TROPISME ET DISSEMINATION DU VIRUS ZIKA DE LA MERE A L'ENFANT AU COURS DE L'ALLAITEMENT MATERNEL

Mathieu Hubert

▶ **To cite this version:**

Mathieu Hubert. TROPISME ET DISSEMINATION DU VIRUS ZIKA DE LA MERE A L'ENFANT AU COURS DE L'ALLAITEMENT MATERNEL. Virologie. Université de Paris 7 Denis Diderot, 2019. Français. NNT : . tel-04081055

HAL Id: tel-04081055

https://pasteur.hal.science/tel-04081055

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.

Thèse de doctorat de l'Université de Paris

École doctorale : Bio Sorbonne Paris Cité 562

Laboratoire d'accueil : Unité « Épidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes », département Virologie, Institut Pasteur, Paris, FRANCE

TROPISME ET DISSEMINATION DU VIRUS ZIKA DE LA MERE A L'ENFANT AU COURS DE L'ALLAITEMENT MATERNEL

Mathieu Hubert

Thèse de doctorat en Virologie

Dirigée par Pr. Pierre-Emmanuel Ceccaldi

Supervisée par Dr. Aurore Vidy-Roche

Soutenue publiquement le mercredi 9 octobre 2019 – 14h00

Institut Pasteur, Paris

Devant le jury composé de :

Pr. Sylvie VAN DER WERF (Université de Paris)……**Président du jury**

Pr. Philippe VAN DE PERRE (Université de Montpellier)……**Rapporteur**

Dr. Alain KOHL (Centre for Virus Research, Glasgow, Ecosse)……**Rapporteur**

Dr. Dorothée MISSE (IRD, Montpellier)……**Examinateur**

Dr. Sandra MARTIN-LATIL (ANSES, Maisons-Alfort)……**Examinateur**

Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI (Université de Paris)……**Directeur de thèse**

Dr. Aurore VIDY-ROCHE (Université de Paris)……**Membre invité**

REMERCIEMENTS

Je commencerais mes remerciements par les **membres du jury,** pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie le Professeur Sylvie Van der Werf pour avoir accepté de présider le jury, le Professeur Philippe Van de Perre et le Docteur Alain Kohl, rapporteurs, pour avoir consacré leur temps à lire et juger mon manuscrit de thèse, ainsi que le Docteur Dorothée Missé et le Docteur Sandra Martin-Latil, examinatrices, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

J'aimerais désormais remercier le **Professeur Antoine GESSAIN**, directeur de l'Unité Épidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes » pour m'avoir chaleureusement accueilli au sein de son Unité et pour tous ses conseils, notamment dans le processus de publication d'articles scientifiques et mon avenir, car « la thèse n'est pas une finalité mais bien qu'un début ». Merci également pour toutes vos histoires entraînantes à vos retours de voyages en Afrique !

Je souhaiterais exprimer mes plus sincères remerciements au **Professeur Pierre-Emmanuel Ceccaldi**, mon directeur de thèse. Je te remercie pour m'avoir intégré à ton équipe depuis le Master 2 et proposé de rester en thèse pour travailler sur un projet fascinant. Tes conseils et tes recommandations m'ont toujours été d'une précieuse aide. Je te remercie également pour m'avoir autorisé et vivement encouragé à participer à des congrès internationaux, ce fût une très bonne expérience qui m'a permis de découvrir un autre penchant du monde de la recherche. Enfin, je tiens à te remercier pour m'avoir laissé la liberté d'explorer le projet dans toutes les directions et m'épanouir dans ce projet.

J'aimerais maintenant remercier le **Docteur Aurore Vidy-Roche**. Ces trois années et demie passées à tes côtés, ou plutôt derrière ton dos, m'ont été très agréables et très enrichissantes. Même si « rien n'était gagné » avec mon sujet initial, celui-ci m'a permis de développer un sens critique, essentiel dans la carrière d'un chercheur. Merci également pour ta bonne humeur au quotidien. Pour finir, je tiens également à te remercier pour m'avoir transféré bon nombre de tes compétences en expérimentation animale, tant sur le plan éthique que sur le plan technique.

Un grand merci également à **Aurélie CHICHE**, étudiante en post-doctorat dans le Groupe à 5 ans « Plasticité cellulaire et modélisation des maladies », que j'ai rencontré par hasard au sein du forum des étudiants Amgen. Aurélie, merci pour le partage sans limites de tes connaissances sur les glandes mammaires murines ainsi que tout le savoir-faire que tu m'as transmis. C'était un plaisir de travailler avec toi, y compris pendant ces interminables jeudis matins dans la chaleur de l'animalerie… tu as grandement contribué à l'avancée du projet. Je te souhaite une excellente poursuite de carrière, et suis certain que tu décrocheras ton poste de chercheur. Merci également à tes généreux et souriants collègues, Coralie, Mathieu, et Elsa, avec qui c'était toujours un plaisir d'échanger.

Anthony, pas encore Docteur, mais bientôt ! Merci pour ces soirées sans fin au labo… dommage que tu ne sois en France que la moitié du temps. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta rédaction et ta soutenance dans cette fameuse salle rouge…

Merci également aux autres doctorants avec qui j'ai partagé de très bons moments, **Jill-Léa**, **Jim** (également connu sous le nom de Jim-Léa), et **Lasse**. J'espère que vos projets respectifs aboutiront et que vous défendrez votre thèse avec brio !

Je remercie aussi **tout le reste de l'équipe EPVO actuelle**, Philippe, Florence, Olivier, Thomas, Patricia, Mathilde, Margot, pour la bonne humeur que vous avez su me communiquer tout au long de ma thèse. Bien sûr, je n'oublie pas les anciens : Céline, Vincent, Délia, Océane, Damien, Caroline, Léa, Florent, et j'en passe… ! Un grand merci également à **tous les membres du 4ème étage** avec qui j'ai cohabité pendant 3 ans et demie, merci pour votre bonne humeur et vos aides ! Je garderai en tête le souvenir d'un étage solidaire où il fait bon vivre.

J'aimerais également remercier **Fanny Delaigue** et **Sophie Desgraupes**, stagiaires que j'ai encadré durant mon doctorat. Grâce à vous, j'ai pu faire mes premiers pas dans l'encadrement d'étudiants. Ca fût un réel plaisir de transmettre mes connaissances et/ou mon savoir-faire, et espère avoir été à la hauteur de vos espérances. Sophie, c'est avec beaucoup de confiance et de certitudes que je te laisse la continuité de ce projet. Je te souhaite beaucoup de réussite !

Je tiens également à remercier **Vincent Guillemot**, statisticien du Centre de Bioinformatique, de Biostatistiques, et de Biologie Intégrative, qui a consacré son précieux temps à m'expliquer l'utilisation des différents tests statistiques.

Merci également à **mes anciens maîtres de stages** qui m'ont, l'un après l'autre, amené à mon niveau actuel : Mme Marie-Christine BERTEMES pendant mon BTS, le Docteur Bertrand BELLIER pendant mon Bachelor, et le Docteur Arnaud MORIS pendant mon Master 1.
Je n'oublie pas non plus **Deshmukh Gopaul**, avec qui j'ai travaillé pendant et après le concours iGEM, rédigé mes premières demandes de financements, et avec qui j'ai gardé d'excellents contacts. Merci pour ton soutien et toutes tes recommandations dignes de conseils d'amis…

Je tiens également à remercier **mes amis**, Alicia, Johan, Jonathan, Gauthier, Anaïs, Steph, et plein d'autres que je ne peux pas citer, pour ces longues heures, soirées, journées de détente, de rires, et de bonne humeur sans lesquels il aurait été difficile de « se déconnecter »...
Merci également à **mon équipe de foot, l'ASSBC**, pour tous ces moments de plaisir !

Enfin, mes mots ne seront jamais suffisants pour exprimer ma reconnaissance envers ma famille, sans qui je ne serais jamais assis actuellement à rédiger les dernières lignes d'une thèse de virologie...

A Noémie, ma grande sœur, qui constitue depuis toujours un exemple pour moi et qui a toujours été présente dans quelque moment que ce soit,

A Maman, pour toutes les valeurs que tu m'as transmises et ton extrême force mentale devant laquelle je ne peux qu'être admiratif,

A Papa, qui m'a toujours poussé à aller plus loin et qui m'a toujours apprit à ne jamais me reposer sur mes acquis.

Cette thèse, je vous la dédie.

A l'heure où j'écris ces dernières lignes, j'exprime une très grosse pensée pour **Mémé** et pour **Bastien**, partis trop tôt.

« Celui qui renonce à devenir meilleur cesse déjà d'être bon »

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **3**

TABLE DES MATIERES **7**

LISTE DES ABREVIATIONS **9**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **11**

RESUME **15**

I. LE VIRUS ZIKA 20
A. Généralités *20*
1. Taxonomie et évolution 20
2. Structure et génome 23
3. Cycle viral 26
B. Épidémiologie *32*
1. Une découverte inattendue (1947) 32
2. Émergence dans les îles du Pacifique (2007-2014) 34
3. Une épidémie sans précédent aux Amériques (2015-2016) 35
C. Écologie virale *37*
1. Circulations selvatique et rurale/urbaine 37
2. Modes de transmission à l'Homme 40
D. Physiopathologie *49*
1. Tropisme et dissémination chez l'hôte 49
2. Évolutions de l'infection 53
E. Modèles d'étude de l'infection ZIKV *57*
1. Modèles cellulaires 58
2. Modèles animaux 60
II. LA GLANDE MAMMAIRE ET SON FLUIDE ASSOCIE : LE LAIT MATERNEL 63
A. Architecture de la glande mammaire : de l'organe à la cellule *63*
1. Organisation générale 63
2. La structure épithéliale 67
3. Le stroma mammaire, allié indispensable de la structure épithéliale 70
4. Vascularisation, drainage lymphatique, innervation 73
B. Dynamique de la glande mammaire adulte *74*
1. Gestation 75
2. Lactation 77
3. Involution 78
C. Le lait maternel *79*
1. Production et éjection du lait maternel 79
2. L'allaitement, un continuum post-natal du lien entre la mère et l'enfant 89
3. Le lait maternel, un fluide biologique vecteur d'agents pathogènes 96
III. LA BARRIERE INTESTINALE : UNE BARRIERE PHYSIOLOGIQUE COMPLEXE 105
A. Généralités *105*
1. Anatomie et fonctionnement de l'appareil digestif 105
2. Structure et composition de la barrière intestinale 110
B. L'épithélium intestinal, acteur principal et multifonctionnel de la barrière intestinale *114*
1. Structure et composition 115
2. Renouvellement et différenciation de l'épithélium intestinal 121
3. Les jonctions serrées, garantes de l'étanchéité physique de l'épithélium intestinal 125
C. Autres acteurs de la barrière intestinale *127*
1. Le microbiote intestinal 127
2. Le mucus et les peptides antimicrobiens 130
3. Le tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT) 132
D. Détournement et franchissement de la barrière intestinale par les agents pathogènes *138*
1. Une porte d'entrée pour les bactéries, les levures, et les prions 138
2. Une porte d'entrée pour les virus 139

CONTEXTE ET OBJECTIFS GENERAUX **146**

MATERIEL ET METHODES.....**145**

RESULTATS.....**161**

AXE I : ORIGINE DES PARTICULES INFECTIEUSES ZIKV DANS LE LAIT MATERNEL 158

- *ZIKV dissémine dans les glandes mammaires de souris infectées*.....*159*
- *La cinétique de dissémination de ZIKV dans les glandes mammaires murines dépend de la voie d'infection*.....*161*
- *Différents types cellulaires des glandes mammaires, y compris les cellules non immunitaires et non endothéliales, sont infectées in vivo par ZIKV*.....*163*
- *ZIKV infecte de façon productive des cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines*.....*166*
- *Des lignées cellulaires humaines luminales et myoépithéliales de l'épithélium mammaire sont permissives à l'infection ZIKV*.....*169*
- *L'infection ZIKV des glandes mammaires murines n'entraîne pas d'altération de l'architecture mammaire macroscopique*.....*171*

AXE II : TRANSMISSIBILITE DES PARTICULES INFECTIEUSES ZIKV AU NOURRISSON PAR VOIE ORALE.....172

- *ZIKV est capable d'infecter des souriceaux par voie orale*.....*173*
- *L'infection orale des souriceaux par ZIKV est associée à une mortalité significative*.....*175*
- *ZIKV peut être transmis de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel*.....*176*
- *ZIKV infecte des cellules entérocytaires humaines*.....*179*
- *ZIKV infecte et franchit un modèle in vitro d'épithélium intestinal sans altérer sa fonction de barrière*.....*181*

DISCUSSION.....*187*

BIBLIOGRAPHIE.....*198*

LISTE DES ABREVIATIONS

Aa : artère axillaire
ADE : *antibody-dependant enhancement*
AG : acide gras
ARN : acide ribonucléique
ASB : albumine de sérum bovin
ATCC : *American Type Culture Collection*
Ati : artère thoracique interne
Atl : artère thoracique latérale
ATOH1 : *protein atonal homolog 1*
Ats : artère thoracique supérieure
BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*
BHE : barrière hémato-encéphalique
BHR : barrière hémato-rétinienne
BHT : barrière hémato-testiculaire
CaM : calmoduline
CDC : *Center for Disease Control and Prevention*
CHIKV : virus Chikungunya
CMC : carboxyméthyl-cellulose
CMV : Cytomégalovirus
CNTF : *ciliary neurotrophic factor*
CPA : cellule présentatrice de l'antigène
CS : *conserved sequence*
DAG : diacylglycérol
DC-SIGN : *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non integrin*
DENV : virus de la dengue
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DSC : desmocolline
DSG : desmogléine
EGF : *epidermal growth factor*
G-CSF : *granulocyte colony-stimulating factor*
GALT : *gut-associated lymphoid tissue*
GDNF : *glial cell line-derived neurotrophic factor*
GH : *growth hormone*
GLUT : *glucose transporter*
GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HES1 : *hairy and enhancer* of split 1
HMEpiC : cellules épithéliales primaires de glande mammaire humaine
HRP : *horseradish peroxydase*
HTLV : virus de la leucémie T humaine
ICTV : *International Committee on Taxonomy of Viruses*
IFN : interferon
IFNAR : *Interferon alpha and beta receptor*
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
iPSC : *induced pluripotent stem cells*
IRF : *Interferon Regulatory Factors*
JAM : *junctional adhesion molecule*
JEV : virus de l'encéphalite japonaise
Klf4 : *Kruppel-like factor 4*
MALT : *mucosa-associated lymphoid tissue*
MEB : *midgut escape barrier*
MFGM : *milk fat globule membrane*
MIB : *midgut infection barrier*
MLCK : *myosin-light chain kinase*
MMP : *matrix metalloprotease*
MUC : mucine
NAMA : neuropathie axonale motrice aiguë
Ngn3 : *neurogenin-3*
NIAD : neuropathie inflammatoire aiguë démyélinisante
OC : ocytocine
OCR : récepteur à l'ocytocine
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAM : peptide antimicrobien
PFA : paraformaldéhyde
PGR : *progesterone receptor*
pIgR : récepteur aux immunoglobulines polymériques
PNH : primate non humain
PR : progésterone
PRL : prolactine

PV : Poliovirus
RANKL : *receptor activator of NF-κB ligand*
RE : réticulum endoplasmique
RRV : virus de la rivière Ross
RV : Rotavirus
SCZ : syndrome congénital lié à Zika
SD : *standard deviation*
SEB : *salivary glands escape barrier*
SGB : syndrome de Guillain-Barré
SIB : *salivary glands infection barrier*
SMA : *smooth muscular actin*
SNC : système nerveux central
SREBP : *sterol regulatory element binding protein*
STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*
SVF : serum de veau foetal
TA : température ambiante
TAG : triglycérides
TBEV : virus de l'encéphalite à tiques
TEB : *terminal end bud*
TEER : résistance électrique trans-épithéliale
TIM : *T-cell/transmembrane, immunoglobulin, mucin*
TORCH : *Toxoplasmosis, Others, Rubella, Cytomegalovirus and Herpes*
UAR : *upstream AUG region*
USUV : virus Usutu
VEEV : virus de l'encéphalite équine vénézuélienne
VEGF : vascular endothelial growth factor
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
WAP : *whey acidic protein*
WNV : virus du Nil occidental
XOR : xanthine oxydoreductase
YFV : virus de la fièvre jaune
ZIKV : virus Zika
ZO : *zonula occludens*

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Relations phylogénétiques des Flaviviridae

Figure 2. Relations phylogénétiques des différents lignages et clusters de ZIKV

Figure 3. Organisation structurale de ZIKV

Figure 4. Organisation génomique de ZIKV

Figure 5. Cycle viral de ZIKV

Figure 6. Types de particules virales ZIKV

Tableau 1. Fonctions des protéines non structurales flavivirales

Figure 7. Distribution géographique de ZIKV au cours de l'Histoire

Tableau 2. Caractéristiques générales des trois principales épidémies ZIKV

Figure 8. Circulation naturelle de ZIKV

Figure 9. Circulation de ZIKV chez l'hôte invertébré au cours de la transmission vectorielle

Figure 10. Caractéristiques générales des deux principaux vecteurs de ZIKV

Figure 11. Transmission de ZIKV au cours de l'allaitement maternel

Figure 12. Dissémination de ZIKV chez l'hôte

Tableau 3. Franchissement de barrières anatomiques par ZIKV

Figure 13. Organisation générale de la glande mammaire humaine

Figure 14. Représentations schématiques des glandes mammaires humaine et murine

Figure 15. Localisation anatomique des glandes mammaires murines

Figure 16. L'épithélium mammaire

Figure 17. Vascularisation de la glande mammaire

Figure 18. Innervation de la glande mammaire

Figure 19. Évolution de l'architecture de la glande mammaire au cours de la vie

Figure 20. Biosynthèse des constituants protidiques, lipidiques, et lipidiques du lait maternel

Figure 21. Voies de sécrétion des constituants du lait maternel

Figure 22. Mécanisme de contraction des cellules myoépithéliales en réponse à l'ocytocine

