked ZIKV infection neither at adsorption nor internalization steps but they should at a later step of the interaction with the cell, for example, by inhibiting the fusion of the viral envelope with the endosomes.

CL1.1 and CL7.1 blocked the pH-dependent fusion step of the ZIKV cycle. An approach using ZIKV-induced *Aedes albopictus* C6/36 syncytium formation has been previously used to test viral fusion inhibitors (22, 23). We took advantage of this strategy to study the impact of claudin-derived peptides on ZIKV E-mediated fusion.

C6/36 cells were infected with ZIKV for 48 h (MOI of 2), and upon acidification of the culture medium, cell-to-cell fusion occurred and syncytia were observed. Treatment of the inoculum with 500 ng/mL of the monoclonal antibody 4G2, which interacts with the E protein fusion loop (24), led to a reduction of more than 80% of cell-to-cell fusion. Fusion was not affected by the presence of DMSO (the vehicle) or the control peptide (50 μM C7.4) (Fig. 3). In the presence of 10 μM CL1.1 or 50 μM CL7.1, syncytium formation was reduced by 80% and 40%, respectively (Fig. 3). The lower inhibition level of cell-to-cell fusion achieved with CL7.1 as opposed to CL1.1 was consistent with its lower antiviral potency (Fig. 1 and 3).

These results suggested that CL1.1 and CL7.1 inhibited ZIKV infection by blocking the pH-dependent E-mediated membrane fusion.

Differences in amphipathicity correlated with differences in antiviral potency between CL1.1 and CL7.1. Although CL1.1 and CL7.1 differ by only 4 amino acids, their antiviral potency was significantly different (Fig. 1 to 3). We sought to determine which amino acids were responsible for this difference.

We used PEP-FOLD3, a peptide-oriented tertiary structure prediction software (25), to predict the structure of both peptides. According to the software, both peptides form alpha helices (Fig. 4A), which was consistent with the fact that these peptides have been designed on the first alpha helix of claudin-1 and claudin-7 (Fig. S1 in Supplemental File 1).

Of these predicted structures, we found that CL1.1 presented three aromatic amino

FIG 1 Legend (Continued)
HUVEC, A549, and HEK 293T cells Viral replication was assessed by RT-qPCR on intracellular RNA (compared to 50 μM control peptide CL7.4, or vehicle alone). (F) Supernatants of the cells in (E) were titrated on Vero E6 cells to assess viral production. (G) A549 cells were treated with increasing concentrations of CL1.1, or CL7.1, or control CL7.4 for 48 h. Cell viability was measured with an MTT assay (compared to control peptide CL7.4 or vehicle alone). The calculated CD_{50} for CL1.1 is indicated. Data are presented as individual biological replicates and mean ± SEM (A to F) or mean ± SEM (G, $n = 3$ biological replicates); nd, not detected; ***, $P \leq 0.001$; **, $P \leq 0.01$; *, $P \leq 0.05$ (One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc*).

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

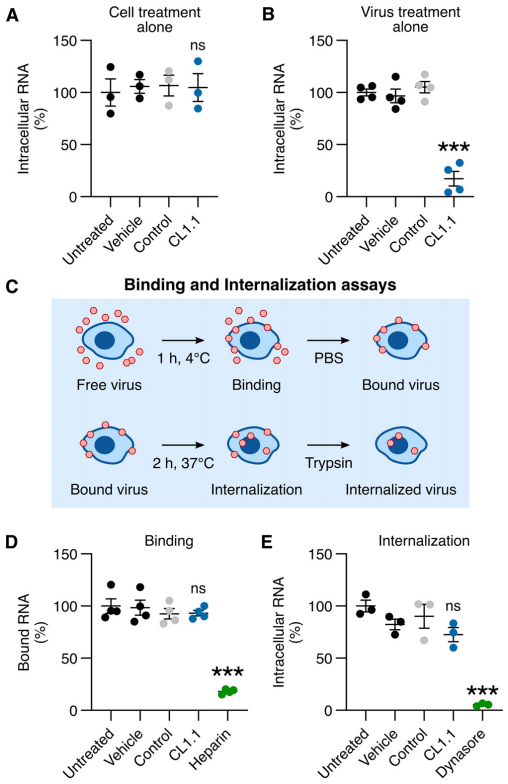


FIG 2 Claudin-derived peptides blocked ZIKV at a post-internalization step without altering cellular functions. (A) hCMEC/D3 cells were treated with 10 μM CL1.1 for 1 h and extensively washed with PBS to remove excess peptides. The cells were then infected with ZIKV (MOI of 1) for 48 h. Viral replication was assessed by RT-qPCR on intracellular RNA (compared to control peptide CL7.4 or vehicle alone). (B) ZIKV (equivalent MOI of 30) was treated with 10 μM CL1.1 for 1 h. The treated inocula were then diluted 30-times and used to infect hCMEC/D3 cells for 48 h (MOI of 1). Viral replication was assessed by RT-qPCR on intracellular RNA (compared to control peptide CL7.4 or vehicle alone). (C) Experimental procedure of the binding/internalization assay. ZIKV (MOI of 10) was adsorbed in hCMEC/D3 cells for 1 h at 4°C. The cells were then extensively washed with cold PBS to remove unbound viruses. Viral binding was analyzed at this stage by RT-qPCR. The cells were then incubated for 2 h at 37°C to induce internalization, washed with PBS, and treated with Trypsin to remove viruses that remained at the cell surface. Viral internalization was analyzed at this stage by RT-qPCR. (D) ZIKV was treated with 10 μM CL1.1 or 200 μg/mL Heparin for 1 h before the binding assay. Virus bound to cells was assessed by RT-qPCR (compared to 10 μM control peptide CL7.4, or vehicle alone). (E) ZIKV was treated with 10 μM CL1.1 or 100 μM Dynasore for 1 h before the internalization assay, fresh peptide and Dynasore were added during the internalization process. Viral internalization was assessed by RT-qPCR (compared to control peptide CL7.4 or vehicle alone). Data are presented as individual biological replicates $\pm$ SEM; ***, $P \leq 0.001$; *, $P \leq 0.05$; ns, $P > 0.05$ (one-way analysis of variance [ANOVA] followed by Dunnett's *post hoc*).

acids that were spatially aligned (i.e., F11, F15, W18), whereas CL7.1 only had two (i.e., F11, W18) that could play a role in the antiviral effect (Fig. 4A). We tested the impact of swapping the amino acid in position 15 on antiviral potency of the peptides (Fig. 4B and C). ZIKV inocula were treated with 50 μM parental or modified peptides for 1 h and used to infect hCMEC/D3 cells. Viral production was determined by supernatant titration at 48 h postinfection. While the resulting CL7.1+F lost its antiviral potency, CL1.1–F retained its antiviral activity (Fig. 4C). Thus, although the aromatic amino acid

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

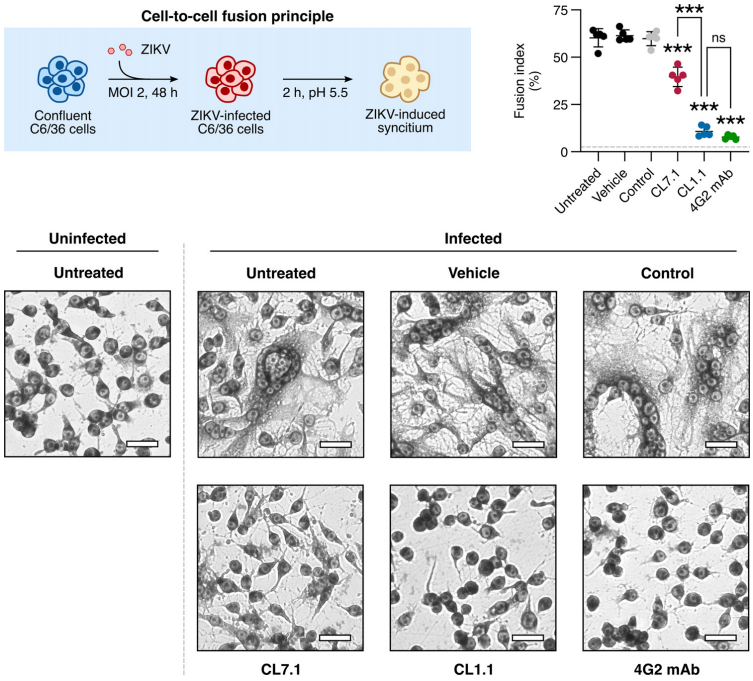


FIG 3 CL1.1 and CL7.1 blocked ZIKV-induced cell-to-cell fusion in C6/36 cells. C6/36 cells were infected with ZIKV (MOI of 2) for 48 h before the experiment. The cells were then treated with 10 μM CL1.1, 50 μM CL7.1, or 50 μM of the control peptide (i.e., CL7.4), or 500 ng/mL 4G2 MAb for 1 h. Cell-to-cell fusion was induced for 2 h by medium acidification, and the cells were fixed, stained with Giemsa, and analyzed with bright-field microscopy (compared to control peptide CL7.4 or vehicle alone). The fusion index was calculated using the formula: 1 – (number of cytoplasms/number of nuclei) in fields of 200 ± 50 nuclei. The dashed line represents the fusion index of uninfected cells. Representative images of the cell-to-cell fusion are shown on the right. Scale: 25 μm. Data are presented as individual biological replicates and mean ± SEM; ***, $P \leq 0.001$; ns, $P > 0.05$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc*). Uncropped source pictures are available in Fig. S7 in Supplemental File 1.

at position 15 had some antiviral function, it was not the primary driver of antiviral activity.

Using HELIQUEST, a helix analysis software (26), we found that CL1.1 was amphipathic with a large continuous hydrophobic face (Fig. 4D). The calculated amphipathicity value of CL1.1 (μH) was 0.3 (27). We found that CL7.1 was slightly less amphipathic, the calculated μH was 0.2, and had a smaller hydrophobic face (Fig. 4D). This was the consequence of two polar serine residues (i.e., S4, S12) that were absent in CL1.1 (Fig. 4B). Therefore, we tested the impact of swapping residues S4 and S12 in CL7.1 with the corresponding nonpolar residues present in CL1.1 (i.e., A4 and I12) and vice-versa (Fig. 4B and C). As described above, we tested the impact of the modified peptides on ZIKV infection (at 50 μM). The removal of the two serines from CL7.1 (CL7.1−2S) increased the inhibition capacity of the peptide to a level comparable to that achieved with CL1.1. In contrast, the introduction of serines into the sequence of CL1.1 (CL1.1+2S) abolished its inhibition potency (Fig. 4C).

Of note, the control peptide (CL7.4, see Materials and Methods) displayed similar properties to that of CL1.1. It formed an amphipathic alpha helix with a calculated μH of 0.28 (Fig. S4 in Supplemental File 1).

If amphipathicity were to play a major role in the antiviral activity of the peptides, the D-enantiomer of CL1.1 should exhibit antiviral properties similar to that of the

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

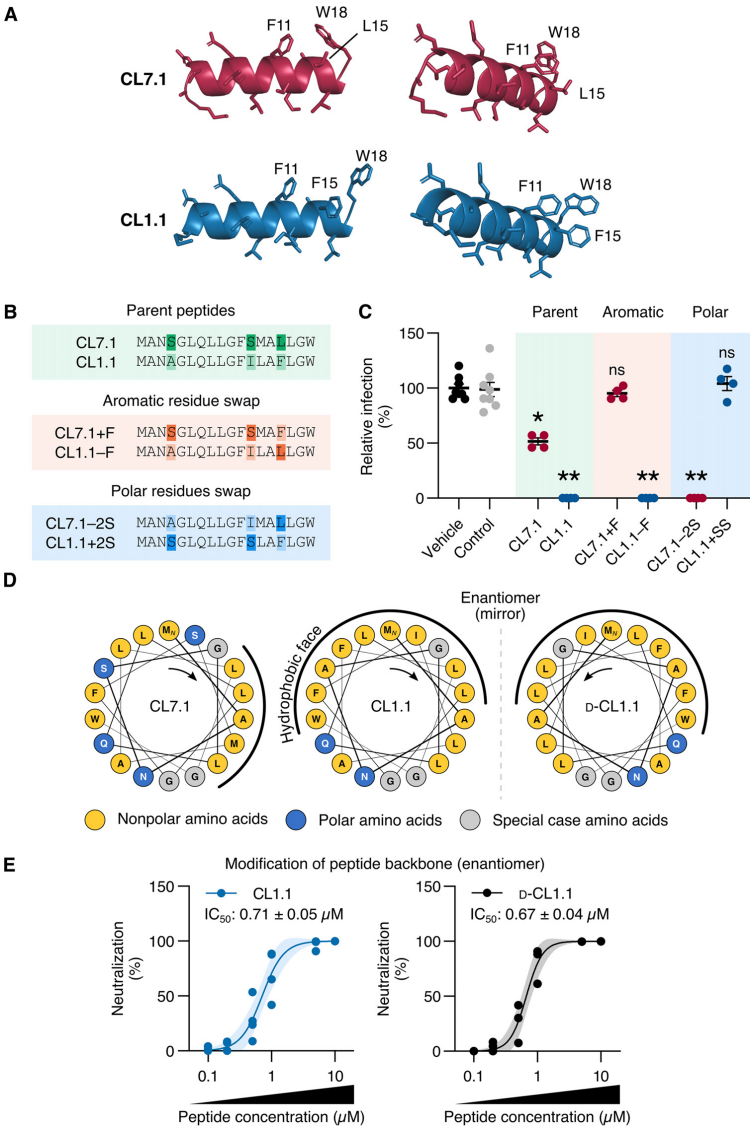


FIG 4 Amphipathicity was involved in the differences in potency between claudin-derived peptides. (A) The tridimensional structure of CL7.1 (red) and CL1.1 (blue) was predicted using PEP-FOLD3. Three amino acids of interest at positions 11, 15, and 18 are indicated. (B) Sequences of the parental and modified peptides. The swapped amino acids are highlighted. (C) ZIKV (MOI of 1) was treated with 50 μM of the modified peptides described in (B) for 1 h. These treated inocula were used to infect hCMEC/D3 cells for 2 h, unbound viruses were washed away, and infected cells were kept in a fresh medium containing peptides for 48 h. Viral production was assessed by titrating the supernatants (compared to control peptide CL7.4 or vehicle alone). (D) Helical wheel projections of CL7.1, CL1.1, and D-CL1.1. Left or right orientations of the helixes are indicated with an arrow and the hydrophobic faces of each peptide are shown with a black line. (E) Dose-dependent effect of CL1.1 and D-CL1.1 on ZIKV infection of Vero E6 cells (MOI of 1, Brazil/2016/INMI1 strain). The dark line represents the fitted dose-response model for each peptide and the light area represents the 95% confidence interval of the model. The calculated IC_{50} is indicated. Data are presented as individual biological replicates and mean ± SEM; **, $P \leq 0.01$; *, $P \leq 0.05$; ns, $P > 0.05$ (Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's *post hoc*).

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

L-enantiomer. A D-enantiomer of an alpha helix forms a mirrored left-handed helix (Fig. 4D) but retains the same physicochemical properties (28). We found that the antiviral activity of D-CL1.1 against ZIKV infection of Vero E6 cells was identical to that of CL1.1 (Fig. 4E). The calculated IC_{50} values were 0.71 $\pm$ 0.05 μM and 0.67 $\pm$ 0.04 μM for CL1.1 and D-CL1.1, respectively (Fig. 4E).

Taken together, our results indicated that the difference in the anti-ZIKV efficacy between CL1.1 and CL7.1 correlated with amphipathicity.