Figure 23. L'appareil digestif, ou tractus gastro-intestinal

Figure 24. Niveaux d'amplification de la surface intestinale

Figure 25. Organisation et composition de la paroi du tube digestif

Figure 26. La barrière intestinale

Figure 27. Architecture de l'épithélium intestinal

Tableau 4. Caractéristiques générales des différents types cellulaires de l'épithélium intestinal

Figure 28. Coupe schématique d'une crypte intestinale

Figure 29. Ontogénie des cellules épithéliales intestinales

Figure 30. Les jonctions intercellulaires

Figure 31. L'anneau de Waldeyer : une répartition circulaire des tonsilles

Figure 32. Structure des tonsilles

Figure 33. Franchissement de la barrière intestinale par les virus

Figure 34. Modèle *in vitro* d'épithélium intestinal

Tableau 5. Tableau récapitulatif des souches virales ZIKV utilisées

Tableau 6. Tableau récapitulatif des méthodes d'extraction d'ARN utilisées

Figure 35. Évolution de la masse des souris non infectées et infectées par ZIKV

Figure 36. Charges virales dans les organes de souris non infectées et infectées par ZIKV

Figure 37. Comparaison de la cinétique de dissémination de ZIKV dans les glandes mammaires murines en fonction de la voie d'administration

Figure 38. Graphe représentatif de la charge virale dans la circulation sanguine et dans les organes de souris infectées localement

Figure 39. Contrôle de l'efficacité de séparation des types cellulaires mammaires

Figure 40. Quantification de la charge virale dans les différentes fractions cellulaires mammaires

Figure 41. Infection des cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines par ZIKV

Figure 42. Quantification du nombre de cellules hMEpiC infectées par ZIKV

Figure 43. Réplication et production virales de ZIKV par les cellules hMEpiC

Figure 44. Sensibilité des cellules épithéliales mammaires luminales et myoépithéliales à l'infection ZIKV

Figure 45. Production virale par les cellules épithéliales mammaires luminales et myoépithéliales infectées

Figure 46. Effet de l'infection ZIKV sur l'architecture des glandes mammaires murines

Figure 47. Expériences d'infection orale de souriceaux par ZIKV

Figure 48. Sensibilité des souriceaux à l'infection orale par ZIKV

Figure 49. Différences de sensibilité des souriceaux par voie orale selon la portée

Figure 50. Symptomatologie et mortalité des souriceaux infectés par ZIKV par voie orale

Figure 51. Neuroinvasion virale

Figure 52. Transmission du virus Zika de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel

Figure 53. Évolution de la masse des souriceaux allaités par une mère infectée par ZIKV

Figure 54. Infection des souriceaux par ZIKV au cours de l'allaitement maternel

Figure 55. Infection des lignées cellulaires « enterocyte-like » par ZIKV

Figure 56. Quantification du nombre de cellules Caco-2/TC7 infectées par ZIKV

Figure 57. Production virale par les cellules « enterocyte-like » infectées par ZIKV

Figure 58. Caractérisation structurale et fonctionnelle du modèle *in vitro* d'épithélium intestinal

Figure 59. Effet de l'infection ZIKV sur la perméabilité du modèle *in vitro* d'épithélium intestinal

Figure 60. Effet de l'infection ZIKV sur le maintien des jonctions serrées

Figure 61. Franchissement d'un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal par ZIKV

RESUME

Le virus Zika (ZIKV) appartient à la famille des *Flaviviridae* et fait partie de l'ensemble des virus transmis par les arthropodes, ou arbovirus (« arthropod-borne virus », en anglais). Découvert en Ouganda en 1947, ZIKV a émergé dans les îles du Pacifique à la fin des années 2000, essentiellement à Yap (2007) et en Polynésie française (2013-14), causant deux premières épidémies majeures. De façon surprenante, lors de la dernière épidémie en Amérique latine (2015-16), un nombre important de transmissions interhumaines a été rapporté et le génome viral ainsi que des particules infectieuses ont été détectés dans de nombreux fluides biologiques de personnes infectées. Dans le lait maternel, d'importantes charges virales ont été détectées jusqu'à plus de 30 jours après l'apparition des symptômes. Cependant, l'origine exacte des particules virales infectieuses dans le lait maternel ainsi que leur transmissibilité au nouveau-né par voie orale au cours de l'allaitement maternel restent, à ce jour, inconnues. Dans ce travail, nous avons démontré que ZIKV était capable de se propager dans les glandes mammaires de souris infectées par voies systémique et locale sans causer d'altération notable de l'architecture générale. *In vitro*, nous avons montré que des cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines étaient sensibles et permissives à l'infection ZIKV, et que les cellules luminales et myoépithéliales pourraient contribuer à l'excrétion virale de ZIKV dans le lait maternel. Concernant la transmissibilité des particules virales infectieuses au nouveau-né, nous avons démontré que des souriceaux pouvaient être infectés au cours de l'allaitement maternel, et avons caractérisé l'infection orale de souriceaux par ZIKV en termes de mortalité et de neuroinvasion virale. Enfin, alors que les portes d'entrée virale chez le nourrisson au cours d'une infection orale sont inconnues, nous avons montré que différents clones de lignées entérocytaires humaines étaient sensibles et permissives à l'infection ZIKV, et que ZIKV était capable d'infecter et de franchir un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal sans altérer sa fonction de barrière, suggérant que le tractus gastro-intestinal pourrait constituer une porte d'entrée virale lors de la transmission de ZIKV de la mère à enfant au cours de l'allaitement. Cette étude, combinant des expériences *in vitro* et *in vivo* est la première à décrypter dans un ordre chronologique les mécanismes des différentes étapes composant la transmission virale de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel.

MOTS-CLES

Virus Zika, allaitement maternel, transmission virale, dissémination virale, glandes mammaires, modèle murin, cellules primaires, cellules luminales, cellules myoépithéliales, barrière intestinale, infection orale, franchissement, cellules épithéliales.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) belongs to the family *Flaviviridae* and is part of the large panel of the arthropod-borne viruses, or arboviruses. Discovered in Uganda in 1947, ZIKV emerged in the Pacific Islands in the late 2000s, mainly in Yap (2007) and French Polynesia (2013-14), causing two major outbreaks. Surprisingly, during the last outbreak in Latin America (2015-16), a large number of human-to-human transmissions were reported and the viral genome as well as infectious particles were detected in many biological fluids of infected persons. In breast milk, significant viral loads were detected until more than 30 days after the onset of symptoms. However, the exact origin of infectious viral particles in breast milk and their transmissibility to the newborn by oral route during breastfeeding remain unknown.

In this work, we demonstrated that ZIKV was able to spread to the mammary glands of systemically- and locally-infected mice without causing any noticeable alteration of the general architecture. *In vitro*, we showed that primary epithelial cells of human mammary glands are sensitive and permissive to ZIKV infection, and that luminal and myoepithelial cells may contribute to the viral shedding of ZIKV in breast milk. Regarding the transmissibility of infectious viral particles to the newborn, we have shown that mice can be infected during breastfeeding, and have characterized the oral infection of mice by ZIKV in terms of mortality and viral neuroinvasion. Finally, while viral entry portal sites in infants during oral infection are unknown, we have shown that different clones of human enterocyte lines were sensitive and permissive to ZIKV infection, and that ZIKV was able to infect and cross an *in vitro* model of intestinal epithelium without altering its barrier function, suggesting that the gastrointestinal tract could be a portal site for the transmission of ZIKV from mother to child during breastfeeding.

By combining *in vitro* and *in vivo* experiments, this study is the first to chronologically decipher the mechanisms of the different stages of ZIKV mother-to-child transmission during breastfeeding.

KEY WORDS

Zika virus, breastfeeding, viral transmission, viral dissemination, mammary glands, mouse model, primary cells, luminal cells, myoeithelial cells, intestinal barrier, oral infection, intestinal crossing, epithelial cells.

INTRODUCTION

I. LE VIRUS ZIKA

A. Généralités

Le virus Zika (ZIKV) appartient à la famille *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. Il s'agit donc d'un virus enveloppé à ARN monocaténaire de polarité positive. Resté silencieux pendant les 60 premières années après sa découverte, ZIKV émergea récemment en Océanie (2007) et en Amériques (2015). De façon intéressante, bien que principalement transmis par les moustiques du genre *Aedes*, plusieurs modes de transmission interhumaines ont été recensés lors de la dernière épidémie en Amérique Latine (2015-16).

1. Taxonomie et évolution

- Classification

Le virus Zika (ZIKV) appartient à la famille *Flaviviridae*[1]. Cette famille regroupe environ 90 virus, classés en quatre genres par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses en anglais) : le genre *Flavivirus*, le genre *Hepacivirus*, le genre *Pestivirus*, et le genre *Pegivirus* (Figure 1). Réunissant plus d'une cinquantaine d'espèces virales[2], le genre *Flavivirus* est le plus représenté. L'espèce prototype de ce genre est le virus de la fièvre jaune, qui a inspiré la dénomination du genre *Flavivirus* et de la famille *Flaviviridae* suite à l'observation de jaunisses (causées par des troubles hépatiques) développés chez les sujets infectés, « *flavus* » signifiant jaune en latin. Phylogénétiquement proche du virus Spondweni (environ 70% d'identité génétique[3]), classé dans le genre *Flavivirus*, ZIKV a été classé dans ce même genre (Figure 1, flèche).

Contrairement aux autres genres, les *Flavivirus* ont un tropisme d'hôte très diversifié : la plupart peuvent infecter tant un hôte vertébré (mammifère, oiseau…) qu'invertébré (majoritairement des arthropodes tels que les moustiques, les tiques…). Principalement transmis par les moustiques, ZIKV fait donc partie de cet ensemble de virus transmis par les arthropodes, appelés arbovirus (*arthropod-borne virus*, en anglais).

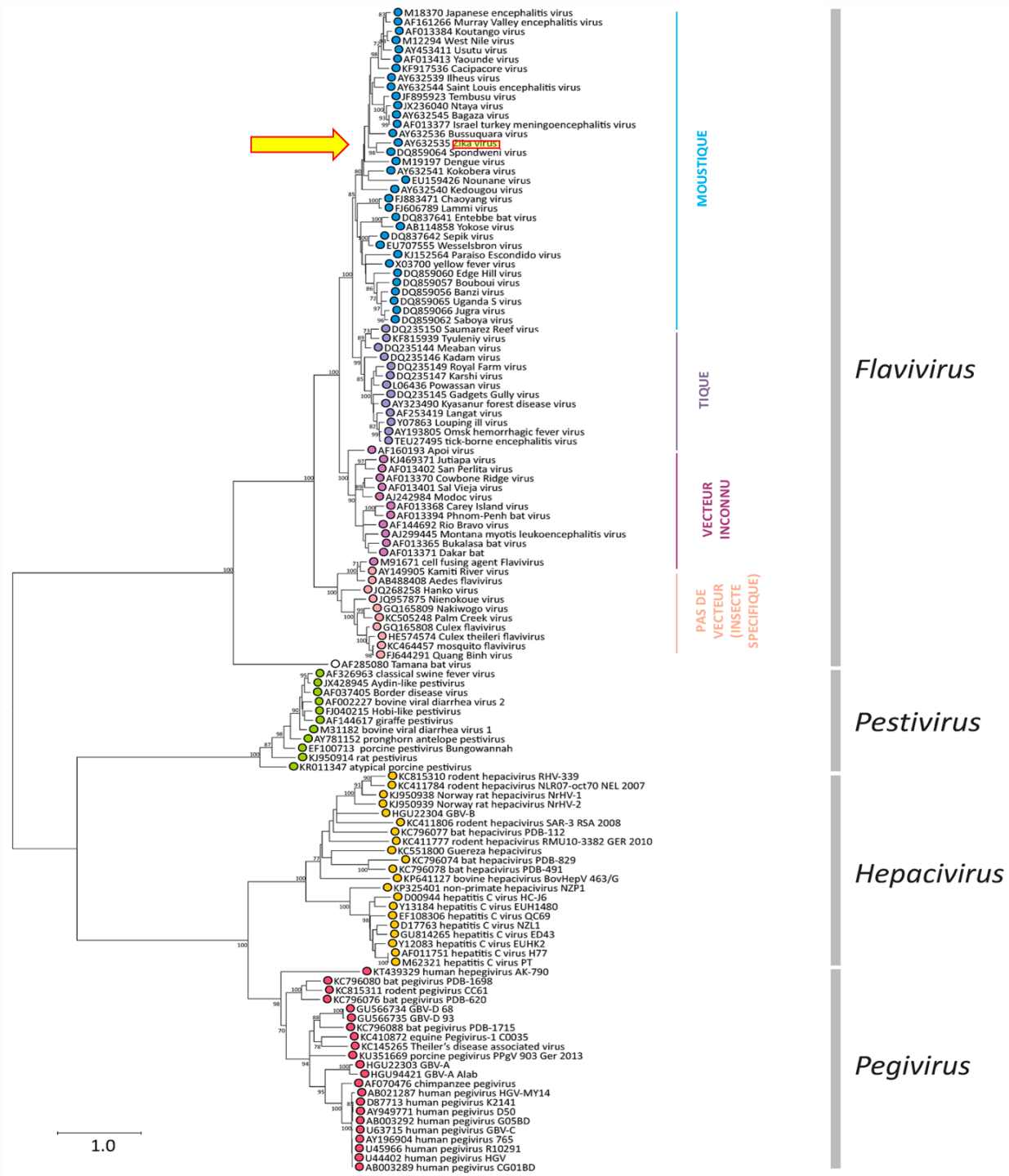


Figure 1. Relations phylogénétiques des *Flaviviridae*

Des séquences partielles d'environ 800 nucléotides (chevauchant le gène NS5) provenant d'isolats représentatifs de chaque espèce flavivirale ont été alignées. Les relations phylogénétiques entre chaque espèce ont été estimées par la méthode du maximum de vraisemblance (« maximum likelihood ») et représentées sous forme d'arbre phylogénétique. Le vecteur des arbovirus appartenant au genre *Flavivirus* est mentionné en couleur. La flèche indique la place de ZIKV parmi les *Flaviviridae*. Barre d'échelle : 1 mutation/site. Adapté du site de l'ICTV.

- Évolution

Au cours de l'évolution de ZIKV, deux lignages principaux se sont distingués : le lignage africain et le lignage asiatique (Figure 2). De par la faible divergence génétique entre ces deux lignages (<11,7% de divergence nucléotidique) et le fait que le lignage asiatique se fonde dans la diversité du lignage africain, il est communément admis que le lignage africain s'est répandu d'Afrique en Asie, entraînant des divergences nucléotidiques et donnant naissance au lignage asiatique[4]. De plus, le fait que le virus le plus proche de ZIKV – le virus Spondweni – n'ait été détecté qu'en Afrique et qu'il existe un « cluster » africain phylogénétiquement plus éloigné que l'ensemble des souches connues, africaines et asiatiques réunies, renforce l'hypothèse de l'origine africaine de ZIKV et sa migration subséquente vers l'Asie.

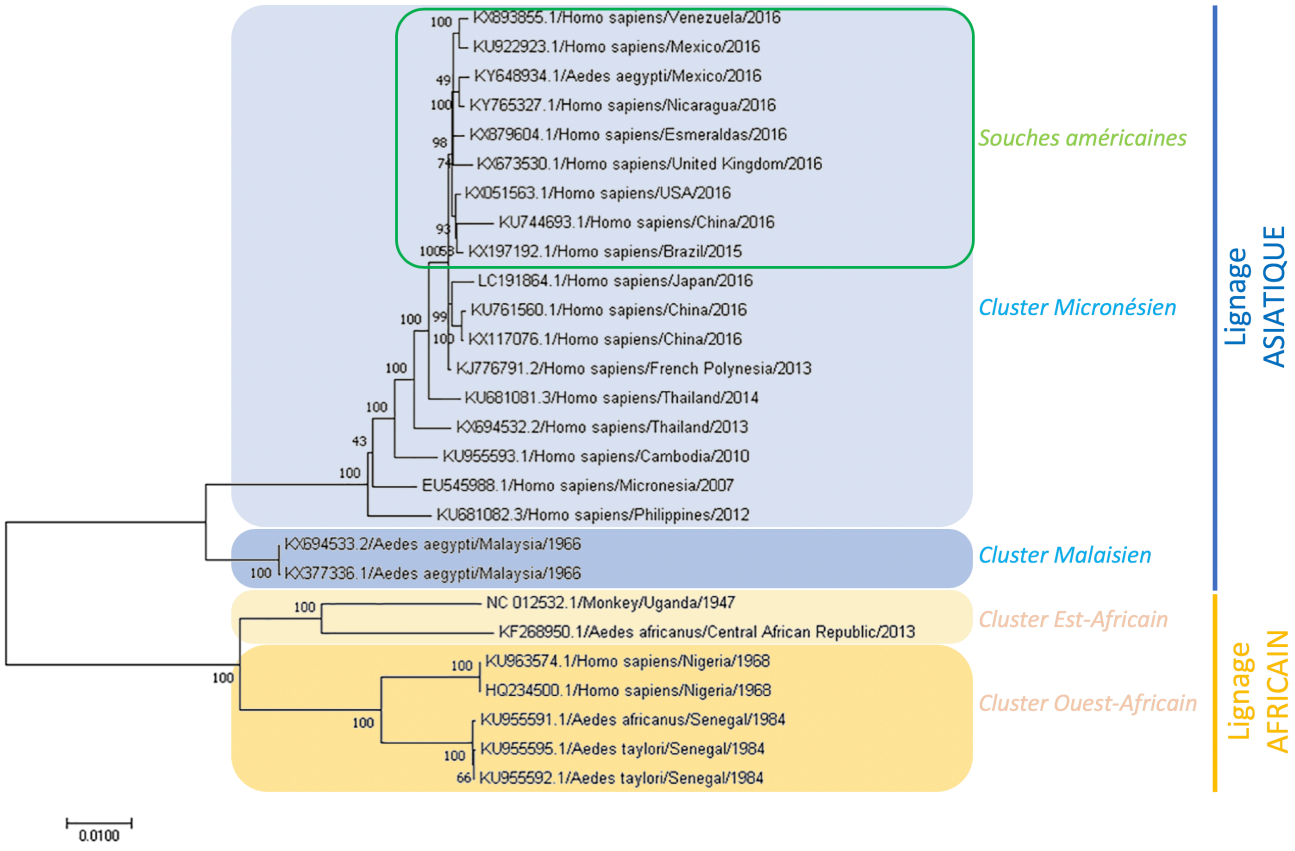


Figure 2. Relations phylogénétiques des différents lignages et clusters de ZIKV
Des séquences nucléotidiques (génome complet) provenant de différents isolats de ZIKV ont été alignées. Les relations phylogénétiques ont été estimées par la méthode du maximum de vraisemblance (« maximum likelihood ») et représentées sous forme d'arbre phylogénétique. Pour chaque souche, le n° d'accession GenBank, l'hôte, le lieu et la date d'isolement sont indiqués. Le lignage et le « cluster » d'appartenance sont indiqués en couleur. Barre d'échelle : 0,01 mutation/site. Adapté de Tham HW. et collègues, 2018.