CL1.1 altered ZIKV particle ultrastructure without compromising viral integrity. In some cases, the antiviral activity of amphipathic peptides has been associated with the capacity of the peptides to disrupt viral lipid envelopes or induce virus aggregation (8–10, 29). Therefore, we investigated potential peptide-induced alterations in ZIKV ultrastructure.

We treated a suspension of ZIKV from the Asian lineage (6.5×10^{10} PFU/mL) with 10 μM CL1.1 or a control peptide for 1 h. The viruses were then fixed and analyzed in negative staining electron microscopy. Under control conditions, all free viral particles were well defined (Fig. 5A) and spherical (Fig. 5B). In contrast, in the presence of CL1.1, the particles were angular (Fig. 5A) and significantly less spherical (Fig. 5B). The perimeter of the CL1.1-treated viruses was also noticeably less electron-dense, whereas the core of the viruses remained electron-dense (Fig. 5A).

Such changes in ultrastructure could lead to loss of viral integrity. We tested whether CL1.1 treatment could disorganize the capsid and lead to the release of viral RNA or make it accessible to RNase A. Using an RNase protection assay (30), we found that the amount of viral RNA was identical to the untreated virus after treatment with 10 μM CL1.1 or in control peptide, indicating that the genome was well protected in the presence of the peptide. As a control, we used 1% Triton X-100, a detergent commonly used to disrupt lipid envelopes. As expected, viral RNA was degraded upon RNase A treatment in the presence of Triton X-100 (Fig. 5C). Of note, CL1.1 had no inhibitory effect on the RNase A activity because combining Triton X-100 and CL1.1 yielded the same result as the treatment with Triton X-100 alone (Fig. 5C).

These data indicated that CL1.1 induced significant changes in the structure of ZIKV particles but did not render viral RNA accessible. We speculated that the peptide bound to the lipid envelope of the virus through its hydrophobic face, rigidifying the envelope, which induced the morphology changes.

CL1.1 and CL7.1 may also interact with the ZIKV E protein. The amphipathicity of the peptides seems important for ZIKV inhibition. However, the control peptide CL7.4, which displayed a similar amphipathic of $\mu H = 0.28$, exhibited no antiviral activity. We hypothesized that the antiviral peptides may also interact with the viral E protein.

We used HPEPDOCK, a protein-peptide docking software (31), to identify the putative interactions between the claudin-derived peptides and the ZIKV E protein in its prefusion state (32) because the interaction likely occurred before the pH-dependent conformational change (Fig. 6A). The software predicted that CL1.1 and CL7.1 would bind to the stem region between the two envelope-proximal alpha helices H1 and H3 (Fig. 6B). The hydrophilic faces of the peptides would participate in the protein-peptide interactions and the hydrophobic faces would be in close contact the lipid envelope (Fig. 6B). No such interaction was predicted for the control peptide (Fig. S5 in Supplemental File 1).

These results suggested that the peptides may bridge the stem domain of the ZIKV E protein near the viral envelope.

CL1.1 neutralized other flaviviruses but not unrelated enveloped viruses. Our data suggested that the inhibitory peptides may act through interaction with both the lipid envelope of the virion and the ZIKV E proteins. Alignment of the sequence of the ZIKV stem domain with the corresponding sequences of other flaviviruses revealed that the region was highly conserved among flaviviruses (Fig. 6C). Therefore, we postulated that the peptides would exhibit a broad anti-flavivirus activity. We tested the activity of CL1.1 (the most effective peptide) on JEV and YFV infections.

JEV and YFV inocula (5×10^5 PFU/mL) were treated with various concentrations of

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

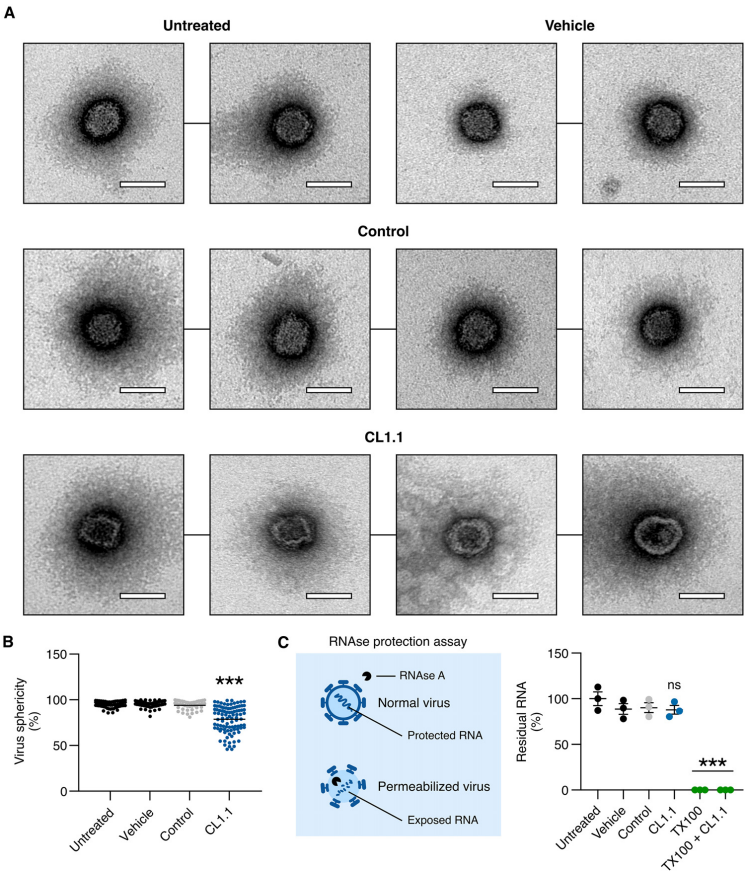


FIG 5 Effect of CL1.1 on ZIKV ultrastructure and envelope integrity. (A) ZIKV (6.5×10^{10} PFU/mL, H/PF/2013 strain) was treated with 10 μM CL1.1 for 1 h. The viruses were then analyzed by electron microscopy (the control peptide was CL7.4, and the vehicle was DMSO). Fields with individual virions are presented. Scale, 50 nm. (B) The sphericity of viral particles was assessed by calculating the ratio between the height (*h*) and the length (*l*) of the particles. Spherical particles have an *h*:*l* ratio of 1, and elongated particles have an *h*:*l* ratio smaller than 1. (C) ZIKV integrity was assessed by an RNase A protection assay. ZIKV (Brazil/2016/INMI1 strain) was treated with 10 μM CL1.1 or 1% Triton X-100 (with and without CL1.1) for 1 h, followed by treatment with RNase A for 1 h. Residual viral RNA was quantified by RT-qPCR (compared to control peptide CL7.4 or vehicle alone). Data are presented as individual biological replicates and mean ± SEM; ***, $P \leq 0.001$; ns, $P > 0.05$ ((B) Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's *post hoc*; (C) one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc*). Uncropped source pictures are available in Fig. S8 in Supplemental File 1.

CL1.1, and we tested the efficacy of infection of Vero E6 cells (MOI of 1) as determined by titration. We found that CL1.1 effectively inhibited the infection by JEV and YFV in Vero E6 cells in a dose-dependent manner. The IC_{50} was comparable to that of ZIKV with values of 0.87 ± 0.11 μM, 0.53 ± 0.08 μM, and 0.56 ± 0.05 μM for ZIKV, JEV, and YFV, respectively (Fig. 1C and 7A). In line with our previous observations, the antiviral properties of D-CL1.1 were comparable to that of CL1.1 (Fig. S6 in Supplemental File 1).