Plus précisément, les lignages africain et asiatique se subdivisent chacun en deux « clusters »[5] : les clusters Est-Africain (ou cluster Ougandais) et Ouest-Africain (ou cluster Nigérian) constituent le lignage africain, tandis que les clusters Malaisien et Micronésien forment le lignage asiatique (Figure 2). Concernant les souches isolées aux Amériques, plusieurs études phylogénétiques et hypothèses d'horloge moléculaire (hypothèses selon laquelle des mutations génétiques s'accumulent dans un génome à une vitesse constante, et permettant ainsi de retracer dans un ordre chronologique l'évolution et la diversification d'une espèce) ont suggéré l'introduction unique au Brésil (2013) d'une souche asiatique appartenant au cluster Micronésien, provoquant l'implantation et l'expansion de ZIKV sur le continent américain[6].

2. Structure et génome

- Structure de la particule virale

Comme pour tous les flavivirus, la particule virale ZIKV est sphérique et mesure environ 50nm de diamètre. Elle est constituée d'une capside de symétrie icosaédrique d'environ 30nm (T=3) et est enveloppée d'une bicouche lipidique apparaissant légèrement plus dense aux électrons en microscopie électronique[7] (Figure 3A).

En surface, la particule virale est recouverte de 180 protéines d'enveloppe (E) associées en tête-à-queue sous forme de 90 homodimères (Figure 3B). Ancrés dans l'enveloppe virale de façon parallèle, les homodimères de protéines E confèrent une surface parfaitement homogène et lisse à la particule[8]. De façon stœchiométrique, chaque protéine E est associée à une protéine de membrane M. En deçà de l'enveloppe virale, 180 capsomères (protéines C) assemblés de façon icosaédrique composent la capside virale, renfermant le génome viral (Figure 3C).

De façon intéressante, les particules virales se comportent différemment selon l'hôte vertébré ou invertébré chez lequel elles sont produites. Chez l'Homme, dont la température corporelle (37°C) est supérieure à celle du moustique (28°C), les particules virales sont légèrement dilatées, laissant apparaître des zones non recouvertes par les protéines E, appelées « patchs » de membrane[9] (Figure 3D). Ces particules dilatées, dont la surface est irrégulière, sont alors qualifiées de « bumpy ».

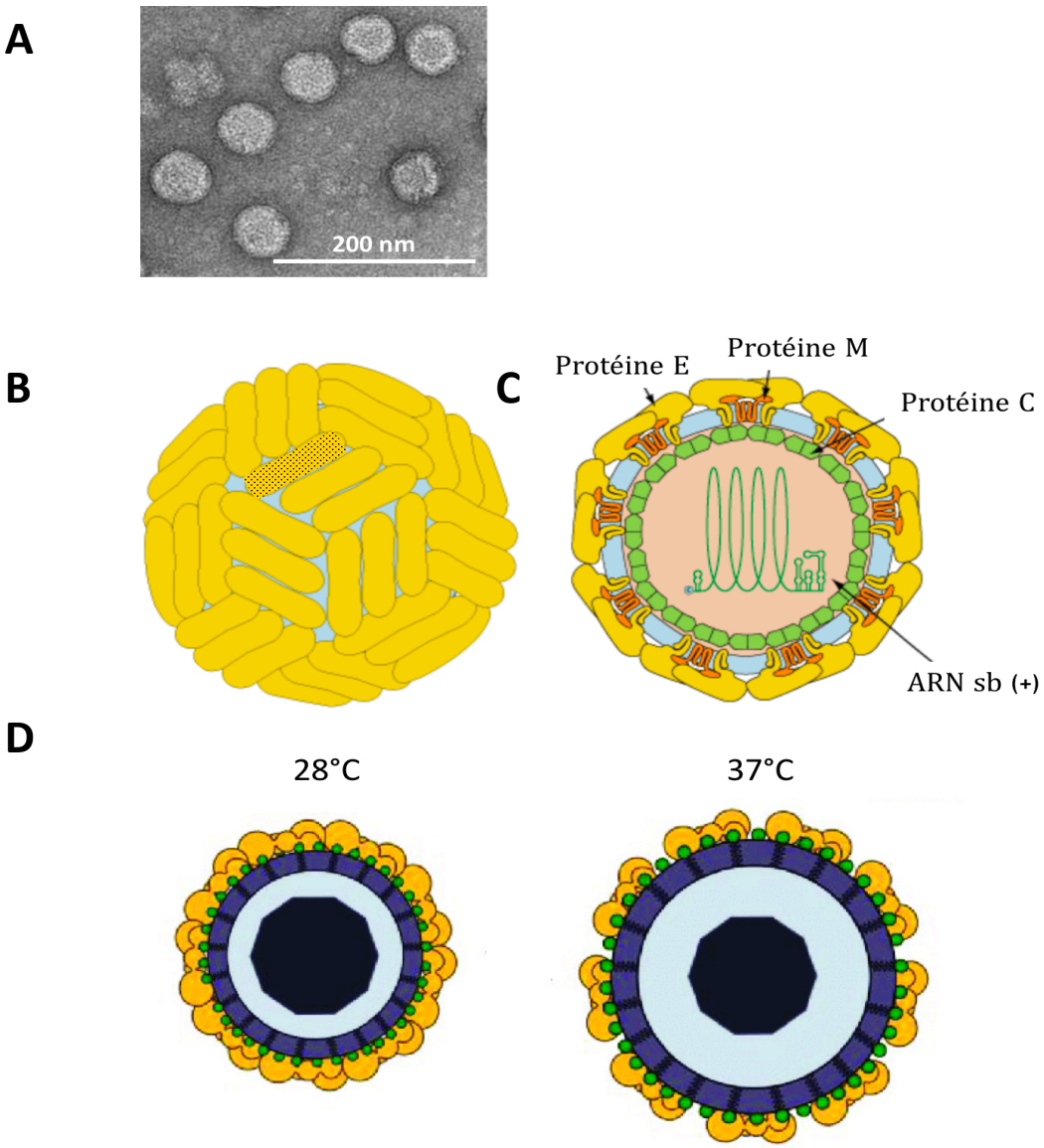


Figure 3. Organisation structurale de ZIKV

(A) Observation par microscopie électronique à transmission de particules virales ZIKV après coloration négative à l'acétate d'uranyle. Barre d'échelle : 200 nm. Adapté de Boigard H et collègues, 2017. **(B)** Représentation schématique de la particule mature de ZIKV vue de l'extérieur. Jaune pointillé : un homodimère de protéines d'enveloppe. (**C)** Coupe schématique de la particule ZIKV représentant la localisation et la répartition des protéines structurales d'enveloppe (E, jaune), de membrane (M, orange), et de capside (C, vert) autour du génome viral à ARN simple brin (sb) de polarité positive (+). Adapté de ViralZone. **(D)** Représentations schématiques des particules virales produites chez le moustique (28°C) ou chez l'Homme (37°C). A 37°C, les particules virales se dilatent, rendant la surface irrégulière (ou « bumpy ») et les molécules de phosphatidylsérine (vert) accessibles. Adapté de Perera-Lecoin et collègues, 2014.

- Organisation génomique

Appartenant à la classe IV de Baltimore, ZIKV possède un génome à ARN monocaténaire de polarité positive, coiffé et non polyadénylé. Il comporte environ 10 800 nucléotides[10] et est constitué d'un cadre unique de lecture encadré par deux régions non codantes aux extrémités 5' et 3' (Figure 4).

Les régions non codantes 5' et 3' jouent un rôle fondamental dans les phases de traduction et de réplication virales. En effet, alors que la coiffe méthylguanosine de type I à l'extrémité 5' du génome permet l'initiation de la traduction virale, plusieurs structures secondaires présentes dans la région non codante 3' compensent l'absence de queue polyadénylée pour favoriser le processus de traduction[11]. Lors de la réplication virale, les régions non codantes contenant des séquences UAR (« upstream AUG region », en anglais) et CS (« conserved sequence », en anglais) jouent également un rôle dans la circularisation du génome viral[12], structure nécessaire à la bonne fixation de l'ARN-polymérase ARN-dépendante.

De façon commune aux *Flavivirus*, le cadre de lecture unique du génome ZIKV code pour une seule polyprotéine, ensuite clivée en protéines structurales et non structurales (Figure 4). Les protéines structurales, comme leur nom l'indique, sont retrouvées au sein de la particule virale et sont au nombre de trois : la protéine de capside C, le précurseur prM de la protéine de membrane M, et la protéine d'enveloppe E. Les protéines non structurales, non retrouvées dans la particule virale mais importantes dans la phase d'éclipse, sont au nombre de sept : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, et NS5. Étant directement traduit par la machinerie cellulaire pour synthétiser des particules virales, le génome de ZIKV est logiquement qualifié d'infectieux.

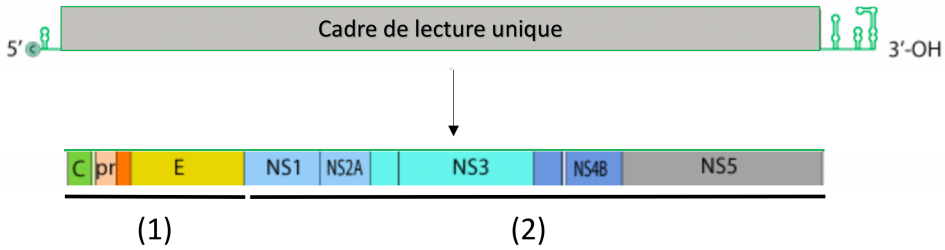


Figure 4. Organisation génomique de ZIKV

Schéma représentatif de l'organisation du génome viral de ZIKV. En haut : vue d'ensemble de la molécule d'ARN monocaténaire contenant une coiffe méthylguanosine à l'extrémité 5', les régions non codantes 5' et 3' (vert), et le cadre unique de lecture (gris). En bas : organisation détaillée des séquences codant pour les protéines structurales (1 : C, prM, E) et non structurales (2 : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Adapté de ViralZone.

3. Cycle viral

Le cycle viral est composé de plusieurs étapes, regroupées en 3 grandes phases : l'entrée virale, l'éclipse virale, et la sortie virale. La particule virale est visible lors de la phase d'entrée et réapparaît lors de la sortie virale. Lors de la phase d'éclipse, le virus se multiplie et ne se présente plus sous forme de particules virales. De plus, l'action coordonnée de diverses protéines non structurales ainsi que la digestion incomplète de l'ARN génomique permet le bon déroulement du cycle viral et l'échappement à la réponse immunitaire innée.

- Déroulement du cycle viral

ZIKV ayant été peu étudié, certaines étapes du cycle de ZIKV sont déduites du cycle d'autres *Flavivirus* (Figure 5).

Le cycle viral débute par l'entrée du virus au sein de sa cellule cible. Cette phase se compose de deux étapes successives : la fixation de la particule virale à la surface cellulaire, suivie de son internalisation. La phase de fixation est initiée par l'attachement de la particule virale à la surface cellulaire grâce à des interactions faibles entre les homodimères d'enveloppe E et des facteurs d'attachement non spécifiques, tels que des héparane-sulfates[13,14]. En retenant et concentrant les particules virales à la surface cellulaire, ces facteurs d'attachement facilitent ensuite la reconnaissance plus spécifique des particules virales par un ou plusieurs récepteurs. Plusieurs récepteurs putatifs, essentiels mais non indispensables, ont été décrits comme jouant un rôle dans l'entrée virale de ZIKV, comme les lectines de type C (DC-SIGN[15]) ou les récepteurs transmembranaires des phosphatidylsérines (TIM1[16] ou AXL[17,18]). Ces derniers reconnaissent directement ou indirectement les phosphatidylsérines présentes dans la membrane des corps apoptotiques, permettant leur phagocytose et leur élimination. Dérivée de la membrane du réticulum endoplasmique, l'enveloppe virale de ZIKV est particulièrement riche en phosphatidylsérines, et de ce fait, mime ces corps apoptotiques. Ainsi, les particules virales « bumpy », exclusivement produites chez les mammifères et dont les phosphatidylsérines sont accessibles via les patchs de membrane, pénètrent dans la cellule cible par mimétisme apoptotique.

Suite à la reconnaissance spécifique de ZIKV par un récepteur, l'internalisation est assurée par endocytose dépendante des clathrines[19,20]. Au cours de celle-ci, l'acidification du lumen de

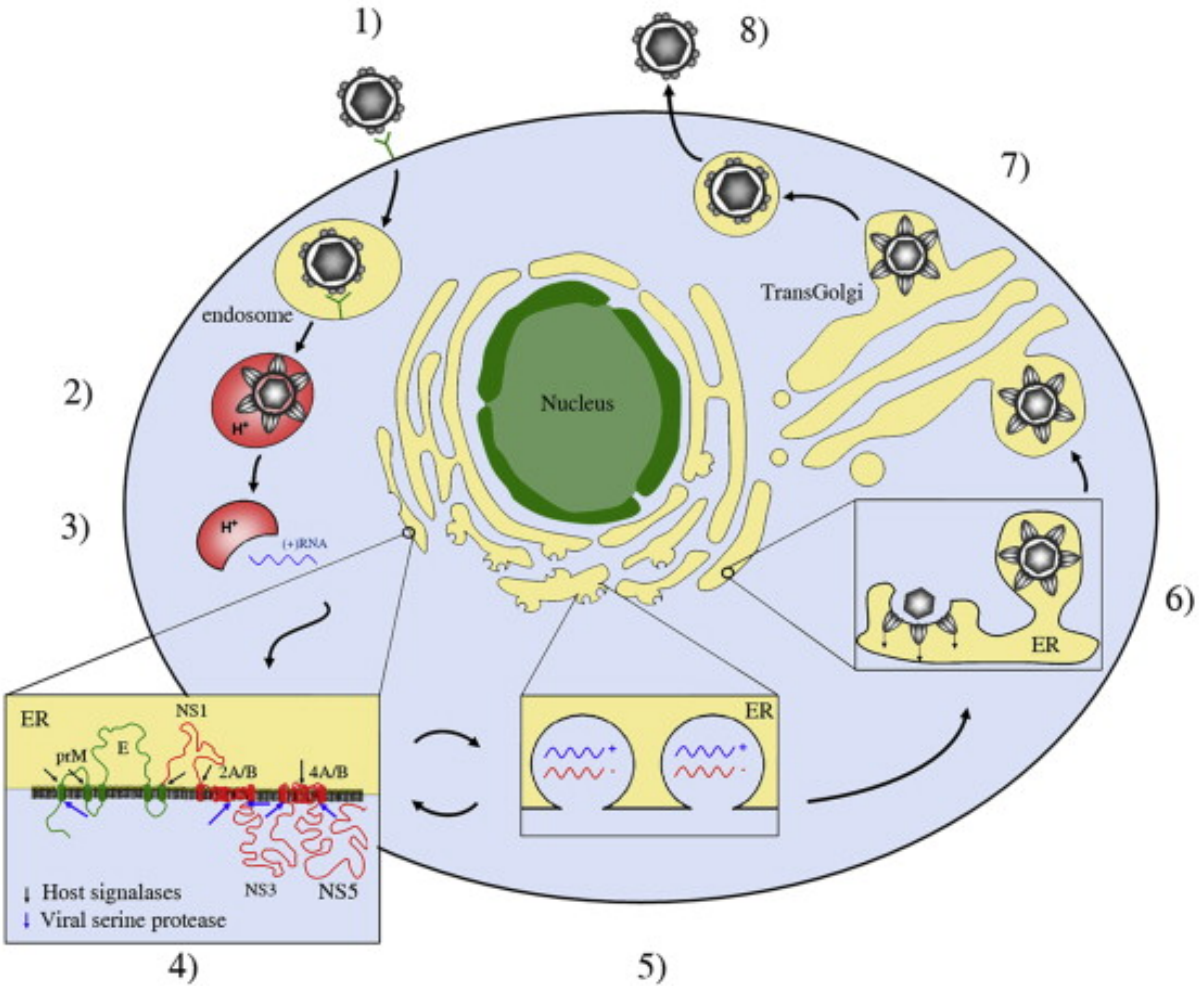


Figure 5. Cycle viral de ZIKV

La protéine d'enveloppe E de ZIKV se fixe à un récepteur cellulaire (A), induisant l'internalisation de la particule virale par endocytose dépendante des clathrines (B). L'acidification de l'endosome permet une modification conformationnelle des protéines E ainsi que l'exposition des peptides de fusion (C), résultant en la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale et la libération de la capside virale dans le cytoplasme (D). Après décapsidation, le génome viral à ARN sb (+) est directement traduit en une polyprotéine par la machinerie cellulaire (E). Cette polyprotéine, enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique, est clivée en protéines structurales et non structurales par des protéases cellulaires (flèches noires) et virales (flèches bleues). L'association synergique de facteurs cellulaires et de certaines protéines non structurales forme le complexe de réplication, qui synthétise les ARN viraux (ARN génomiques, antigénomiques, messagers) au sein des invaginations membranaires du réticulum endoplasmique. Les protéines virales y sont également traduites (F). La nucléocapside s'assemble et bourgeonne dans le lumen du réticulum endoplasmique (G). La particule virale migre du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (H), dans lequel les furines cellulaires clivent le précurseur prM en protéine M, aboutissant à la formation de particules matures (I). Les particules virales matures et infectieuses sont libérées dans le milieu extracellulaire par exocytose (J).
Adapté de Fernandez-Garcia et collègues, 2009.

l'endosome provoque des modifications conformationnelles des protéines E : les homodimères parallèles à l'enveloppe virale se dissocient en monomères, qui se projettent perpendiculairement à celle-ci, résultant en l'exposition des peptides de fusion. Suite à l'ancrage hydrophobe de ces peptides de fusion au sein de la membrane endosomale, les monomères E se trimèrisent. La trimérisation complète et stable des monomères E renforce le rapprochement et la fusion subséquente des membranes virale et endosomale, permettant la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme[21,22].