We finally wondered whether the claudin-derived peptides could exhibit a broader antiviral function, and tested the antiviral activity of 50 μM CL1.1 against HIV-1 and SARS-CoV-2, two unrelated enveloped viruses. No antiviral activity of CL1.1 against

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

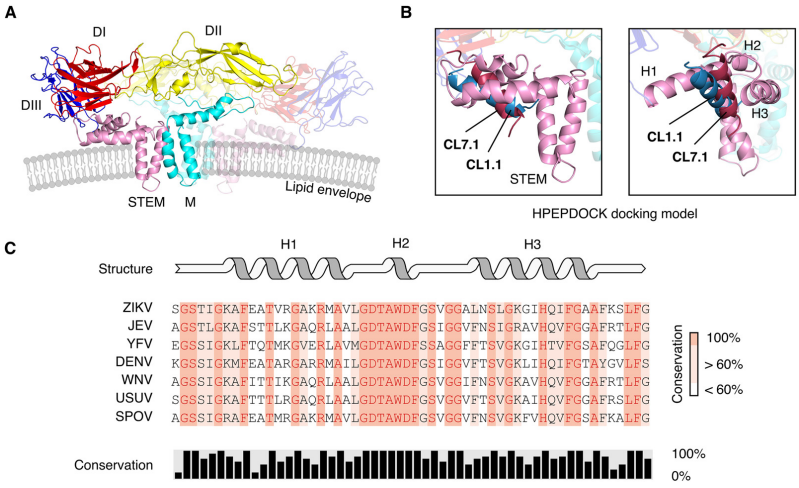


FIG 6 Claudin-derived peptides docking to ZIKV surface proteins. (A) The surface of the ZIKV virion was decorated by membrane (M) and envelope (E) proteins that form a dimer. The different domains of the E protein (STEM, DI to DIII) are indicated (in pink, red, yellow, and blue). The lipid envelope of the virus is shown. PDB accession number 5IRE. (B) Molecular docking prediction of CL7.1 (red) and CL1.1 (blue) to the ZIKV surface proteins was obtained using HPEPDOCK. CL1.1 and CL7.1 insert in-between membrane-proximal alpha helixes H1 and H3 of the stem domain of E (pink). The right panel is a 70-degree rotation along the *y*-axis of the left panel. (C) Sequences alignment of stem domains of E proteins from ZIKV, JEV, YFV, DENV, WNV, USUV, and SPOV is presented. The percentage amino acid conservation between the viruses and the corresponding secondary structure are indicated. DI to DIII, domains I to III of the envelope protein; STEM, stem domain of the envelope protein; H1 to H3, alpha helixes of the stem domain; M, membrane protein.

either HIV-1 infection of human primary CD4$^+$ T cells or SARS-CoV-2 infection of Vero E6 cells was detected using flow cytometry (Fig. 7B to C).

In conclusion, CL1.1 seemed to display a specific anti-pan-flavivirus activity.

DISCUSSION

We identified two helical peptides derived from the N-terminal sequences of human claudin-1 and claudin-7 (named CL1.1 and CL7.1, respectively) that exhibit anti-ZIKV properties. Fusion assays on mosquito cells revealed that the peptides blocked the pH-dependent E-mediated fusion. CL1.1 was more potent than CL7.1. We also found that CL1.1 exhibited broad-spectrum anti-flavivirus properties, as it inhibited infection of Vero E6 cells by JEV and YFV. Inhibition was independent of the target cell type and antiviral peptides appeared to interact directly with the ZIKV particles. Claudin-derived peptides were predicted to form amphipathic alpha helices. These amphipathic helices likely interact with the virus lipid envelope. Electron microscopy observations revealed that treatment of virions with CL1.1 modified the shape of the virions. *In silico* prediction also suggested that claudin-derived peptides may engage with the stem domain of ZIKV E protein. We, therefore, propose that claudin-derived peptides inhibit the E-mediated fusion by simultaneously interacting with the virus lipid envelope and the E-protein, preventing E-protein conformational changes or alterations in lipid curvature, which are both necessary for the fusion.

We recently demonstrated that claudin-7 is required for optimal ZIKV replication in human endothelial cells (15). We initially expected that the claudin-7-derived peptides spanning over the putative ZIKV binding site would bind to the E protein and prevent the interaction of the virus with claudin-7. Such a strategy was used in other settings (33). Intriguingly, none of the peptides corresponding to extracellular domains of claudin-7 had a significant impact on ZIKV infection of hCMEC/D3 cells. The lack of viral interference with the infection could be the consequence of a poor conformation of the

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

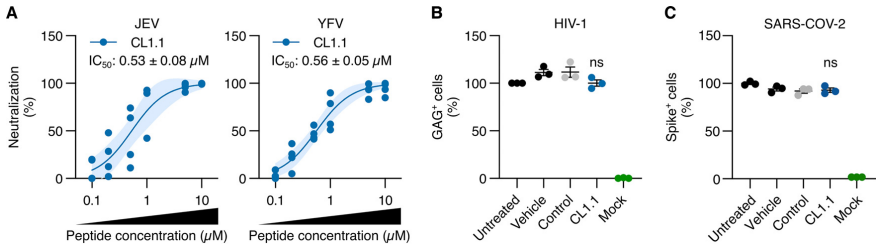


FIG 7 CL1.1 neutralized other flaviviruses. (A) Dose-dependent antiviral activity of the CL1.1 was tested on the infection Vero E6 with JEV (MOI of 1, JEV/G3/RP-9 strain) and YFV (MOI of 1, YFV/17D strain). Viral production was assessed by titrating the supernatants. The dark line represents the fitted dose-response model, and the light area represents the 95% confidence interval of the model. The calculated IC_{50} is indicated. (B) HIV-1 (50 ng/mL) was treated with 50 μM CL1.1 for 1 h. This inoculum was used to infect primary $CD4^+$ T lymphocytes for 3 h. After infection, the unbound virus was washed and cells were kept in a fresh medium containing peptides for 72 h. Viral infection was assessed through flow cytometry on Gag^+ cells (compared to untreated cells; vehicle corresponds to DMSO, control peptide was CL7.4). (C) SARS-CoV-2 (MOI of 1) was treated with 50 μM CL1.1 for 1 h. This inoculum was adsorbed on Vero E6 cells for 2 h. Then, the unbound virus was washed away, and cells were kept in a fresh medium containing peptides for 72 h. Viral infection was assessed by flow cytometry on $Spike^+$ cells (compared to untreated cells; vehicle corresponds to DMSO, control peptide to CL7.4). Data are presented as individual biological replicates and mean ± SEM; ns, $P > 0.05$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc*).

peptides. Extracellular domains of claudins were composed of beta sheets (Fig. S1 in Supplemental File 1) while the peptides likely form alpha helices in solution (Fig. 4A).

Nevertheless, we found that the peptide corresponding to the N-terminal 18-mer of claudin-7, named CL7.1, inhibits ZIKV infection in five human cell lines. This was reminiscent of a previous study demonstrating that the corresponding peptide derived from claudin-1, named here CL1.1, inhibits HCV infection in hepatoma Huh7.5.1 cells (19). CL1.1 is more efficient than CL7.1 in blocking ZIKV infection. Of note, CL1.1 and CL7.1 only have 4 amino acid differences, but their antiviral efficacy differs by almost 1 log, evidencing the high specificity of these peptides.

The efficacy of CL1.1 was intriguing since claudin-1 is not expressed in hCMEC/D3 cells (18). Similarly, we found that CL7.1-mediated inhibition is comparable between endothelial and epithelial cells but previously found that claudin-7 does not seem to play a role in epithelial cell infection (15). We concluded that inhibition was not achieved by interfering in the interaction between prM/E and claudin. This led us to search for a mechanism of inhibition that is independent of expression levels of claudin expression in cells.

When the treatment of ZIKV particles with the claudin-derived peptides was followed by dilution and culture with the cells, we found that the inhibition was retained although slightly lower than that obtained by retaining peptides in the culture medium throughout the experiment. This could be the result of reversibility in the virus-peptide interactions.

The reversibility of the interaction between CL1.1 and the HCV E1/E2 proteins has previously been demonstrated by ultracentrifugation (19). Differences in inhibition efficacy could also be explained by the fact that peptides present in the culture medium could bind and inhibit newly formed particles.