Par des mécanismes inconnus, la décapsidation permet la libération du génome viral dans le cytoplasme. Coiffé à son extrémité 5' et positivement polarisé, celui-ci est directement traduit par la machinerie cellulaire au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). La présence d'un cadre unique de lecture résulte en la synthèse d'une polyprotéine unique d'environ 3 400 acides aminés. Enchâssée dans la membrane du RE, la polyprotéine virale est co- et post-traductionnellement clivée en protéines structurales (C, prM, E) et non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Les différents clivages permettant la séparation des protéines virales sont à la fois effectués par des protéases cellulaires (peptidases signal présentes dans le lumen du réticulum endoplasmique) et virales (clivage en *cis* par la protéase NS3, du côté cytoplasmique). A ce stade du cycle viral, le précurseur prM et la protéine E restent liés de façon covalente, rendant impossible toute modification conformationnelle pH-dépendante de E.

Parmi les protéines néosynthétisées, plusieurs protéines non structurales telles que NS1, NS2A, NS4A, ou NS4B ont été décrites comme responsables du remodelage des membranes cellulaires[23], aboutissant à l'invagination des membranes du RE et la formation de vésicules[24]. Outre leur emplacement optimal à proximité des machineries de traduction cellulaire, ces vésicules constitueraient des espaces confinés et réduits permettant de camoufler les antigènes viraux des senseurs cytoplasmiques et de concentrer les éléments du complexe de réplication. Ce dernier est principalement composé du génome viral, de protéines non structurales, ainsi que de nombreux supposés facteurs cellulaires. L'hybridation des séquences UAR-5' et UAR-3' entre elles ainsi que des séquences de cyclisation CS-5' et CS-3' entre elles, présentes dans chaque région non-codante, permet la circularisation du génome viral et l'initiation de la réplication[12]. En effet, l'hybridation des régions non-codantes 5' et 3' permet de rapprocher le promoteur (présent dans la région 5') et le site d'initiation de la

transcription (présent dans la région 3'). Ainsi, en synergie avec la protéine-hélicase NS3, la protéine NS5, à activité ARN-polymérase ARN-dépendante, interagit avec le génome viral et synthétise un brin d'ARN de polarité négative[12]. Cet antigénome sert alors de matrice pour la transcription de nombreux ARN de polarité positive, produits en excès et servant à la fois d'ARN messagers et d'ARN génomiques. L'asymétrie de la transcription d'ARN (+) par rapport aux ARN (-) reste peu connue[25]. En plus de sa fonction polymérase, la protéine NS5 est responsable de la synthèse de la coiffe méthylguanosine, greffée à l'extrémité 5' des ARN (+)[26]. Grâce à la proximité des machineries de traduction cellulaire, les ARN messagers sont immédiatement traduits en protéines virales.

Enfin, lors de l'assemblage, des dimères de protéine C s'assemblent et interagissent avec l'ARN génomique viral. Les nucléocapsides néoformées bourgeonnent dans le lumen du RE, leur permettant l'acquisition d'une enveloppe dans laquelle sont enchâssés prM et E, toujours covalemment liés[27]. Au cours de leur exocytose, les particules virales enveloppées migrent vers l'appareil de Golgi, dans lequel le pH légèrement acide induit une modification conformationnelle des hétérodimères prM/E. Alors accessible, la précurseur prM est clivé en protéine de membrane M par la furine cellulaire, permettant la maturation et la libération des particules virales dans le milieu extracellulaire.

Le processus de clivage par la furine étant peu efficace, plusieurs types de particules virales aux structures diverses coexistent lors d'une infection : des particules matures, partiellement matures, et complètement immatures (Figure 6).

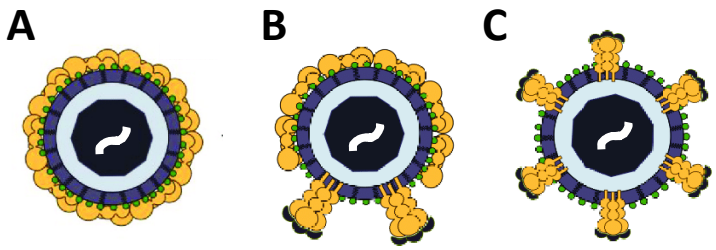


Figure 6. Types de particules virales ZIKV

Représentations schématiques de particules virales matures **(A)**, partiellement matures **(B)**, et immatures **(C)**. Protéines d'enveloppe E (jaune), précurseur prM des protéines de membrane (noir), protéines de capside C (bleu nuit), ARN génomique viral (blanc). Enveloppe virale (bleu marine), phosphatidylsérines (vert).

Adapté de Perera-Lecoin et collègues, 2014.

Contrairement aux particules matures, les particules immatures ne sont pas lisses : les protéines E ne sont pas associées en dimères parallèles à l'enveloppe virale mais en trimères, qui se présentent sous forme de spicules perpendiculaires à l'enveloppe virale[28,29]. Les particules partiellement matures, également appelées « mozaïques », combinent les phénotypes mature et immature. L'infectiosité des particules partiellement matures étant assurée, celle des particules immatures reste discutée et serait dépendante des anticorps[30,31].

- Régulation du cycle viral

Le bon déroulement du cycle viral de ZIKV est assuré par l'action coordonnée de plusieurs facteurs viraux, telles que les protéines non structurales et les ARN flaviviraux subgénomiques (ou sfRNA : « subgenomic flaviviral RNA », en anglais).

En effet, alors que les protéines structurales de capside (C), de matrice (M) et d'enveloppe (E) composent la particule virale, les protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, et NS5) exercent des fonctions multiples, notamment dans la réplication virale, l'assemblage des protéines structurales en néovirions, ou encore l'échappement viral à la réponse immunitaire (Tableau 1). Ainsi, celles-ci sont qualifiées de pléïotropes[23,32].

L'un des mécanismes de défense cellulaire consiste en la dégradation des ARN non coiffés et des ARN viraux par l'exoribonucléase cellulaire XRN-1. Dans la région 3' non codante du génome viral de ZIKV, les structures secondaires rendent incomplète la digestion nucléasique médiée par XRN-1, résultant en la production de fragments d'ARN non codants (de taille inférieure à 500 paires de bases) appelés ARN subgénomiques flaviviraux, ou sfRNAs[33]. Ceux-ci exercent plusieurs fonctions pro-virales, telles que l'inhibition de la signalisation de la réponse interféron, la modulation de l'activité du complexe de réplication virale, et l'altération de l'homéostasie des ARN messagers cellulaires via l'inhibition de XRN-1[34]. De façon intéressante, des disparités ont été observées dans la composition des sfRNAs des souches virales épidémiques et non épidémiques de ZIKV, suggérant un potentiel rôle de ces ARN viraux non codants dans la virulence et la pathogénèse virales[35].

Protéine non structurale	Taille	Fonctions – Rôles – Implications
NS1	48 kDa	Réplication virale *(monomères intracellulaires)* Réarrangements membranaires *(dimères transmembranaires)* Échappement viral à la réponse immunitaire *(hexamères sécrétés et monomères intracellulaires)*
NS2A	22 kDa	Réplication virale Assemblage viral Echappement à la réponse immunitaire
NS2B	14 kDa	Réplication virale *(cofacteur de NS3)*
NS3	70 kDa	Clivage de la polyprotéine virale *(activité sérine-protéase)* Réplication virale *(activité hélicase)* Synthèse de la coiffe *(activité NTPase)*
NS4A	16 kDa	Régulation de l'activité de NS3 Réarrangements membranaires Induction de l'autophagie
NS4B	27 kDa	Réarrangements membranaires Échappement à la réponse immunitaire Induction de l'autophagie
NS5	103 kDa	Réplication virale *(activité ARN-polymérase ARN-dépendante)* Synthèse de la coiffe *(activité méthyl-transférase)* Echappement à la réponse immunitaire *(dégradation de STAT2)*

Tableau 1. Fonctions des protéines non structurales flavivirales

B. Épidémiologie

Le virus Zika a été découvert en 1947 en Ouganda. Au cours des 60 premières années après sa découverte, le virus circula de façon silencieuse en Afrique et en Asie, et moins de 20 cas d'infection humaine furent recensés. Au cours du XXIème siècle, ZIKV a émergé dans les îles du Pacifique en causant deux épidémies majeures : sur l'île de Yap en 2007, et en Polynésie Française en 2013-14. Récemment, en 2015-16, ZIKV a émergé sur le continent américain en provoquant la plus grosse épidémie de l'Histoire, confirmant l'importance de son potentiel épidémique. Aujourd'hui, plus de 80 pays ont recensé la présence de cas autochtones d'infection ZIKV[36] (Figure 7).

1. Une découverte inattendue (1947)

En avril 1947, dans le cadre du programme de recherche sponsorisé par la fondation Rockefeller visant à identifier le(s) vecteur(s) du virus de la fièvre jaune, six plateformes contenant des macaques sentinelles ont été placées au niveau des canopées de la forêt de Zika, en Ouganda. Le 18 avril, la température d'un macaque rhésus sentinelle (n°766) augmenta de 2°C. Trois jours après l'apparition des symptômes, un prélèvement sanguin fût effectué. Après plusieurs expériences réalisées chez des souris et un macaque rhésus (n°771), ce prélèvement sanguin permit l'isolement d'un nouvel agent filtrable, nommé alors virus Zika (ZIKV) en référence à la forêt dans laquelle il fût découvert[37]. La souche isolée, dénommée MR766 pour macaque rhésus n°766, constitue aujourd'hui la souche virale historique et prototype de ZIKV.

L'année suivante, une autre souche virale (E/1) fût pour la première fois isolée à partir de moustiques *Aedes africanus* capturés dans la même zone de la forêt Zika puis amplifiée dans un macaque rhésus (n°758). Des expériences de séroneutralisation réalisées avec les sera des macaques rhésus n°766 et 758 convalescents ont ensuite démontré que les souches MR766 et E/1 appartenaient à la même espèce virale, démontrant que ZIKV infectait les moustiques[37].

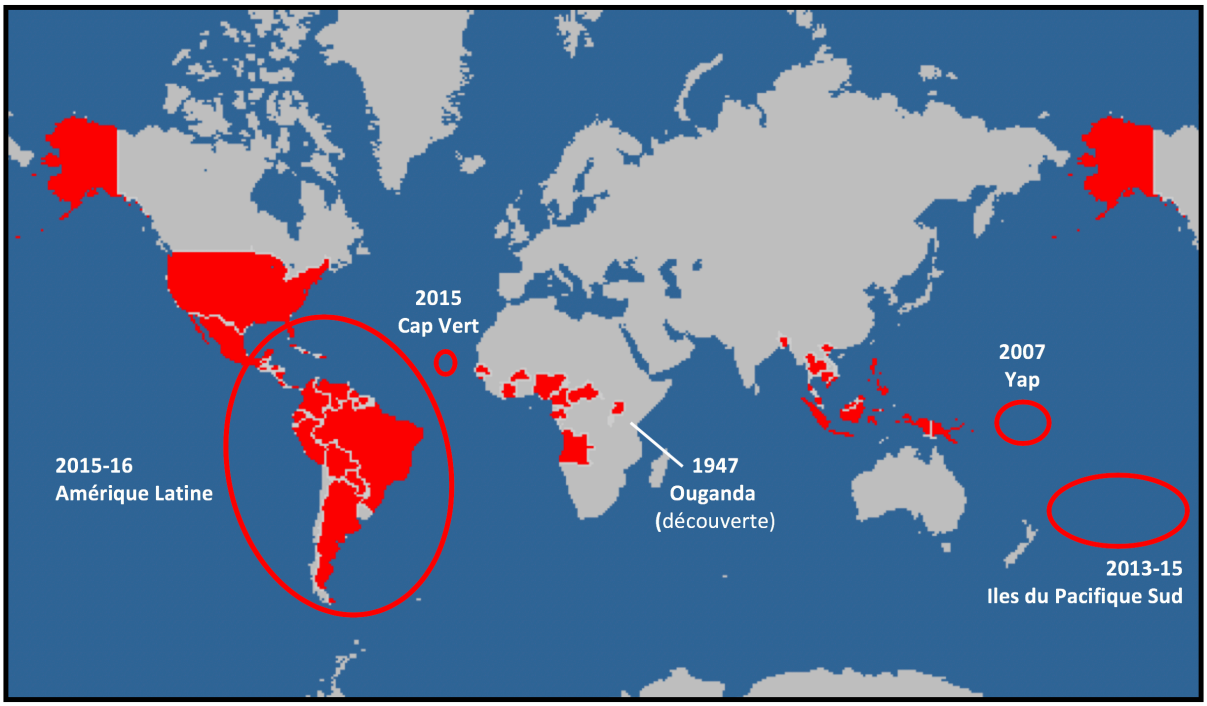


Figure 7. Distribution géographique de ZIKV au cours de l'Histoire

Cartographie des pays ayant rapporté une circulation active de ZIKV (rouge). Les dates clés telles que l'année de la découverte de ZIKV ainsi que les années des épidémies sont indiquées. Création originale d'après le dernier rapport de l'OMS (10 mars 2017).

Date	Lieu	Nombre de cas estimés	Caractéristiques
2007	Île de Yap	≈ 5 000	• Première épidémie ZIKV • 75% de la population touchée • Pas de pathologie
2013-2014	Polynésie Française	≈ 30 000	• 11,5% de la population touchée • Première apparition de SGB (0,024%)
2015-2016	Amérique Latine	≈ 750 000	• Plus grosse épidémie ZIKV • Confirmation des modes de transmission interhumaine (transfusion sanguine, sexuelle, transplacentaire) • Explosivité de l'incidence des SCZ • Déclaration OMS : « urgence de santé publique d'ordre international »

Tableau 2. Caractéristiques générales des trois principales épidémies ZIKV

SGB : syndromes de Guillain-Barré ; SCZ : syndromes congénitaux liés à Zika

Aujourd'hui, la date de la première détection d'un cas d'infection humaine par ZIKV reste controversée. Alors que le premier isolat humain fût initialement daté de 1954, d'autres études suggèrent plutôt qu'il s'agirait du virus Spondweni, et que le premier cas confirmé d'infection ZIKV daterait de 1962[36]. ZIKV a pour la première fois été isolé sur le continent asiatique en 1966 chez le moustique (Malaisie)[38] et en 1977 chez l'Homme (Indonésie)[39].
Durant les années 1950 à 1970, plusieurs études de séroprévalence humaine ont été menées en Afrique et en Asie. Cependant, la réactivité croisée des anticorps contre les différents membres du genre *Flavivirus* n'ayant pas encore été caractérisée à cette époque, les résultats ne permirent pas de conclure sur l'agent étiologique[40]. Ainsi, au cours des 60 premières années après la découverte de ZIKV, moins de vingt cas humains d'infection confirmée ont été rapportés.

2. Émergence dans les îles du Pacifique (2007-2014)

- Une première épidémie sur l'île de Yap en 2007

ZIKV a émergé pour la première fois en dehors de l'Afrique et de l'Asie sur l'île de Yap, en Micronésie[36]. En avril 2007, une augmentation du nombre de personnes développant des symptômes similaires à la dengue a été observée, et la présence de conjonctivites chez certains patients encouragea les médecins locaux à rechercher d'autres agents étiologiques. En juin 2007, la détection du génome viral de ZIKV dans le plasma de patients infectés en phase aigüe (moins de 10 jours après l'apparition des symptômes) associée à l'absence d'infection par d'autres arbovirus confirma ZIKV comme agent étiologique. Une étude de séroprévalence démontra qu'environ 75% de la population locale aurait été infectée, soit environ 5 000 habitants. Parmi ceux-ci, 18,4% développèrent des symptômes, dont les plus représentés furent des éruptions cutanées, de la fièvre, des arthrites/arthralgies, ainsi que des conjonctivites. L'épidémie dura environ 4 mois, d'avril à juillet 2007[41] (Tableau 1).
Bien que l'origine exacte de l'épidémie reste inconnue, l'hypothèse de l'introduction d'une personne infectée virémique par une souche appartenant au lignage asiatique en provenance des Philippines, à partir desquelles les voyages et échanges sont fréquents et où des infections ZIKV ont également été mises en évidence, reste valable[40]. Cette première épidémie,

d'ampleur relativement importante, démontra pour la première fois le potentiel épidémique de ZIKV.

- Un potentiel épidémique confirmé en Polynésie Française en 2013-2014

Quelques années après l'épidémie de 2007 sur l'île de Yap, ZIKV circula en Océanie et provoqua une seconde épidémie sur un autre territoire, en Polynésie Française. Les premiers cas locaux furent décrits en octobre 2013, lorsque 4 patients présentant des symptômes similaires à la dengue consultèrent les instances médicales. Après confirmation moléculaire de l'infection par ZIKV chez l'un d'entre eux, plusieurs dizaines de milliers de personnes consultèrent les médecins locaux[40]. L'épidémie dura environ 6 mois, d'octobre 2013 à avril 2014, et on estima à environ 30 000 le nombre de cas symptomatiques d'infection ZIKV à la fin de l'épidémie, représentant environ 11% de la population polynésienne[42] (Tableau 1). De façon concomitante, entre novembre 2013 et janvier 2014, une trentaine de personnes infectées par ZIKV en provenance de Polynésie Française furent détectés en Nouvelle Calédonie (2014)[40]. L'épidémie fut déclarée de février à août 2014, touchant environ 1 400 personnes, soit 0,8% de la population. L'ampleur de cette épidémie, mineure par rapport à l'épidémie polynésienne, pourrait être expliquée par des différences de populations, de vecteurs, et de conditions climatiques en Nouvelle Calédonie. Par la suite, entre 2014 et 2015, la propagation rapide de ZIKV dans les îles du Pacifique Sud[40] fût confirmée suite à la notification de plusieurs cas d'infection ZIKV sur les îles Cook, l'île de Pâques, Vanuatu, les îles Solomon, Samoa, et Fiji.

Outre le nombre plus important de cas infectés, l'épidémie en Polynésie Française en 2013-2014 se distingua de la précédente par l'apparition de complications neurologiques associées à l'infection. En effet, des syndromes de Guillain-Barré ont été observés chez 0,024% des patients infectés[43], représentant une augmentation de l'incidence d'un facteur 20 par rapport à la situation habituelle et pré-épidémique.

3. Une épidémie sans précédent aux Amériques (2015-2016)

Suite à la circulation de ZIKV dans les îles du Pacifique entre 2013 et 2015, l'émergence virale sur d'autres territoires peuplés de populations immunologiquement naïves, tels que les

Amériques, resta hautement probable. Au début de l'année 2015, plusieurs centres urbains du Nord-Est du Brésil notifièrent la présence de personnes présentant des exanthèmes aigües et des symptômes similaires à la dengue[44]. En mars 2015, suite à l'augmentation massive du nombre de cas touchés par cette maladie, le ministère de la santé brésilien investigua l'agent étiologique, et les premiers cas d'infection ZIKV furent rapportés dans l'État de Bahia, au Nord Est du Brésil[45]. Les séquençages génomiques des souches virales isolées révélèrent une similarité de séquence d'environ 99% avec une souche isolée lors de l'épidémie en Polynésie Française, en 2013-2014, démontrant l'origine asiatique du virus[45]. Quelques mois plus tard, en mai 2015, les premiers cas confirmés de transmission autochtone furent rapportés dans dix-huit autres États brésiliens, prouvant le succès de l'introduction et de l'émergence de ZIKV sur le continent américain[46].

De façon inattendue, l'importance de la transmission interhumaine fût mise en évidence lors de cette épidémie. Alors qu'une trentaine de cas de transmission sexuelle de ZIKV furent recensés, plusieurs milliers de cas de transmission pseudo-verticale par voie transplacentaire furent également notifiés. De plus, depuis l'émergence de ZIKV sur le continent américain, le ministère de la santé brésilien rapporta une augmentation explosive de l'incidence des microcéphalies chez les nourrissons nés de femmes infectées (5 280 cas de microcéphalies entre novembre 2015 et février 2016) par rapport à la situation pré-épidémique (moins de 200 cas par an)[47]. Le lien entre l'infection ZIKV et l'apparition de nombreux syndromes neurologiques du fœtus regroupés sous la dénomination « syndromes congénitaux liés à Zika » (microcéphalies, calcifications cérébrales, anomalies ophtalmologiques, contractures congénitales et néonatales, hypertonie…[48]), fût plus tard établi au cours d'une étude rétrospective réalisée à partir de cas infectés lors de l'épidémie en Polynésie Française en 2013-14[49]. Pour la première fois, le 1er février 2016, l'infection par ZIKV fût qualifiée « d'urgence de santé publique d'ordre international » par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en raison de l'expansion rapide de l'épidémie dans toute la région américaine et du nombre important de syndromes congénitaux liés à Zika (Tableau 1).

L'épidémie dura jusqu'en novembre 2016, infectant environ 750 000 personnes (440 000 – 1 300 000) et touchant plus de 60 pays de la région Caraïbes, d'Amérique du Sud, d'Amérique Centrale, et d'Amérique du Nord[46]. De plus, entre juillet 2015 et mai 2016, ZIKV s'est également propagé au Cap Vert, provoquant la première épidémie liée à ZIKV recensée sur le sol africain (7 000 cas confirmés d'infection ZIKV et 18 cas de microcéphalies) [50].

C. Écologie virale

1. Circulations selvatique et rurale/urbaine

- Définitions

Appartenant à la catégorie des virus transmis par les arthropodes, simplifiés sous le nom d'arbovirus, ZIKV est capable d'infecter deux types d'hôtes : un hôte vertébré, permettant le maintien et l'amplification du virus dans un écosystème ; et un hôte invertébré, jouant le rôle de vecteur, assurant la transmission du virus entre deux hôtes vertébrés. Bien que plusieurs types de vecteurs aient été identifiés comme responsables de la transmission de divers arbovirus (moustiques, tiques, moucherons…), seuls les moustiques sont concernés par la transmission de ZIKV.

Selon l'écosystème dans lequel circule le virus, on distingue deux types de cycles. On parle de cycle selvatique pour caractériser la circulation du virus entre des hôtes non humains et des moustiques zoonophiles, principalement en contexte forestier. En revanche, le cycle rural ou urbain qualifie la circulation de ZIKV entre l'Homme et les moustiques anthropophiles au sein de villages ou de villes, respectivement. La transition entre les cycles selvatique et rural/urbain a lieu lors d'introductions humaines en forêt, par exemple en périodes de chasse ou de déforestation, et est facilitée par des moustiques zoono-anthropophiles. Ainsi, lorsque la circulation selvatique « déborde » et permet une ou plusieurs infections humaines, on parle de « spillover ». A l'inverse, lorsque l'infection d'hôtes non humains en forêt fait suite à une introduction humaine infectée, on parle de « spillback » (Figure 8).
Il est important de noter que le « spillover » n'entraîne pas systématiquement une entrée pérenne de ZIKV dans le cycle rural/urbain. En effet, l'adaptation virale au nouvel hôte, le statut immunologique de la population humaine, l'abondance du vecteur anthropophile, ainsi que divers facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques modulent cette transition. De la même façon, l'augmentation de la rapidité et de l'intensité d'exécution du cycle rural/urbain lors des épidémies est hautement dépendante de ces paramètres. Ainsi, les différences de (séro)prévalence observées sur des territoires à la démographie équivalente (environ 270 000 habitants) en Polynésie Française (11,5%) et en Nouvelle Calédonie (0,8%)

pendant l'épisode épidémique en 2013-2014 pourraient être expliquées par ce type de différences.

Lorsque les cycles selvatique ou rural/urbain sont assurés de façon permanente dans un écosystème, on parle de zones d'enzootie ou d'endémie, respectivement.

Outre par cette alternance d'hôtes vertébrés et invertébrés, ZIKV circule également directement entre les vecteurs, permettant le maintien et la perpétuation du virus dans la population de moustiques, y compris en absence d'hôtes ou en présence d'hôtes immunisés (Figure 8). Cette circulation inter-invertébrée est assurée selon deux modes : par transmission verticale de ZIKV d'un moustique femelle à sa descendance lors du cycle gonotrophique[51], et par transmission horizontale entre deux moustiques lors de la copulation (transmission vénérienne dans les sens mâle – femelle et femelle – mâle)[52,53]. Ces deux modes de transmission inter-invertébrés ont également été mis en évidence pour d'autres arbovirus[54,55].

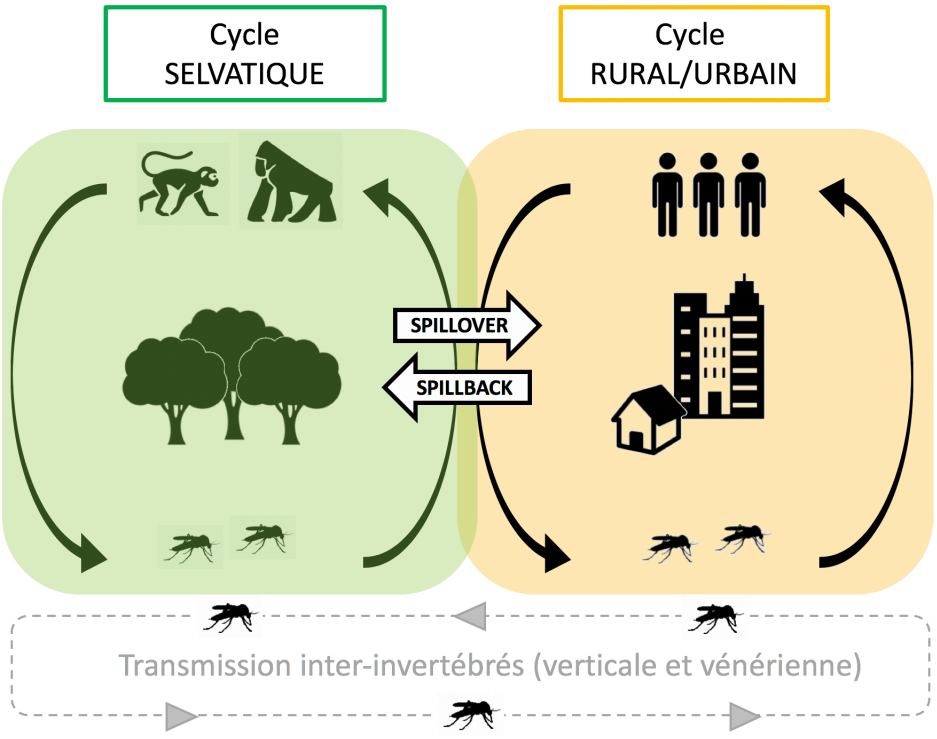


Figure 8. Circulation naturelle de ZIKV

ZIKV circule de façon selvatique entre des hôtes amplificateurs non humains (ex : primates non humains) et des moustiques zoonophiliques (ex : *Aedes africanus, Ae. furcifer, Ae. luteocephalus, Ae. vitattus, Ae. dalzieli,…*), et de façon rurale ou urbaine entre l'Homme et des moustiques (zoono-)anthropophiles (ex : *Ae. albopictus, Ae. aegypti,…)*. La transition entre les cycles selvatique et rural/urbain par ZIKV s'appelle le « spillover », la transition inverse étant nommée « spillback ». ZIKV est également transmis de vecteur en vecteur, soit pendant le cycle gonotrophique (transmission verticale), soit pendant la copulation (transmission vénérienne). Création originale

- Les vecteurs de ZIKV

A l'heure actuelle, plusieurs espèces de moustiques ont été décrites comme infectées par ZIKV. En revanche, il est difficile de déterminer avec certitude leur implication dans la transmission virale.

En effet, le vecteur doit dans un premier temps être compétent pour la transmission du virus. Contrairement aux virus de plantes, pour lesquels la transmission vectorielle peut être mécanique, la transmission de ZIKV est exclusivement circulante propagative, et nécessite donc une réplication chez l'hôte invertébré afin d'être transmis lors d'un second repas sanguin[56]. La compétence vectorielle d'un moustique pour un arbovirus infectant les animaux est ainsi définie par sa capacité à être infecté par ce virus, puis à autoriser sa dissémination dans l'organisme, et enfin à assurer sa transmission via la salive. D'après une étude systématique, 8 vecteurs, dont la majorité appartiennent au genre *Aedes*, se sont montrés compétents pour la transmission de ZIKV[57] : *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes vexans*, *Aedes notoscriptus*, *Aedes camptorhynchus*, *Aedes vittatus*, *Aedes luteocephalus*, et *Culex quinquefasciatus*. Cependant, exclusivement mesurée en laboratoire, la compétence vectorielle n'est pas suffisante. L'isolement du virus à partir de moustiques capturés sur le terrain est alors nécessaire pour soupçonner leur rôle potentiel en contexte endémique ou épidémique. Depuis 1948 et le premier isolement de ZIKV à partir de moustiques *Aedes africanus* en Ouganda, une trentaine de moustiques capturés sur le terrain ont permis l'isolement de ZIKV[57] : 22 espèces du genre *Aedes*, 4 espèces du genre *Culex*, 2 espèces du genre *Anopheles*, 2 espèces du genre *Eretmapodites*, et 1 espèce du genre *Mansonia*. En revanche, leur réel impact sur la transmission virale n'est pas connu.

A ce jour, alors qu'une quinzaine de vecteurs seraient potentiellement impliqués dans la circulation selvatique de ZIKV, seulement 2 ont été clairement identifiés comme responsables de l'intensité des cycles rural/urbain au cours des épidémies : *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*[58].

- Le spectre d'hôte de ZIKV

Durant le cycle selvatique, les hôtes non humains jouent un rôle fondamental dans le maintien et l'amplification du virus. A ce jour, plus de 60 espèces animales ont été identifiées comme

étant naturellement infectées par ZIKV (mammifères, oiseaux, amphibiens, reptiles)[57]. Cependant, les diagnostics ayant été établis sur la base de la présence d'anticorps, la réactivité croisée entre les différents *Flavivirus* pourrait être à l'origine d'une potentielle surestimation. Quoi qu'il en soit, les primates non humains (PNH) représentent une part majoritaire, parmi lesquels cinq espèces ont développé, suite à une infection expérimentale, des charges virales importantes et compatibles avec une transmission vectorielle[57].

En 2015, durant l'épidémie de ZIKV, plusieurs PNH ont été naturellement infectés[59,60], démontrant l'existence d'un « spillback » de ZIKV chez les PNH du Nouveau-Monde suite à l'introduction et l'émergence de ZIKV sur le territoire américain. D'un point de vue expérimental, la susceptibilité de marmousets du Nouveau-Monde a également été démontrée[61]. En revanche, la capacité de ces PNH à entretenir le cycle selvatique de ZIKV sous forme d'enzootie en Amériques reste encore à démontrer.

2. Modes de transmission à l'Homme

- Transmission vectorielle

La transmission vectorielle, c'est-à-dire la transmission d'un virus d'un individu donneur (infecté) à un individu receveur (non infecté ou infecté) par l'intermédiaire d'un vecteur, constitue le mode de transmission majoritaire de ZIKV, le plus connu, et le plus décrit[62].

Les mécanismes associés à la transmission vectorielle de ZIKV sont largement étudiés (Figure 9). La première étape de ce processus concerne l'acquisition du virus par le moustique. Durant leur vie, les moustiques femelles nécessitent un apport de protéines et de fer afin de produire leurs œufs. Non retrouvés dans le nectar, ces nutriments sont présents en grande quantité dans le sang de nombreux animaux, dont l'Homme. En période de reproduction, certain(e)s moustiques femelles, hématophages, peuvent effectuer plusieurs repas sanguins par jour. Lors de ces repas sanguins, le moustique plante son stylet dans un vaisseau sanguin afin d'en aspirer le contenu. En amont de l'aspiration du sang, la salive, riche en molécules anticoagulantes, anti-inflammatoires, et anesthésiantes, est inoculée, facilitant le prélèvement sanguin par le moustique et le rendant indolore pour l'hôte. Lorsque le moustique femelle effectue son repas sanguin chez une personne infectée et virémique, les

particules virales présentes dans le sang sont ingérées par le moustique, alors infecté de façon chronique.

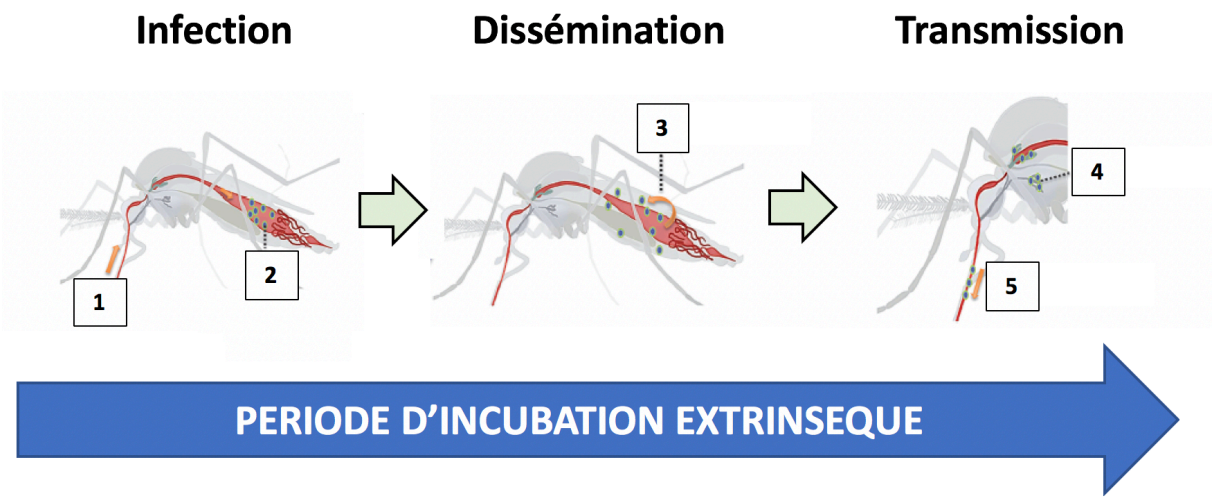


Figure 9. Mécanismes de transmission vectorielle
La transmission vectorielle de ZIKV peut être décomposée en 3 étapes : l'infection du moustique, la dissémination virale dans ce moustique, puis la transmission du virus. Suite à un repas sanguin infectant (1), le moustique ingère des particules virales. Celles-ci infectent et franchissent la barrière intestinale du moustique (2), permettant leur libération dans l'hémocoele. Les particules virales disséminent alors vers tous les organes de l'insecte (3), y compris les glandes salivaires (4). Via la salive, les particules virales néoformées sont inoculées à un hôte lors d'un repas sanguin (5). La durée écoulée entre l'ingestion et la transmission de ZIKV est appelée période d'incubation extrinsèque.
Adapté de Chouin-Carneiro et collègues, 2017.