Many antiviral peptides have been described over the years, including against flaviviruses, and their mechanisms of action are diverse. Several models suggest that antiviral peptides could induce particle aggregation and/or prevent viral entry to the cell (10, 34, 35). Here, CL1.1 did not seem to alter viral binding to the cell membrane or internalization. Electron microscopic observations did not evidence particle aggregation. In other models, antiviral peptides are virucidal as they form pores in the viral lipid envelope, disrupting viral integrity (7–10, 30). We found no such effect. Viral RNA was still protected from RNase in particles upon claudin-derived peptide treatment. Finally, some antiviral peptides have been shown to block viral fusion (36), which seems to be the case for the claudin-derived peptides.

Our findings highlighted the importance of the amphipathicity of CL1.1 and CL7.1

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

in their ability to inhibit ZIKV infection. Amphipathicity has been previously reported as key for the antiviral activities of peptides (37). Both L- and D-enantiomers of CL1.1 showed an identical affinity for ZIKV, YFV, and JEV. It is recognized that chiral peptides retain their hydrophobic properties but should have altered affinities for proteins (38). Since the control peptide CL7.4 has a similar amphipathicity as CL1.1, it suggests that CL1.1 antiviral activity does not depend solely on peptide-lipid interactions, but that some interaction between the peptide and the E protein may also be at play.

In silico analyses suggested that CL1.1 and CL7.1 may directly interact with the stem domain of the ZIKV E protein in an envelope-proximal pocket. This is consistent with the previous study that showed direct binding of HCV E1/E2 to CL1.1 (19). The stem domain is highly conserved among flaviviruses, and we found that CL1.1 was also able to block both JEV and YFV infections. Other groups also suggested that peptides derived from, or interacting with, the stems of other flaviviruses displayed broad-spectrum antiviral properties (8, 36, 39). The stem domain seemed to constitute a promising target for anti-flavivirus drug design.

The amphipathicity of the peptides combined with the putative location of the interaction with the E protein (*in silico*) suggest that claudin-derived peptides likely bridge the E protein with the virus lipid envelope. This will lead to envelop rigidification, hence the change in sphericity observed by electron microscopy. The lack of antiviral activity of CL1.1 against HIV-1 or SARS-CoV-2 infections could then be related to differences in the lipid composition of viral envelopes along with a lack of interaction sites with Env and spike proteins.

Peptide-based treatments present several advantages. These molecules are often not cytotoxic, easy to manufacture, and have a high affinity to their targets (6). In addition, peptides can be designed to penetrate tissues and thus gain access to organs normally protected by barriers, such as the blood-brain barrier (9) or the blood-placental barrier (8, 40), both of which are of interest in preventing severe ZIKV brain infections in adults and fetuses. In some cases, claudin-derived peptides have been described as potent disruptors of tight junctions *in vitro* and *in vivo*, which could promote virus dissemination into some tissues and could lead to impaired organ functions (41–44). Our results showed that CL1.1 did not alter epithelial monolayer integrity.

The main limitation to the use of peptides in therapy is their limited persistence *in vivo*, mainly due to degradation by proteases. To counteract this phenomenon, D-enantiomers could be a good alternative, because they have the same efficacy *in vitro* and are less susceptible to degradation *in vivo* (28, 45).

Our findings provided a basis for the development of compounds that could target a large range of the known flaviviruses (e.g., ZIKV, JEV, YFV) and could also be efficient against flaviviruses that may emerge in the future. The development of such a molecule would be central to the preparation for future epidemics.

MATERIALS AND METHODS

Cells. Human embryonic kidney HEK 293T (ATCC, CRL-11268), human lung A549 (ATCC, CCL-185), human colon Caco-2/TC7 (Merck, SCC209), and African green monkey kidney Vero E6 (ATCC, CRL-1586) epithelial cell lines were maintained in high-glutamine and high-glucose DMEM (Thermo Fisher) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher), 100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin (Thermo Fisher).

Aedes albopictus embryonic C6/36 (ATCC, CRL-1660) cells were maintained in Leibovitz's L-15 medium (Thermo Fisher) supplemented with 10% FBS and antibiotics.

Human cerebral microvascular hCMEC/D3 (Merck, SCC066), human bone marrow TrHBMEC (46), and primary human umbilical vein HUVEC (ATCC, CRL-1730) endothelial cells were maintained in complete EndoGRO Basal Medium (Merck) supplemented with 5% FBS, 0.2% EndoGRO-LS supplement, 5 ng/mL rhEGF, 10 mM L-glutamine, 1 μg/mL hydrocortisone hemisuccinate, 0.75 U/mL heparan sulfate, 50 μg/mL ascorbic acid (Merck), and antibiotics.

Human primary $CD4^+$ T lymphocytes were isolated from the blood of healthy donors provided by the EFS (Etablissement Français du Sang, the official French blood bank) as previously described (47). The cells were activated with 1 μg/mL phytohaemagglutinin (Oxoid) for 24 h and then cultivated in RPMI supplemented with 10% FBS, 50 IU/mL human IL-2, and antibiotics. Primary $CD4^+$ T lymphocytes were left to expand for 5 to 7 days before use.

All cells were kept at 37°C with 5% CO_2 except for C6/36 which were kept at 28°C with no CO_2.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

Viruses. Zika viruses (ZIKV) were produced on Vero E6 cells. Experiments were performed on strain AF/1991/HD78788 (African lineage; GenBank accession no. KF383039) unless otherwise indicated. Other ZIKV strains were tested, including Brazil/2016/INMI1 (Asian lineage, GenBank accession no. KU991811) and H/PF/2013 (Asian lineage; GenBank accession no. KY766069). Japanese encephalitis virus strain JEV/G3/RP-9 (48) and yellow fever vaccine strain YFV/17D (GenBank accession no. MG051217) were produced on C6/36 cells.

HIV NL4-3 strain was produced by calcium-phosphate transfection of HEK-293T cells as previously described (47).

The SARS-CoV-2 isolate BetaCoV/France/IDF00372/2020 (EVAg collection, Ref-SKU no. 014V-03890) was kindly provided by the National Reference Centre for Respiratory Viruses hosted by Institut Pasteur and headed by S. van der Werf.

All infections were performed in 2% FBS media in biosafety level (BSL)-3 facilities.

Peptides. Claudin-derived peptides used in this study (of which sequences are detailed in Table S1 in Supplemental File 1) were synthesized by GenScript (Netherlands). The peptides were initially dissolved at a concentration of 5 mM in DMSO (Merck) as stock solution and were then used at various concentrations from stock as indicated. The final concentration of DMSO was never greater than 1% (vol/vol) except in the cytotoxicity assay.

As controls for our experiments, we intended to use scrambled versions of CL7.1 and CL1.1. After multiple failed attempts to synthesize these controls, we opted to use CL7.4, a peptide from our screen that did not have a significant effect on ZIKV infection but shared common features to CL7.1 and CL1.1 (i.e., similar alpha-helical structure and amphipathicity value μH = 0.28, see Fig. S4 in Supplemental File 1).

Viral replication assay. Infected cells were washed with PBS and intracellular RNA was extracted using the Nucleospin 96 RNA kit (Macherey-Nagel). One-step RT-qPCR was performed using the GoTaq 1-Step RT-qPCR kit (Promega) with the following protocol: 15 min at 37°C, 10 min at 95°C followed by 40 cycles consisting of 10 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 sec at 72°C (QuantStudio 6 Flex real-time PCR system, Applied Biosystems). The melting curve was obtained to certify specific amplification. Genome equivalent concentration was assessed with the standard curve method using known concentrations of synthetic RNA fragments corresponding to the ZIKV *NS5* coding region and was normalized to the *GAPDH* level.

The ZIKV *NS5* primers used were 5′-AAGTACACATACCAAAACAAAGTG (forward) and 5′-TCCGCTCCC CCTTTGGTCTTG (reverse). The *GAPDH* primers used were 5′-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT (forward) and 5′-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG (reverse).