La circulation du virus au sein du vecteur peut être décomposée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, le virus interagit avec la barrière intestinale du moustique. L'infection et le franchissement de cette dernière permettent la libération du virus dans l'hémocoele, cavité interne contenant l'hémolymphe dans laquelle baignent les organes et muscles du moustique : on parle de « midgut infection barrier » (MIB) et de « midgut escape barrier » (MEB), respectivement. Dans un second temps, ZIKV dissémine dans tous les organes du moustique y compris les organes génitaux afin d'entretenir la transmission verticale. De la même façon, ZIKV infecte et franchit l'épithélium délimitant les glandes salivaires afin d'être excrété dans la salive : on parle alors de « salivary glands infection barrier » (SIB) et de « salivary glands escape barrier » (SEB). Via la salive, les nouvelles particules virales sont alors injectées au second hôte lors d'un second repas sanguin. De plus, sous réserve du maintien de l'infectiosité de ZIKV dans l'environnement, l'urine contaminée de personnes infectées peut également

représenter un risque en étant épandue par miction dans des gîtes larvaires artificiels ou naturels, où les moustiques acquièrent le virus au cours de leur reproduction[63].
La durée écoulée entre l'acquisition et la transmission du virus par le moustique s'appelle période d'incubation extrinsèque (Figure 9). Celle-ci varie en fonction de divers paramètres tels que l'espèce de moustique ou la température extérieure[64].

Basée sur cette circulation propagative chez le vecteur, la compétence vectorielle constitue le paramètre principalement mesuré en conditions expérimentales afin de déterminer le potentiel intrinsèque d'une espèce de moustique à transmettre un virus. Celui-ci repose sur la mesure de ses taux d'infection, de dissémination, et de transmission virale. Étant donné que plusieurs espèces de moustiques naturellement infectées par ZIKV sont également compétentes pour la transmission de ZIKV en conditions expérimentales, plusieurs espèces de moustiques peuvent constituer le rôle de vecteur dans le cadre de la transmission vectorielle de ZIKV à l'Homme. Cependant, la transmission virale dépend également de facteurs extrinsèques (abondance de vecteurs, conditions climatiques,…). Ainsi, la capacité vectorielle constitue un second paramètre non négligeable évaluant le potentiel d'une population de moustiques à transmettre un virus, quelle que soit leur compétence vectorielle intrinsèque. Selon l'abondance d'une population de moustiques, sa fréquence de repas sanguins ainsi que son index de préférence à piquer l'Homme, la capacité vectorielle permet de rationaliser le risque associé à la présence ou non de ce même vecteur sur un territoire. Ainsi, une population abondante de moustiques faiblement compétents pour la transmission de ZIKV pourra entretenir une capacité vectorielle supérieure à une population peu représentée de moustiques très compétents. Étant donné que l'abondance d'une population de moustiques, et *a fortiori* la capacité vectorielle, est variable selon l'aire géographique et la période temporelle, il est ainsi difficile, de façon rétrospective, d'incriminer un vecteur avec certitude.

Suite à des collectes de moustiques menées en contexte épidémique en 2007 sur l'île de Yap[65], le moustique prépondérant identifié fût *Aedes hensilli*. En revanche, bien que majoritairement représenté par rapport à d'autres espèces telles qu'*Aedes aegypti*, aucun individu infecté de cette espèce n'a été détecté infecté par ZIKV sur le terrain[65]. De plus, sa faible compétence vectorielle pour la transmission de ZIKV remet en question son rôle dans l'épidémie de 2007. De la même façon, plusieurs espèces de moustiques ont été capturées en Polynésie Française,

dont les deux majoritaires sont *Aedes aegypti* et *Aedes polynesiensis*. Contrairement à *Aedes aegypti*, les indices de transmission mesurés en laboratoire chez *Aedes polynesiensis* sont nuls[66]. Lors de l'épidémie de 2015-2016, les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* constituèrent les espèces de moustiques infectés majoritaires en Amérique Latine[58]. Expérimentalement, ces deux espèces ont également été démontrées comme étant compétentes pour la transmission de ZIKV[67,68].

A ce jour, *Aedes aegypti et Aedes albopictus* sont reconnues comme les deux principales espèces responsables de la transmission vectorielle de ZIKV à l'Homme (Figure 10).
Aedes aegypti est un moustique exclusivement anthropophile. Vivant en contact avec l'Homme, cette espèce est principalement retrouvée dans les villes ou les villages, et établit principalement des gîtes larvaires d'origine artificielle (pots, soucoupes, piscines,…). Ce moustique serait surtout impliqué dans le cycle rural/urbain. *Aedes albopictus*, ou moustique tigre, est plutôt anthropo-zoonophile et pourrait jouer un rôle lors des transitions entre les cycles selvatique et rural/urbain. Cette espèce de moustique peut s'adapter aux cadres forestier, rural, périurbain, et urbain, et constitue des gîtes larvaires à la fois artificiels (pots, soucoupes, piscines,…) au contact de l'Homme et naturels (troncs d'arbres, flaques d'eau,…) en zones non urbaines. Suite à son introduction dans une région, *Aedes albopictus* a un potentiel d'infestation important, faisant de cette espèce l'une des plus invasives au monde.

La transmission vectorielle occupe une place importante lors des émergences arbovirales et des épisodes épidémiques. En 1993 et 1996, des épizooties liées au sous-type IE du virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV) au Mexique furent associées à une augmentation de sa transmission vectorielle suite à une mutation dans la glycoprotéine d'enveloppe[69]. De la même façon, une mutation simple dans la glycoprotéine d'enveloppe du virus du chikungunya (CHIKV) entraîna une adaptation au vecteur *Aedes albopictus*, principal vecteur lors de l'épidémie ayant eu lieu à La Réunion en 2005-2006[70].
De façon intéressante, une étude récente a démontré qu'une mutation dans la protéine non structurale NS1 de ZIKV a permit d'augmenter l'acquisition du virus par le moustique[71]. En effet, cette mutation A188V potentialise la fonction de NS1 en inhibant la réponse interféron de l'hôte[72], résultant en une charge virale plus importante et donc plus propice à une acquisition par le moustique. Ayant approximativement été introduite en 2012, cette

mutation entraînant l'augmentation de la transmission vectorielle de ZIKV pourrait être à l'origine des épidémies ayant eu lieu en Polynésie Française et en Amérique latine.

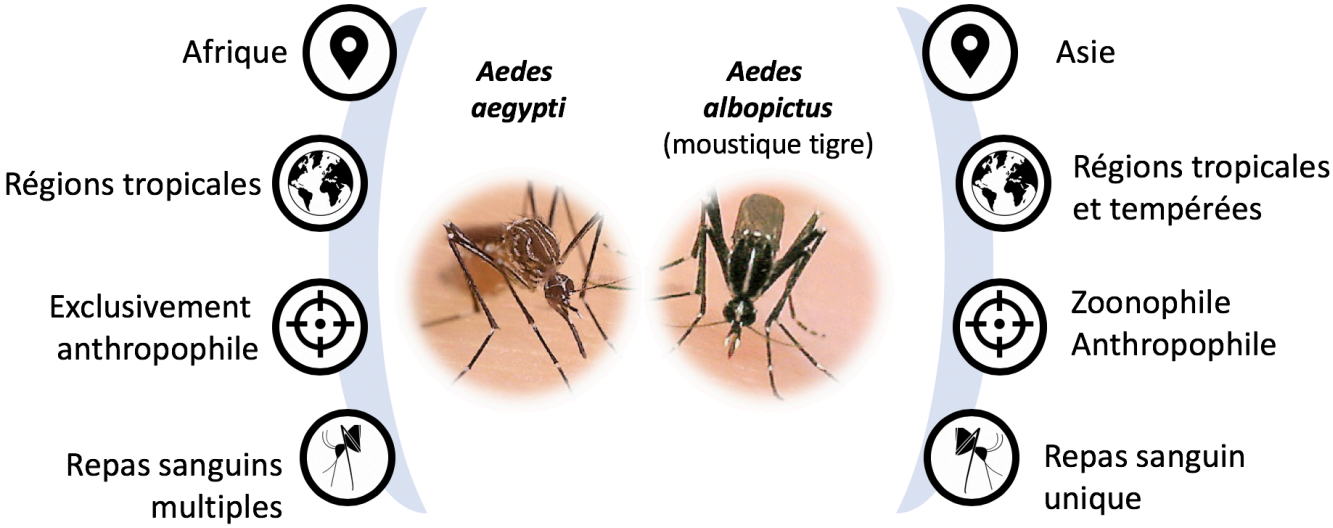


Figure 10. Caractéristiques générales des deux principaux vecteurs de ZIKV
Les principaux moustiques impliqués dans la transmission vectorielle de ZIKV lors des épidémies sont Aedes aegyti (à gauche) et Aedes albopictus (à droite). Ae. aegypti provient d'Afrique et vit au contact de l'Homme dans les régions tropicales. Il est exclusivement anthropophile et effectue plusieurs repas sanguins par cycle gonotrophique. Ae. albopictus, également appelé moustique tigre, provient d'Asie et s'est répandue dans les régions tropicales et tempérées. Il pique aussi bien l'Homme que l'animal, mais n'effectue qu'un repas sanguin par cycle gonotrophique.

- Transmission non vectorielle

Bien que majoritaire, la transmission vectorielle ne constitue pas le mode de transmission unique de ZIKV. Ce virus se distingue des autres arbovirus par son excrétion dans de nombreux fluides biologiques[73,74] tels que la salive[75,76], les larmes[77], le liquide nasopharyngé[78], l'urine[79–82], le sperme[83–85], les sécrétions vaginales[86,87], et le lait maternel[76,88–90]. La détection de génome viral et/ou de particules infectieuses dans ces fluides biologiques de personnes infectées soulèvent donc des questions concernant le risque de transmission interhumaine.
A ce jour, trois modes de transmission non vectorielle et interhumaine de ZIKV sont reconnus : horizontalement par transfusion sanguine et par voie sexuelle, et pseudo-verticalement par voie transplacentaire[74].

- *Transmission par transfusion sanguine*

Comme pour tout agent pathogène circulant dans la circulation sanguine, le risque de transmission interhumaine de ZIKV par transfusion sanguine existe. Nécessitant un don de sang prélevé à partir d'un donneur infecté virémique, ce mode de transmission a pour la première fois été suggéré en 2015 lorsque deux patients hospitalisés au Brésil furent transfusés avec du sang provenant de donneurs infectés[74]. L'infection ZIKV fut confirmée, et l'un des deux patients développa des symptômes. Bien que la transmission par transfusion sanguine ne fût pas formellement confirmée par séquençage des souches virales, la transmission vectorielle fût tout de même écartée car le patient ayant développé des symptômes était confiné en unité de soins intensifs depuis 3 mois. L'évidence du potentiel de transmission de ZIKV par transfusion sanguine fut ensuite établie en 2016 lorsque deux receveurs de concentrés de plaquettes provenant d'un unique donneur infecté furent diagnostiqués infectés par ZIKV. L'identité phylogénétique des trois souches isolées à partir des trois individus confirma la transmission par transfusion sanguine[91]. Enfin, puisque presque 3% des donneurs de sang furent diagnostiqués positifs pour ZIKV lors de l'épidémie en Polynésie Française, ce mode de transmission aurait également pu jouer un rôle dans l'ampleur de l'épidémie en 2013-2014[92].

La transmission des arbovirus par transfusion sanguine a déjà été démontrée pour les virus de la dengue (DENV)[93], du Nil Occidental (WNV)[93], de l'encéphalite à tiques (TBEV)[93], et de la Rivière Ross (RRV)[94]. En revanche, étant données la courte fenêtre virologique correspondant à la période de virémie ainsi que l'existence de tests diagnostiques et de méthodes d'inactivation[95], ce mode de transmission peut être facilement limité.

Alors que la transmission virale par transfusion sanguine peut potentiellement exister pour tous les arbovirus, deux modes relativement importants de transmission interhumaine caractéristiques de l'infection ZIKV ont été notifiés lors des épidémies en Polynésie Française et en Amérique Latine : horizontalement par voie sexuelle, et pseudo-verticalement par voie transplacentaire.

- *Transmission sexuelle*

Le premier cas de transmission sexuelle par ZIKV fut décrit en 2011 suite à une expédition scientifique ayant eu lieu en 2008[96]. Au retour d'un séjour dans le Sud-est du Sénégal, un

scientifique américain développa une hémospermie (sang dans le sperme) associée à des éruptions cutanées, une fatigue extrême ainsi que des maux de tête. Sa femme, restée aux États-Unis et n'ayant jamais voyagé depuis 2007, développa à son tour des symptômes non spécifiques quelques jours après le retour de son mari. Les deux patients furent ensuite diagnostiqués infectés par ZIKV, suggérant une transmission virale par voie sexuelle. La transmission sexuelle de ZIKV fut par la suite démontrée dans plusieurs pays où la transmission vectorielle n'était pas considérée à l'époque (Allemagne, Italie, Espagne, France,…)[97]. Aujourd'hui, plus de 70 cas de transmission sexuelle de ZIKV ont été recensés[98], majoritairement suite à des relations hétérosexuelles dans le sens homme – femme, mais également suite à des relations hétérosexuelles dans le sens femme – homme[99] et homosexuelles homme – homme[100]. Le caractère bidirectionnel de la transmission sexuelle de ZIKV supporte ainsi l'infectiosité des sécrétions vaginales et du sperme. De plus, étant donnée la détection du génome viral jusqu'à plus de 70 jours dans les sécrétions vaginales[101] et 180 jours dans le sperme[102], le Centre de Contrôle et de Prévention des Maladies aux États-Unis (CDC – Center for Disease Control and Prevention) recommande le port de préservatifs et/ou l'abstinence sexuelle pendant 6 mois ou 8 semaines après l'apparition des symptômes, selon si l'homme ou la femme constitue le partenaire infectant, respectivement[102]. D'un point de vue expérimental, l'efficacité de la transmission sexuelle de ZIKV a également été démontrée *in vivo* dans les modèles simien[103] et murin[104], avec observation d'une réplication virale dans les tissus génitaux mâle et femelle[97].

- *Transmission transplacentaire*

Durant l'épidémie en Amérique Latine en 2015-2016, c'est l'augmentation du nombre de cas de microcéphalies chez les nourrissons nés de femmes infectées par ZIKV qui suggéra dans un premier temps une potentielle transmission virale durant la grossesse. Par la suite, la détection du génome viral et de particules infectieuses ZIKV dans le liquide amniotique de la mère, ainsi que dans le placenta, le sérum, et le cerveau des nouveau-nés présentant des anormalités cérébrales, y compris dans les cas d'avortement, ont confirmé la transmission *in utero* de ZIKV[105]. Grâce à des études expérimentales effectuées chez la souris, il a été démontré que la transmission *in utero* de ZIKV était assurée suite au franchissement de la barrière placentaire[106]. Ainsi, lorsqu'une femme enceinte est infectée par ZIKV, celui-ci est capable d'être transmis au fœtus en franchissant la barrière placentaire, et ce à tout moment

de la grossesse : au premier, au deuxième, ou au troisième trimestre. Bien qu'observé pour la première fois lors de l'épidémie en 2015-2016, une étude rétrospective indiqua que ce mode de transmission eût également lieu lors de l'épidémie en Polynésie Française en 2013-2014[49]. De par la pathogénicité sévère observée chez les nouveau-nés suite à l'infection congénitale, la transmission pseudo-verticale de ZIKV de la mère à l'enfant *in utero* par voie transplacentaire retînt l'attention de la communauté scientifique et du grand public à l'échelle internationale.

- *Autres modes de transmission interhumaine*

De façon intéressante, la transmission post-natale de ZIKV au cours de l'allaitement maternel a été suggérée d'un point de vue épidémiologique (études de cas), mais la preuve expérimentale de la plausibilité de ce mode de transmission reste à démontrer (Figure 11). En effet, d'importantes charges virales (génome et/ou particules infectieuses) ont été détectées dans le lait maternel de plusieurs femmes infectées[107], y compris plus de 30 jours après l'apparition des symptômes[89]. De plus, des prélèvements de lait maternel d'une femme infectée ainsi que de l'urine de son enfant allaité et âgé de 5 mois ont permis la caractérisation de deux souches de ZIKV phylogénétiquement très proches (99% d'identité de séquence, 2 mutations), suggérant une potentielle transmission de ZIKV de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement[108,109]. L'âge avancé (5 mois) ainsi que l'environnement sous air conditionné du nourrisson permirent d'écarter des potentielles transmissions intra-utérine et vectorielle, respectivement. D'un point de vue expérimental, alors que le lait maternel ne semble pas exercer d'effet inhibiteur sur l'infectiosité de ZIKV[110,111], seule la transmissibilité de ce virus par voie orale a été démontrée *in vivo* chez le singe[112,113]. Bien que ces travaux renforcent la plausibilité de la transmissibilité de ZIKV par voie orale suite à l'ingestion de lait infectieux, des études supplémentaires sont aujourd'hui nécessaires pour démontrer formellement la transmission de ZIKV par allaitement maternel.

Pour conclure, ZIKV se distingue des autres arbovirus de par l'importance que représentent ses modes de transmission interhumaine. Cependant, la part épidémiologique représentée par ces dernières par rapport à la transmission vectorielle reste indéterminée. Quoi qu'il en soit, ces modes de transmission interhumaine pourraient permettre l'introduction du virus

dans des régions où la transmission vectorielle y est limitée et favoriseraient ainsi le succès d'une émergence virale dans de nouvelles régions.