Viral titration assay. Supernatants of ZIKV and YFV infected cells were sequentially diluted 10-fold and inoculated onto Vero E6 monolayers in 24-well plates. After 1 h of incubation, 2% carboxymethyl cellulose (CMC; Merck) overlay containing 2% FBS culture medium was added to each well. The cells were then incubated at 37°C for 5 days. Following the incubation, the CMC overlay was removed and a PBS – paraformaldehyde 4% (Electron Microscopy Sciences) solution was added to each well and incubated at room temperature for 15 min. The fixation solution was removed, and plates were washed three times with PBS. Plates were then stained with a 1% crystal violet solution (Merck). The titer was expressed as PFU.

Alternatively, for JEV infected cells, plates were incubated at 37°C for 2 days after adding the CMC overlay. They were then washed and fixed as described earlier. Cells were then permeabilized with PBS-Triton 0.2% for 3 min, washed three times, and incubated in blocking buffer (PBS, Tween 20 0.1%, and FBS 1%) for 30 min followed by 2 h of incubation with pan-Flavivirus antibody 4G2 purified from the ATCC hybridoma. Plates were washed three times with PBS followed by an hour-long incubation with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Bio-Rad). Detection was achieved using the VIP Peroxidase Assay (Vector) according to the manufacturer's recommendations. The titer was expressed as foci-forming units (FFU).

Cytotoxicity assay. Confluent A549 monolayers were treated with 0 to 200 μM CL1.1 or control peptide for 48 h at 37°C. We used an equivalent volume of DMSO as a control. Following the treatment, the medium was swapped for fresh DMEM with 2% FBS in the presence of 1.2 mM MTT. Mitochondrial reduction of MTT into Formazan was allowed for 4 h. Formazan was dissolved in isopropanol-HCl and absorbance at 570 nm was measured with a Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Fisher).

Tight-junctions disruption assay. Caco-2/TC7 cells were cultured on Transwell inserts (12 mm diameter, 3 μm porosity, polycarbonate, Costar) for 21 days, delimiting apical (upper chamber) and basolateral (lower chamber) compartments. Apical and basolateral media were replaced every 2 days, and transepithelial electric resistance (TEER) was routinely analyzed (EVOM World Precise Instruments). Once fully differentiated, the monolayers were treated with 50 μM CL1.1 or control peptide and TEER was measured at different time points over a 24 h period. We used 10 μM EDTA (Thermo Fisher) as a control.

Binding and internalization assay. Cells were seeded in 2% FBS medium 24 h before infection. Prechilled cells were incubated with ZIKV (MOI of 10) for 1 h at 4°C – to block the internalization of the viruses – in the presence of 10 μM CL1.1 or control peptide. We used 200 μg/mL Heparin (Merck) as a control. The cells were then washed three times with cold PBS to remove unbound particles. Cell surface adsorbed ZIKV particles were analyzed by harvesting RNA at this step.

ZIKV internalization was induced by adding a warm medium and keeping the cells at 37°C for 2 h in the presence of 10 μM CL1.1 or a control peptide. We used 100 μM Dynasore (Merck) as a control. The cells were then treated with 0.05% Trypsin (Thermo Fisher) to remove uninternalized particles, cells were pelleted, and RNA was harvested.

Cell-to-cell fusion assay. Confluent C6/36 monolayers were infected with ZIKV (MOI of 2) for 48 h to ensure all the cells were infected before the experiment. The cells were then incubated in fresh RPMI

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

1640 medium (Thermo Fisher) incubated for 1 h at 37°C in the presence of 10 μM CL1.1, or 50 μM CL7.1, or 50 μM the control peptide (i.e., CL7.4). We used 500 ng/mL 4G2 MAb (ATCC hybridoma) as a control. The medium was then swapped for RPMI-10 mM MES (pH 5.5) or RPMI-HEPES 10 mM (pH 7.0) and cell-to-cell fusion was allowed for 2 h at 37°C. Cells were then fixed with isopropanol for 15 min at −20°C, air-dried, and stained with 10% Giemsa solution (RAL Diagnostics). Cell-to-cell fusion was visualized with bright field microscopy (EVOS M5000, Thermo Fisher). Fusion-index (FI) was quantified using the following formula: 1 − (number of cytoplasms/number of nuclei). For the quantification, fields with 200 ± 50 nuclei were considered.

***In silico* peptide structure predictions.** Structures of the peptides were predicted using the PEP-FOLD3 software (25) hosted on the Mobyle platform of the French Ressource Parisienne en Bioinformatique Structurale (49). The predictions were made using the sequences of CL1.1 and CL7.1, 100 simulations were performed, and the models were ranked by sOPEP, the best model was considered for analysis.

Amphipathicity of the peptides was explored using HELIQUEST (26). Calculations for the amphipathicity value (μH) of the peptides were conducted using the Eisenberg scale (27).

Electron microscopy. ZIKV was first concentrated by polyethylene glycol 6000 (Merck) precipitation and purified by centrifugation in a discontinued gradient of sucrose. These sucrose-purified viruses were used for the electron microscopy experiments.

A ZIKV stock (5×10^8 PFU) was mixed with 10 μM CL1.1 or control peptide for 1 h at 37°C. The different mixtures were then fixed by the addition of 4% PFA and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) before being placed in contact with Formvar/carbon-coated nickel grids for 5 min. Negative staining was performed using 2% uranyl acetate (Agar Scientific) followed by transmission electron microscope analyses (JEM 1011, JEOL).

RNase A protection assay. A ZIKV stock (1×10^6 PFU, H/PF/2013 strain) was mixed with 10 μM CL1.1 or control peptide for 1 h at 37°C. We used 1% Triton X-100 (Merck) as a control. Then, RNase A (Thermo Fisher) was added to a final concentration of 100 μg/mL and incubated for 1 h at 37°C. Ribolock RNase inhibitor (Thermo Fisher) was added to a final concentration of 400 U/mL and incubated for 10 min at 37°C. Viral RNA was harvested from the solution using the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen) and RT-qPCR was performed as described above. To ensure that CL1.1 does not prevent RNase A degradation, we used a condition with Triton X-100 mixed with RNase A.

***In silico* peptide-protein interaction predictions.** The interaction model of CL1.1 and ZIKV envelope protein (PBD accession code 5IRE) was generated using HPEPDOCK (31) using the CL1.1 structure predicted earlier with PEP-FOLD3.

Flavivirus stem sequences alignment. Sequences of the stem domains of the E protein from ZIKV (GenBank accession no. AHZ13508), JEV (GenBank accession no. M55506), YFV (GenBank accession no. AAC35899), DENV (GenBank accession no. AAB70694), WNV (GenBank accession no. AAA48498), Usutu virus (USUV; GenBank accession no. AAS59402) and Spondweni virus (SPOV; GenBank accession no. AOZ57820) were aligned using MUSCLE.

Flow cytometry. For Gag staining, infected cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min and incubated with the KC57-PE monoclonal antibody (Beckman Coulter) in PBS, 1% BSA, and 0.05% Saponin (Merck) for 30 min at 4°C. Samples were analyzed on a FACSCanto II (BD Biosciences).

For Spike staining, infected cells were fixed in 4% PFA for 10 min and staining was performed in PBS, 1% BSA, 0.05% sodium azide, and 0.05% Saponin. Cells were stained with the primary pan-SARS-CoV-2 anti-S mAb102 human monoclonal antibody (50) and secondary Alexa Fluor 477 (Thermo Fisher) for 30 min at 4°C. Samples were analyzed on an Attune NxT (Thermo Fisher).