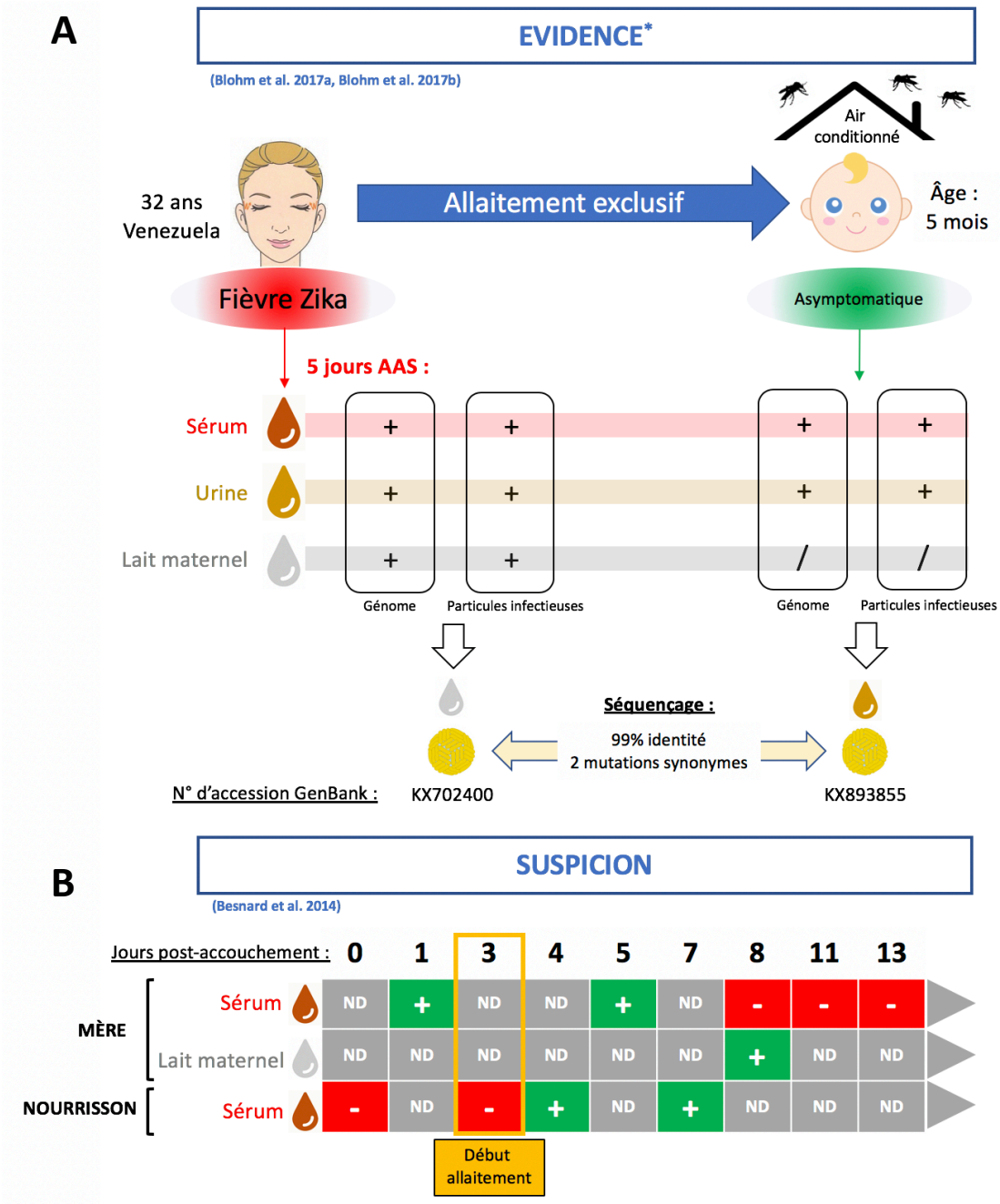


Figure 11. Transmission de ZIKV de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel

(A) Deux publications basées sur la même étude ont décrit un cas de transmission mère-enfant par allaitement maternel. Blohm et collègues ont rapporté la présence de deux souches virales quasi-identitiques (99% d'identité de séquence) dans le lait maternel d'une femme infectée allaitante et l'urine de son nourrisson âgé de 5 mois et placé sous air conditionné. AAS : après apparition des symptômes. **(B)** Exemple de chronologie d'un cas suspect de transmission de ZIKV au cours de l'allaitement maternel. Le nourrisson, allaité à partir de l'âge de 3 jours d'une mère infectée, est également devenu infecté. Le lait maternel, non testé à ce moment, s'est révélé positif 5 jours plus tard.

D. Physiopathologie

1. Tropisme et dissémination chez l'hôte

- Généralités

Lors d'une piqûre infectante par un moustique, ZIKV est relargué avec la salive du moustique dans le derme de l'hôte ainsi que dans un vaisseau sanguin (Figure 12). Dans le derme, ZIKV peut infecter de façon productive les cellules épithéliales de la peau telles que les kératinocytes, mais aussi les fibroblastes et les cellules dendritiques immatures[15], ce qui contribue à l'amplification locale du virus. La sensibilité et la permissivité des cellules de Langerhans ainsi que des macrophages résidents de l'épiderme et du derme n'ont pas été démontrées. Dans la circulation sanguine, ZIKV cible préférentiellement les monocytes[114] , et dans une moindre mesure les cellules dendritiques circulantes. En revanche, les cellules immunitaires de la lignée lymphoïde (lymphocytes T, B, NK) sont peu sensibles à l'infection[114]. La forte dose infectante inoculée par le moustique au cours du repas sanguin, l'amplification virale associée à l'abondance de cellules permissives à l'infection, ainsi que la rapidité du cycle viral de ZIKV (une dizaine d'heures) contribuent à une apparition rapide de la virémie, observée dès le premier ou le deuxième jour chez plusieurs modèles animaux[115–117]. Durant cette phase de virémie, qui dure environ une semaine, la particule virale libre est capable d'infecter les cellules endothéliales tapissant les parois des vaisseaux sanguins ainsi que de nombreuses cellules épithéliales, permettant le franchissement de barrières anatomiques et la dissémination virale dans plusieurs organes tels que le cerveau, le cœur, les poumons, le foie, les yeux, les reins, les intestins, les muscles, les glandes mammaires, les testicules, etc[115,116] (Figure 12). Dans le cas de l'infection d'une femme enceinte, ZIKV est également capable de franchir la barrière placentaire, aboutissant à l'infection du fœtus[118]. De plus, en infectant les différents sous-types de monocytes circulants et en induisant une expansion des populations monocytaires CD16^{+}[114], spécialisées dans l'infiltration des organes par migration transendothéliale, ZIKV pourrait également disséminer dans certains organes sous forme associée aux cellules par un mécanisme appelé « cheval de Troie », mais cela reste à démontrer.

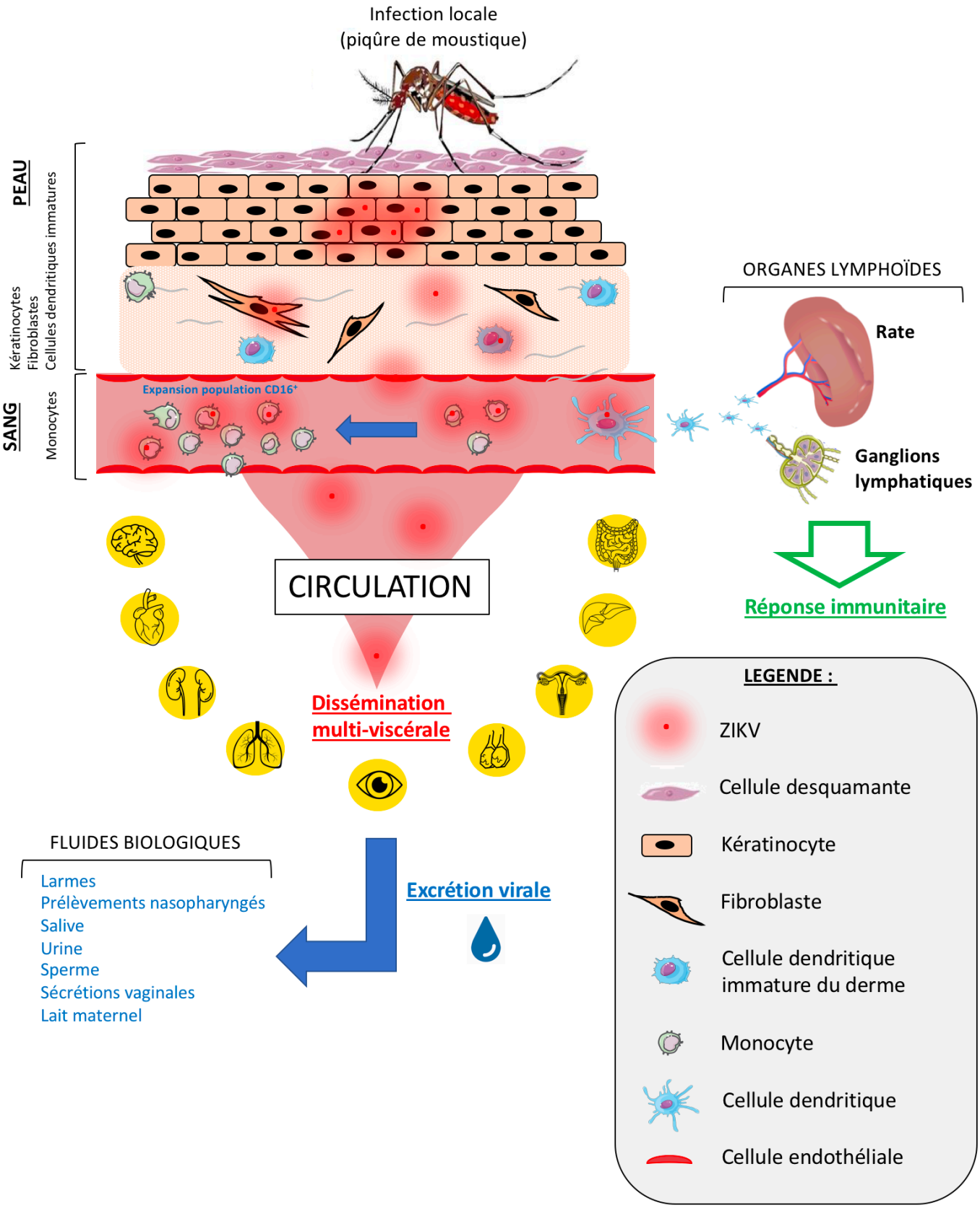


Figure 12. Dissémination de ZIKV chez l'hôte

Schéma récapitulatif de la dissémination de ZIKV dans l'organisme de l'hôte après acquisition du virus suite à une piqûre infectante de moustique infecté. Création originale

Dans le même temps, véhiculé par les cellules dendritiques, ZIKV gagne les organes lymphoïdes tels que la rate ou les ganglions lymphatiques, où la mise en place rapide de la réponse immunitaire permet de restreindre l'infection périphérique, aboutissant à une chute de la virémie. La plupart des anticorps anti-ZIKV produits sont dirigés contre la protéine E. En revanche, l'infection du cerveau, des yeux et des testicules, immunologiquement privilégiés, peut résulter en une persistance virale dans ces organes.

Il est intéressant de noter que le rôle des anticorps anti-DENV préexistants sur l'infection ZIKV reste controversé. Il a été montré que ces anticorps pouvaient, de par leur réactivité croisée avec ZIKV, à la fois contribuer à la clairance virale de ZIKV (par neutralisation) ou au contraire favoriser l'infection de plusieurs types cellulaires (par ADE, « antibody-dependant enhancement » en anglais)[119,120]. Le rôle neutralisant ou favorisant de ces anticorps sur l'infection ZIKV serait également lié à leur concentration sérique : de fortes concentrations d'anticorps anti-DENV pourraient contribuer à la neutralisation et à la clairance de ZIKV, alors que de faibles concentrations permettraient d'augmenter l'efficacité de l'infection ZIKV par ADE[121].

- Excrétion virale dans les fluides biologiques

Contrairement aux autres arbovirus, ZIKV est excrété dans l'urine[79–82], la salive[75,76], les larmes[77], le liquide nasopharyngé[78], , le sperme[83–85], les sécrétions vaginales[86,87], et le lait maternel[76,88–90]. Alors que la virémie dure environ une semaine, ZIKV persiste dans certains de ces fluides biologiques, y compris après la clairance du virus en périphérie (Figure 12).

- *Urine*

La présence de ZIKV dans l'urine a été détectée pour la première fois chez une voyageuse japonaise rentrant d'un séjour en Polynésie Française en 2014[80]. Cinq jours après l'apparition des symptômes, alors que sa virémie était nulle, c'est la détection de particules infectieuses dans son urine qui permit de diagnostiquer l'infection ZIKV. L'excrétion virale de ZIKV dans l'urine a été détectée jusqu'à 30 jours après l'apparition des symptômes et peut ainsi permettre un diagnostic tardif de cette infection[82]. De façon intéressante, le génome viral a également été détecté dans les féces d'un patient infecté en phase aigüe[122].

- *Prélèvements nasopharyngés*

Deux études de cas ont rapporté la présence de génome viral ZIKV dans des prélèvements nasopharyngés issus de personnes infectées et symptomatiques[74]. En revanche, la présence de particules infectieuses n'a pas été démontrée.

- *Salive*

Dans la salive, des charges virales 100 000 fois plus élevées que dans le sérum ont été détectées 5 jours après l'apparition des symptômes, avec une persistance jusqu'à 29 jours après l'apparition des symptômes[75]. L'excrétion de particules infectieuses dans la salive a été confirmée chez d'autres patients ainsi que chez des primates non humains infectés de façon expérimentale[115,123].

- *Larmes*

Bien que non systématique, l'excrétion virale de ZIKV dans le liquide conjonctival a été mise en évidence chez 3 patients convalescents[77], et des particules virales infectieuses ont été isolées à partir des glandes lacrymales et des larmes de souris infectées par ZIKV[124].

- *Sperme et sécrétions vaginales*

De façon intéressante, l'excrétion de ZIKV dans les sécrétions génitales a également été décrite. Alors que le génome viral a été détecté jusqu'à plus de 70 jours post-infection dans les sécrétions vaginales[101], celui-ci a été détecté jusqu'à 6 mois post-infection dans le sperme[102]. Dans ce dernier des particules infectieuses ont également été détectées. En 2019, Ganor et ses collègues ont démontré que les macrophages urétraux constituaient d'importants réservoirs cellulaires du VIH-1[125]. Alors que ZIKV infecte préférentiellement les cellules myéloïdes, dont les monocytes et les macrophages, l'infection des macrophages urétraux par ZIKV pourrait contribuer à la persistance virale dans le tractus génital mâle et l'excrétion prolongée dans le sperme.

Enfin, la persistance virale de ZIKV dans le sperme comparée à l'excrétion brève dans les sécrétions vaginales pourrait également expliquer la prépondérance du sens homme – femme des transmissions de ZIKV par voie sexuelle.

- *Lait maternel*

A l'image d'autres arbovirus, d'importantes charges virales ont également été détectées dans le lait maternel. En septembre 2014, le génome viral de ZIKV fût pour la première fois détecté dans le lait maternel de deux femmes infectées[76]. La première détection de particules infectieuses ZIKV a été notifiée en juillet 2015 chez une femme infectée peu avant l'accouchement[88], et fut confirmée par la suite chez d'autres patientes, y compris 30 jours après l'apparition des symptômes[90]. Dans le modèle murin, ZIKV a également été détecté dans le lait maternel[126].

L'excrétion du virus dans les fluides biologiques associés aux organes infectés constitue l'une des caractéristiques de l'infection ZIKV. Celle-ci pourrait être due à l'infiltration de cellules infectées mais également au tropisme cellulaire à large spectre de ZIKV, notamment suite à l'infection de nombreux organes excréteurs tels que les appareils reproducteurs mâle et femelle, les yeux, ou les glandes mammaires. De plus, par rapport à d'autres *Flavivirus*, la structure plus compacte de ZIKV pourrait également permettre une meilleure stabilité virale dans ces différents fluides[127], résultant ainsi en une meilleure détection. A ce jour, outre la détection de particules infectieuses dans presque tous les fluides biologiques cités, des études *in vitro* de la préservation de l'infectiosité de ZIKV dans ces fluides ont été menées uniquement dans l'urine[63,128], la salive[112], et le lait maternel[110,111].
Enfin, étant donnée la disponibilité et la facilité de prélèvement (non-invasif) de ces fluides biologiques ainsi que la persistance virale associée à certains de ces derniers (salive, urine), leur utilisation en tant qu'outils diagnostics a déjà été mentionnée[129,130].

2. Évolutions de l'infection

Avant l'épidémie sur l'île de Yap en 2007, moins de 20 cas confirmés d'infection ZIKV avaient été détectés chez l'Homme. Bien qu'il soit possible que ces observations reflètent une faible circulation du virus au cours des 60 premières années après sa découverte, il est également probable que ces observations soient biaisées par la fiabilité des diagnostics sérologiques (réactivité croisée des anticorps dirigés contre les *Flavivirus*). De plus, l'évolution de l'infection chez l'Homme se caractérise essentiellement par un portage asymptomatique ou la présence

de symptômes non spécifiques, ce qui peut contribuer à une sous-estimation du nombre de cas infectés par ZIKV.

Aujourd'hui, alors que le potentiel épidémique de ZIKV fût révélé au cours des dernières années, des pathologies étroitement liées à l'infection par ZIKV ont été mises en évidence.

- Portage asymptomatique et symptômes non spécifiques

Dans la majorité des cas (80%), l'infection ZIKV reste asymptomatique[41].

En revanche, dans 20% des cas, l'infection ZIKV se caractérise par la présence de symptômes non spécifiques. Ces derniers apparaissent après une période d'incubation variable de 3 à 14 jours[131], et durent entre 4 et 7 jours. Les symptômes les plus fréquemment observés sont des éruptions cutanées, des myalgies, des arthralgies, ainsi que des maux de tête associés à une légère fièvre et de la fatigue. Alors que le tableau clinique ressemble à celui causé par d'autres arbovirus tels que DENV ou CHIKV, l'ampleur des symptômes est généralement moindre lors de l'infection ZIKV. De plus, d'autres symptômes plus spécifiques peuvent compléter le tableau clinique, comme des conjonctivites ou des hémospermies. La résolution de la maladie est souvent automatique et ne nécessite pas de traitements.