Quantification and statistical analyses. Graphical representations and statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.2 for macOS (GraphPad Software). Following a positive normality test, data were analyzed with a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post hoc*. Otherwise, data were analyzed with a nonparametric Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's *post hoc*.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.8 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nicoletta Casartelli for her help on HIV-1-related experiments. We thank Florence Guivel-Benhassine for help with virus titration, Charlotte Calvet for help with sample preparation for scanning electron microscopy, Sylvie Van der Werf for the SARS-CoV-2 isolate used in this study, and Nicolas Escriou for the gift of a SARS-CoV-2 spike antibody. We thank Stéphane Roche for his biochemistry-related input and discussions on the project. We thank Pierre-Emmanuel Ceccaldi for his input and discussions on the project.

This work was supported by a Pasteur-Fiocruz grant and the "Investissement d'Avenir" as part of a "Laboratoire d'Excellence" (LabEx) French research program: Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases (ANR10-LBX-62 IBEID). Jim Zoladek and Sophie Desgraupes were the recipients of Ph.D. fellowships from the ED562-BioSPC and the French ministry of education and research.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

We 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.

Conceptualization: Jim Zoladek and Philippe V. Afonso; data curation: Jim Zoladek; formal analysis: Jim Zoladek, Julien Burlaud-Gaillard, Sophie Desgraupes, and Philippe V. Afonso; funding acquisition: Antoine Gessain and Philippe V. Afonso; investigation: Jim Zoladek, Julien Burlaud-Gaillard, Maxime Chazal, Sophie Desgraupes, Patricia Jeannin, Mathieu Hubert, and Philippe V. Afonso; methodology: Jim Zoladek, Philippe Roingeard, Nolwenn Jouvenet and Philippe V. Afonso; project administration: Antoine Gessain and Philippe V. Afonso; resources: Nathalie Pardigon, Philippe Roingeard and Nolwenn Jouvenet; supervision: Philippe V. Afonso; validation: Philippe Roingeard, Nolwenn Jouvenet and Philippe V. Afonso; visualization: Jim Zoladek; writing – original draft preparation: Jim Zoladek and Philippe V. Afonso; writing – review & editing: Jim Zoladek, Julien Burlaud-Gaillard, Maxime Chazal, Sophie Desgraupes, Patricia Jeannin, Antoine Gessain, Nathalie Pardigon, Philippe Roingeard, Nolwenn Jouvenet, and Philippe V. Afonso.

REFERENCES

1. Pierson TC, Diamond MS. 2020. The continued threat of emerging flaviviruses. Nat Microbiol 5:796–812. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0.
2. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P, Vial AL, Decam C, Choumet V, Halstead SK, Willison HJ, Musset L, Manuguerra JC, Despres P, Fournier E, Mallet HP, Musso D, Fontanet A, Neil J, Ghawché F. 2016. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. Lancet 387:1531–1539. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6.
3. Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, Salje H, Van Kerkhove MD, Abadie V, Garel C, Fontanet A, Mallet H-P. 2016. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. Lancet 387:2125–2132. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00651-6.
4. Carteaux G, Maquart M, Bedet A, Contou D, Brugières P, Fourati S, Cleret de Langavant L, de Broucker T, Brun-Buisson C, Leparc-Goffart I, Mekontso Dessap A. 2016. Zika virus associated with meningoencephalitis. N Engl J Med 374:1595–1596. https://doi.org/10.1056/NEJMc1602964.
5. Mécharles S, Herrmann C, Poullain P, Tran T-H, Deschamps N, Mathon G, Landais A, Breurec S, Lannuzel A. 2016. Acute myelitis due to Zika virus infection. Lancet 387:1481. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00644-9.
6. Vilas Boas LCP, Campos ML, Berlanda RLA, de Carvalho Neves N, Franco OL. 2019. Antiviral peptides as promising therapeutic drugs. Cell Mol Life Sci 76:3525–3542. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03138-w.
7. Xiong W, Li J, Feng Y, Chai J, Wu J, Hu Y, Tian M, Lu W, Xu X, Zou M. 2021. Brevinin-2GHk, a peptide derived from the skin of Fejervarya limnocharis, inhibits Zika virus infection by disrupting viral integrity. Viruses 13:2382. https://doi.org/10.3390/v13122382.
8. Yu Y, Deng YQ, Zou P, Wang Q, Dai Y, Yu F, Du L, Zhang NN, Tian M, Hao JN, Meng Y, Li Y, Zhou X, Chan JFW, Yuen KY, Qin CF, Jiang S, Lu L. 2017. A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. Nat Commun 8:15672. https://doi.org/10.1038/ncomms15672.
9. Jackman JA, Costa VV, Park S, Real ALCV, Park JH, Cardozo PL, Ferhan AR, Olmo IG, Moreira TP, Bambirra JL, Queiroz VF, Queiroz-Junior CM, Foureaux G, Souza DG, Ribeiro FM, Yoon BK, Wynendaele E, De Spiegeleer B, Teixeira MM, Cho NJ. 2018. Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide. Nat Mater 17:971–977. https://doi.org/10.1038/s41563-018-0194-2.
10. Lee SH, Kim EH, O'neal JT, Dale G, Holthausen DJ, Bowen JR, Quicke KM, Skountzou I, Gopal S, George S, Wrammert J, Suthar MS, Jacob J. 2021. The amphibian peptide Yodha is virucidal for Zika and dengue viruses. Sci Rep 11:602. https://doi.org/10.1038/s41598-020-80596-4.
11. Campos DMO, Bezerra KS, Esmaile SC, Fulco UL, Albuquerque EL, Oliveira JIN. 2020. Intermolecular interactions of cn-716 and acyl-KR-aldehyde dipeptide inhibitors against Zika virus. Phys Chem Chem Phys 22:15683–15695. https://doi.org/10.1039/d0cp02254c.
12. Chen L, Liu Y, Wang S, Sun J, Wang P, Xin Q, Zhang L, Xiao G, Wang W. 2017. Antiviral activity of peptide inhibitors derived from the protein E stem against Japanese encephalitis and Zika viruses. Antiviral Res 141:140–149. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.02.009.
13. Si L, Meng Y, Tian F, Li W, Zou P, Wang Q, Xu W, Wang Y, Xia M, Hu J, Jiang S, Lu L. 2019. A peptide-based virus inactivator protects male mice against Zika virus-induced damage of testicular tissue. Front Microbiol 10:2250. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02250.
14. Xing M, Ji M, Hu J, Zhu T, Chen Y, Bai X, Mwangi J, Mo G, Lai R, Jin L. 2020. Snake cathelicidin derived peptide inhibits zika virus infection. Front Microbiol 11:1871. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01871.
15. Zoladek J, Legros V, Jeannin P, Chazal M, Pardigon N, Ceccaldi P-E, Gessain A, Jouvenet N, Afonso PV. 2021. Zika virus requires the expression of claudin-7 for optimal replication in human endothelial cells. Front Microbiol 12:2677.
16. Gao F, Duan X, Lu X, Liu Y, Zheng L, Ding Z, Li J. 2010. Novel binding between pre-membrane protein and claudin-1 is required for efficient dengue virus entry. Biochem Biophys Res Commun 391:952–957. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.172.
17. Che P, Tang H, Li Q. 2013. The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. Virology 446:303–313. https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.08.009.
18. Vu K, Weksler B, Romero I, Couraud P-O, Gelli A. 2009. Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by Cryptococcus neoformans. Eukaryot Cell 8:1803–1807. https://doi.org/10.1128/EC.00240-09.
19. Si Y, Liu S, Liu X, Jacobs JL, Cheng M, Niu Y, Jin Q, Wang T, Yang W. 2012. A human claudin-1-derived peptide inhibits hepatitis C virus entry. Hepatology 56:507–515. https://doi.org/10.1002/hep.25685.
20. Kim SY, Zhao J, Liu X, Fraser K, Lin L, Zhang X, Zhang F, Dordick JS, Linhardt RJ, Young KS, Zhao J, Liu X, Fraser K, Lin L, Zhang X, Zhang F, Dordick JS, Linhardt RJ. 2017. Interaction of Zika virus envelope protein with glycosaminoglycans. Biochemistry 56:1151–1162. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01056.
21. Li M, Zhang D, Li C, Zheng Z, Fu M, Ni F, Liu Y, Du T, Wang H, Griffin GE, Zhang M, Hu Q. 2020. Characterization of Zika virus endocytic pathways in human glioblastoma cells. Front Microbiol 11:242. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00242.
22. Watterson D, Robinson J, Chappell KJ, Butler MS, Edwards DJ, Fry SR, Bermingham IM, Cooper MA, Young PR. 2016. A generic screening platform for inhibitors of virus induced cell fusion using cellular electrical impedance. Sci Rep 6:22791. https://doi.org/10.1038/srep22791.
23. Lin HH, Huang LM, Wu SC. 2020. A quantitative luciferase-based cell–cell fusion assay to measure four-serotype dengue virus E protein-triggered membrane fusion. Hum Vaccin Immunother 16:2176–2182. https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1748989.
24. Gentry MK, Henchal EA, McCown JM, Brandt WE, Dalrymple JM. 1982. Identification of distinct antigenic determinants on Dengue-2 virus using monoclonal antibodies. Am J Trop Med Hyg 31:548–555. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.548.
25. Lamiable A, Thévenet P, Rey J, Vavrusa M, Derreumaux P, Tufféry P. 2016. PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. Nucleic Acids Res 44:W449–454. https://doi.org/10.1093/nar/gkw329.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.

26. Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G. 2008. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. Bioinformatics 24:2101–2102. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn392.
27. Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC. 1982. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. Nature 299:371–374. https://doi.org/10.1038/299371a0.
28. Hong SY, Oh JE, Lee K-H. 1999. Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. Biochem Pharmacol 58:1775–1780. https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00259-2.
29. Xiong W, Lu L, Xiao Y, Li J, Zhou D. 2019. Mortality and disability due to japanese encephalitis in elderly adults: evidence from an adult tertiary care center in west China. Front Neurol 10:918. https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00918.
30. Lok S-M, Costin JM, Hrobowski YM, Hoffmann AR, Rowe DK, Kukkaro P, Holdaway H, Chipman P, Fontaine KA, Holbrook MR, Garry RF, Kostyuchenko V, Wimley WC, Isern S, Rossmann MG, Michael SF. 2012. Release of Dengue virus genome induced by a peptide inhibitor. PLoS One 7:e50995. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050995.
31. Zhou P, Jin B, Li H, Huang S-Y. 2018. HPEPDOCK: a web server for blind peptide-protein docking based on a hierarchical algorithm. Nucleic Acids Res 46:W443–W450. https://doi.org/10.1093/nar/gky357.
32. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, Kuhn RJ. 2016. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. Science 352:467–470. https://doi.org/10.1126/science.aaf5316.
33. Karoyan P, Vieillard V, Gómez-Morales L, Odile E, Guihot A, Luyt C-E, Denis A, Grondin P, Lequin O. 2021. Human ACE2 peptide-mimics block SARS-CoV-2 pulmonary cells infection. Commun Biol 4:1–9. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01736-8.
34. Bai F, Town T, Pradhan D, Cox J, Ledizet M, Anderson JF, Flavell RA, Krueger JK, Koski RA, Fikrig E. 2007. Antiviral peptides targeting the West Nile virus envelope protein. J Virol 81:2047–2055. https://doi.org/10.1128/JVI.01840-06.
35. Doss M, White MR, Tecle T, Gantz D, Crouch EC, Jung G, Ruchala P, Waring AJ, Lehrer RI, Hartshorn KL. 2009. Interactions of α-, β-, and θ-defensins with influenza A Virus and surfactant protein D. J Immunol 182:7878–7887. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804049.
36. Schmidt AG, Yang PL, Harrison SC. 2010. Peptide inhibitors of dengue-virus entry target a late- stage fusion intermediate. PLoS Pathog 6:e1000851. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000851.
37. Hoffmann AR, Guha S, Wu E, Ghimire J, Wang Y, He J, Garry RF, Wimley WC. 2020. Broad-spectrum antiviral entry inhibition by interfacially active peptides. J Virol 94:e01682-20. https://doi.org/10.1128/JVI.01682-20.
38. Kumar CV, Buranaprapuk A, Sze HC, Jockusch S, Turro NJ. 2002. Chiral protein scissors: high enantiomeric selectivity for binding and its effect on protein photocleavage efficiency and specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 99:5810–5815. https://doi.org/10.1073/pnas.082119599.
39. Hrobowski YM, Garry RF, Michael SF. 2005. Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity. Virol J 2:49. https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-49.
40. Chandorkar GA, Ampasavate C, Stobaugh JF, Audus KL. 1999. Peptide transport and metabolism across the placenta. Adv Drug Deliv Rev 38:59–67. https://doi.org/10.1016/s0169-409x(99)00006-x.
41. Mrsny RJ, Brown GT, Gerner-Smidt K, Buret AG, Meddings JB, Quan C, Koval M, Nusrat A. 2008. A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity. Am J Pathol 172:905–915. https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070698.
42. Dithmer S, Staat C, Müller C, Ku MC, Pohlmann A, Niendorf T, Gehne N, Fallier-Becker P, Kittel Á, Walter FR, Veszelka S, Deli MA, Blasig R, Haseloff RF, Blasig IE, Winkler L. 2017. Claudin peptidomimetics modulate tissue barriers for enhanced drug delivery. Ann N Y Acad Sci 1397:169–184. https://doi.org/10.1111/nyas.13359.
43. Sauer RS, Krug SM, Hackel D, Staat C, Konasin N, Yang S, Niedermirtl B, Bosten J, Günther R, Dabrowski S, Doppler K, Sommer C, Blasig IE, Brack A, Rittner HL. 2014. Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. J Control Release 185:88–98. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.029.
44. Brewer MG, Anderson EA, Pandya RP, De Benedetto A, Yoshida T, Hilimire TA, Martinez-Sobrido L, Beck LA, Miller BL. 2020. Peptides derived from the tight junction protein CLDN1 disrupt the skin barrier and promote responsiveness to an epicutaneous vaccine. J Invest Dermatol 140:361–369.e3. https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.06.145.
45. Li H, Anuwongcharoen N, Malik AA, Prachayasittikul V, Wikberg JES, Nantasenamat C. 2016. Roles of d-amino acids on the bioactivity of host defense peptides. Int J Mol Sci 17:1023. https://doi.org/10.3390/ijms17071023.
46. Schweitzer KM, Vicart P, Delouis C, Paulin D, Dräger AM, Langenhuijsen MMAC, Weksler BB. 1997. Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells. Lab Invest 76:25–36.
47. Chauveau L, Donahue DA, Monel B, Porrot F, Bruel T, Richard L, Casartelli N, Schwartz O. 2017. HIV fusion in dendritic cells occurs mainly at the surface and is limited by low CD4 levels. J Virol 91:e01248-17. https://doi.org/10.1128/JVI.01248-17.
48. Liang JJ, Liao CL, Liao JT, Lee YL, Lin YL. 2009. A Japanese encephalitis virus vaccine candidate strain is attenuated by decreasing its interferon antagonistic ability. Vaccine 27:2746–2754. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.007.
49. Néron B, Ménager H, Maufrais C, Joly N, Maupetit J, Letort S, Carrere S, Tuffery P, Letondal C. 2009. Mobyle: a new full web bioinformatics framework. Bioinformatics 25:3005–3011. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp493.
50. Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, Staropoli I, Guivel-Benhassine F, Rajah MM, Planchais C, Porrot F, Robillard N, Puech J, Prot M, Gallais F, Gantner P, Velay A, Le Guen J, Kassis-Chikhani N, Edriss D, Belec L, Seve A, Courtellemont L, Péré H, Hocqueloux L, Fafi-Kremer S, Prazuck T, Mouquet H, Bruel T, Simon-Lorière E, Rey FA, Schwartz O. 2021. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. Nature 596:276–280. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 19 September 2022 by 157.99.174.87.