- Atteintes neurologiques chez l'adulte

Rarement, l'infection ZIKV provoque des méningoencéphalites (inflammation des méninges et du parenchyme cérébral)[132] et des myélites (inflammation de la moelle épinière)[133].

De façon plus importante, des syndromes de Guillain-Barré (SGB) ont également été associés à l'infection ZIKV. Le premier cas de SGB associé à l'infection ZIKV fut détecté en Polynésie Française en novembre 2013[134]. Alors qu'une vingtaine de cas de SGB y avaient été notifiés en 3 ans (entre 2009 et 2012), une augmentation brutale de l'incidence (42 cas totaux) a été recensée au Centre Hospitalier de Polynésie Française en 3 mois au cours de l'épisode épidémique (entre novembre 2013 et février 2014)[43]. L'intégralité des cas furent diagnostiqués comme infectés par ZIKV. De plus, la progression des SGB s'effectuant entre 1 et 3 semaines suivant l'infection, l'observation d'un retard d'environ 1 mois entre le pic d'incidence des cas de syndromes de Guillain-Barré par rapport au pic d'incidence des cas d'infection ZIKV constitua un argument supplémentaire pour lier l'infection ZIKV à l'apparition

des syndromes de Guillain-Barré. Lors de cette épidémie, Cao-Lormeau et collègues estimèrent à 0,024% l'incidence des SGB parmi les personnes infectées par ZIKV[43]. A ce jour, 272 cas de SGB associés à une infection ZIKV ont été décrits, dont la majorité ont été recensés en Amérique Latine[135].

Plusieurs formes de syndromes de Guillain-Barré existent, dont les deux principales sont la forme myélinique et la forme axonale. La forme myélinique, ou neuropathie inflammatoire aigüe démyélinisante (NIAD), est caractérisée par une démyélinisation des axones résultant en un ralentissement de l'influx nerveux, responsable de mouvements ralentis et de sensations anormales. La forme axonale, ou neuropathie axonale motrice aigüe (NAMA), est plus sévère et est caractérisées par une lésion de l'axone des nerfs moteurs, résultant en des paralysies flasques pouvant être accompagnées de séquelles à long terme. Les études électromyographiques réalisées chez les patients infectés par ZIKV atteints de SGB caractérisèrent majoritairement des formes myéliniques (plus de 75% des SGB), dont certaines associées à des lésions axonales[135]. Aujourd'hui, le développement de SGB suite à l'infection ZIKV reste non élucidé et pourrait mettre en jeu des mécanismes directs (infection virale des cellules productrices de myéline[136–138] ou indirects (mimétisme antigénique entre des protéines virales et des protéines humaines liées à la myéline, résultant en la synthèse d'auto-anticorps, impliqués dans la démyélinisation[139]). Enfin, étant donnée la co-circulation de nombreux arbovirus dans certaines régions ainsi que l'observation de SGB suite à l'infection par certains d'entre eux (WNV, JEV, DENV, CHIKV)[43], la potentialisation du développement des SGB suite à une surinfection et/ou coinfection a également été suggérée[43,135].

- Atteintes neurologiques chez le fœtus

L'infection congénitale par ZIKV entraîne, comme chez l'adulte, une dissémination multi-viscérale du virus chez le fœtus[140]. En revanche, celle-ci se distingue par la sévérité des atteintes neurologiques engendrées suite à l'invasion du système nerveux central (SNC) fœtal. En effet, durant l'épidémie en Amérique Latine en 2015-2016, une augmentation d'un facteur 20 du nombre de nouveau-nés présentant des microcéphalies à la naissance fut observée. La corrélation spatiotemporelle de cette augmentation d'incidence avec l'épisode épidémique ZIKV associée à la détection du virus chez ces nouveau-nés permit à l'époque de suspecter

ZIKV comme agent étiologique. Aujourd'hui, alors que plusieurs études épidémiologiques et expérimentales ont démontré le lien entre la microcéphalie et l'infection *in utero* par ZIKV[49,141], plus de 2 600 cas d'anomalies du développement et/ou du fonctionnement du SNC liées à l'infection congénitale par ZIKV ont été recensés dans 29 pays différents[142]. En effet, d'autres atteintes neurologiques, à la fois structurales et fonctionnelles, ont également été observées, permettant d'élargir la définition de la pathologie à « syndrome congénital lié à Zika (SCZ) ». Étant donnée la diversité de ces atteintes pouvant faire suite à une infection du système nerveux fœtal, il n'existe pas de liste exhaustive décrivant les SCZ. Néanmoins, les manifestations les plus courantes sont la microcéphalie (caractérisée par une circonférence crânienne inférieure ou égale à la circonférence crânienne moyenne – 2 SD), des calcifications cérébrales, des ventriculomégalies, des arthrogryposes (raideurs et contractures articulaires), ainsi que des manifestations ophtalmologiques telles que des lésions périmaculaires, des atrophies choriorétiniennes, ou des anomalies du nerf optique[142,143].

Une étude menée entre mars 2016 et novembre 2016 aux Amériques a estimé à environ 7% l'incidence des SCZ chez les nourrissons nés de femmes infectées[144]. De plus, ces SCZ surviennent plus fréquemment chez les nourrissons nés de femmes infectées durant le premier trimestre (12,7%) que ceux nés de femmes infectées durant le second ou le troisième trimestre (3,6% et 5,3%, respectivement)[144].

Pour la première fois, un cas de microcéphalie secondaire (microcéphalie post-natale) a également été décrit chez un nourrisson né et allaité par une femme infectée par ZIKV[145]. Le nourrisson est né avec une circonférence crânienne normale (33 cm), et les échantillons de sang prélevés chez la mère et le nourrisson étaient négatifs (date de prélèvement inconnue). A l'âge de 23 jours, la circonférence crânienne de nourrisson n'avait pas évolué (33 cm), et un retard de croissance de celle-ci fût observé à l'âge de 7 mois (40,5 cm). Bien que l'infection ZIKV du nourrisson n'ait pas été confirmée, la détection du génome viral de ZIKV dans le colostrum suggère une potentielle transmission de ZIKV au cours de l'allaitement maternel associée à un retard de développement du SNC. Récemment, une étude a démontré l'occurrence de symptômes neurologiques sur le long-terme[146] et un impact important sur les développements moteur et cognitif, le comportement, ainsi que les compétences à communiquer est aujourd'hui attendu chez les jeunes enfants nés avec un SCZ[147].

Plusieurs mécanismes concomitants seraient impliqués dans le blocage du développement du cortex cérébral, entraînant une réduction du nombre de neurones et l'apparition subséquente de microcéphalies. D'une part, en favorisant la neurogénèse directe au détriment de la neurogénèse indirecte, l'infection ZIKV empêche la différenciation des progéniteurs neuronaux en progéniteurs intermédiaires, empêchant *a fortiori* l'amplification du nombre de neurones finaux par ces progéniteurs intermédiaires[148]. D'autre part, l'infection et la mort cellulaire de ces progéniteurs neuronaux pourrait également être impliquée dans la réduction du nombre de neurones finaux[149]. Enfin, l'apoptose viro-induite des neurones infectés contribuerait également à cette perte neuronale[150]. Alors que l'incidence des SCZ fut remarquablement importante lors de l'épidémie en Amérique Latine en 2015-2016, Yuan et ses collègues ont mis en évidence la présence d'une mutation unique (S139N) dans le génome des souches isolées lors de cette épidémie[151]. Pour la première fois, une mutation unique au sein du gène viral codant pour le précurseur de membrane prM a été démontrée comme nécessaire et suffisante à l'augmentation de l'infection des progéniteurs neuronaux et à l'apparition de microcéphalies chez le modèle murin[151], mettant en lumière un nouveau mécanisme de neurovirulence virale.

Les anormalités du SNC à la naissance suite à une infection congénitale constituent une caractéristique de l'infection ZIKV par rapport aux autres arbovirus, et pourrait justifier une future classification de ZIKV parmi les agents pathogènes TORCH (acronyme anglais réunissant les initiales des agents pathogènes associés à des infections congénitales, parfois sévères)[152].

E. Modèles d'étude de l'infection ZIKV

De par son potentiel épidémiologique important et sa pathogénicité sévère, ZIKV a fait l'objet d'une augmentation exponentielle du nombre de publications scientifiques suite aux dernières épidémies. L'utilisation de modèles d'études *in vitro* et le développement de modèles *in vivo* d'infection par ZIKV ont ainsi permis de mieux comprendre son tropisme cellulaire ainsi que certains mécanismes de transmission, de dissémination virale au sein d'un organisme, et de pathogénicité.

1. Modèles cellulaires

Les modèles d'étude *in vitro* sont essentiels pour étudier le tropisme et le cycle viral, ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à l'apparition d'effets cytopathiques pouvant être à l'origine des symptômes/syndromes observés chez l'Homme (myalgies, arthralgies, vomissements, diarrhées, détresses respiratoires, atteintes neurologiques, atteintes ophtalmologiques, etc.).

• Tropisme cellulaire

L'utilisation *in vitro* de modèles cellulaires a ainsi permis de mettre en évidence le tropisme à large spectre de ZIKV, caractérisé par l'infection productive de nombreux types cellulaires tels que les cellules épithéliales pulmonaires, intestinales, rétiniennes, cutanées, les cellules neurales, les cellules placentaires, musculaires, hépatocytaires, testiculaires, les fibroblastes, les cellules endothéliales, etc[153,154]. De plus, la culture tridimensionnelle de cellules neurales – sous forme d'organoïdes – permit d'apporter les premières réponses quant aux atteintes neurologiques liées à l'infection ZIKV, notamment les microcéphalies[155].

• Franchissement de barrières anatomiques et dissémination virale

Outre son tropisme cellulaire à large spectre, la dissémination généralisée et multi-viscérale de ZIKV chez son hôte résulte également de la capacité du virus à franchir de nombreuses barrières anatomiques. Plusieurs modèles *in vitro* mimant différentes barrières anatomiques ont ainsi permis d'élucider les mécanismes d'invasion virale de certains organes tels que le cerveau, les testicules, ou les yeux (Tableau 2).

Ainsi, l'infection productive des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE) adulte, pourrait autoriser la neuroinvasion virale dans le système nerveux central (SNC) sans altération de sa fonction de barrière[156–158]. Dans le SNC, ZIKV infecte différents types cellulaires tels que les progéniteurs neuronaux, les neurones matures, les cellules microgliales, les oligodendrocytes, ou encore les astrocytes[159]. L'infection de ces derniers, impliqués dans

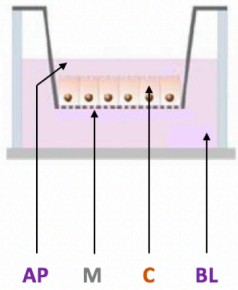
MODÈLE *IN VITRO*	BARRIÈRE	RÉFÉRENCES	CELLULES	CONCLUSIONS
	**Barrière hémato-encéphalique (BHE)**	Mladinich et al (2017)	HBMECs (« human brain microvascular endothelial cells »)	ZIKV infecte les cellules HBMECs et franchit un modèle *in vitro* de BHE **sans altération de fonction de barrière**
		Papa et al (2017)		
		Alimonti et al (2018)	iBECs (« induced brain endothelial cells ») dérivées de cellules souches pluripotentes (iPSC)	ZIKV infecte les cellules iBECs et franchit un modèle *in vitro* de BHE **sans altération de fonction de barrière**
	Barrière hémato-testiculaire (BHT)	Siemann et al (2017)	Cellules de Sertoli (lignée cellulaire humaine et cellules primaires)	ZIKV infecte les cellules de Sertoli et franchit un modèle *in vitro* de BHT **sans altération de fonction de barrière.** L'infection ZIKV des macrophages induit cependant une **altération de la fonction de barrière de la BHT.**
	Barrière hémato-rétinienne (BHR)	Salinas et al (2017)	Cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes dérivées de cellules souches pluripotentes (iPSC)	ZIKV infecte et **altère la fonction de barrière** de l'épithélium pigmentaire rétinien
		Simonin et al (2019)		ZIKV induit une forte réponse inflammatoire dans l'épithélium pigmentaire rétinien et **entraîne sa désorganisation**

Tableau 3. Franchissement de barrières anatomiques par ZIKV

Tableau représentatif des différentes études de franchissement de barrières anatomiques par ZIKV. Celles-ci sont réalisées en utilisant un dispositif expérimental permettant la modélisation *in vitro* de différentes barrières anatomiques. Les cellules d'intérêt (C) sont mises en culture à la surface d'une membrane semi-perméable (M) permettant, à terme, la formation d'un endothélium/épithélium délimitant un compartiment apical (AP) et un compartiment basolatéral (BL). Dans la majorité des cas, les compartiments apical et basolatéral correspondent à la chambre supérieure et inférieure, respectivement.

le maintien de l'imperméabilité de la BHE, pourrait également faciliter le passage de nouveaux virions dans le SNC en induisant une perte d'intégrité de la BHE.

Une étude a démontré que l'infection des cellules de Sertoli, composantes des parois des tubes séminifères, pourrait contribuer au franchissement de la barrière hémato-testiculaire (BHT) par ZIKV[160]. De façon concomitante, les macrophages infectés présents dans l'interstitium testiculaire induiraient la perméabilisation de la BHT via la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires[160]. Dans les testicules, ZIKV infecte donc les cellules de Sertoli et les macrophages, mais aussi les cellules myéloïdes péritubulaires, responsables de l'éjection du sperme hors des testicules, les cellules de Leydig, productrices de testostérone, ainsi que les différents stades de la lignée germinale (spermatogonies, spermatocytes, spermatozoïdes)[161]. L'infection de ces cellules serait à l'origine des altérations du sperme et de la persistance virale dans ce fluide.

De la même façon, l'infection productive de cellules épithéliales de l'épithélium rétinien entraîne une perte d'intégrité de la barrière hémato-rétinienne (BHR), pouvant être à l'origine des nombreuses manifestations ophtalmologiques[162,163].

- Franchissement de barrières anatomiques et transmission virale

Le franchissement de barrières anatomiques peut également être mis en jeu dans le cadre de l'entrée virale chez l'hôte suite à une transmission non vectorielle. Contrairement aux syncytiotrophoblastes, résistants à l'infection ZIKV, les fibroblastes placentaires, les cytotrophoblastes, et les cellules Hofbauer (macrophages placentaires) pourraient jouer un rôle dans la transmission transplacentaire[16,164]. De façon intéressante, une infection ancienne par DENV favoriserait, via les IgG anti-DENV, le franchissement de la barrière hémato-placentaire par ZIKV et l'infection subséquente du fœtus[165–167]. De même, les cellules de l'appareil reproducteur femelle étant permissives à l'infection ZIKV, celles-ci permettent l'entrée virale chez l'hôte suite à une transmission sexuelle. Alors qu'aucune transmission respiratoire de ZIKV n'a été recensée, une étude unique a montré que ZIKV était capable de franchir un modèle *in vitro* d'épithélium du tractus respiratoire supérieur avec une efficacité bien moindre que d'autres arbovirus (JEV, WNV, USUV)[168]. A ce jour, les interactions entre ZIKV et la barrière intestinale dans le cadre de la transmission par allaitement n'ont pas été investiguées.

2. Modèles animaux

Afin d'étudier le tropisme et la dissémination virale à l'échelle de l'organisme, plusieurs modèles *in vivo* d'infection par ZIKV ont été développés. Ces derniers ont permis d'apporter des réponses concernant les mécanismes sous-jacents des transmissions transplacentaire et sexuelle. Basée sur la détection de particules infectieuses ZIKV dans de nombreux fluides biologiques de personnes infectées, l'utilisation de modèles animaux ouvre également de nouvelles perspectives quant à la plausibilité d'autres modes de transmission de ZIKV (voie rectale, voie orale, voie respiratoire).

Historiquement, les premières expériences d'infection ZIKV chez l'animal ont été réalisées chez le singe (macaque rhésus, voie sous-cutanée) et la souris (souris Swiss, voies intracrânienne et intrapéritonéale). Celles-ci permirent alors d'isoler et d'identifier ZIKV comme un nouveau virus. Aujourd'hui, ces deux modèles animaux restent les plus utilisés.

- Utilisation du modèle simien

De par leur proximité avec l'Homme, les primates non humains (PNH) immunocompétents sont susceptibles à l'infection ZIKV et récapitulent l'évolution de l'infection chez l'Homme. Ainsi, des études menées sur des macaques rhésus et cynomolgus ont montré l'apparition de symptômes similaires (rashs, fièvre), le développement d'une virémie (pic entre 2 et 6 jours post-infection) ainsi qu'une dissémination multiviscérale associée à une excrétion virale dans de nombreux fluides biologiques (salive, urine, larmes, sécrétions vaginales). Ces PNH ont également permis de modéliser les transmissions sexuelle et transplacentaire de ZIKV, et confirmer la réplication virale dans l'appareil génital femelle et les dommages neurologiques causés chez le fœtus suite à l'infection congénitale. Enfin, la transmissibilité de ZIKV par voie orale, y compris par sondage gastrique (ou gavage), a été mise en lumière chez les macaques rhésus et cynomolgus[112,113], soulevant certaines questions quant à la transmissibilité de ZIKV par voie orale suite à l'ingestion de lait maternel infectieux.

- Utilisation du modèle murin

L'utilisation des PNH comme modèles animaux étant chère et peu accessible, le modèle murin est aujourd'hui plus utilisé. Cependant, contrairement aux PNH, les souris immunocompétentes sont naturellement résistantes à l'infection ZIKV car la protéine non structurale NS5, qui inhibe la voie interféron chez l'Homme en promouvant la dégradation de STAT2, est incapable de cibler cette même protéine de la voie interféron murine[169]. Par conséquent, la majorité des études effectuées dans le modèle murin ont été réalisées en utilisant des souris immunodéficientes dans la voie interféron (souris IFNAR$^{-/-}$, souris IRF3/IRF7$^{-/-}$, souris IRF3/IRF5/IRF7$^{-/-}$, souris traitées avec des anticorps anti-IFNAR,…)[170]. Parmi les souris IFNAR$^{-/-}$, on peut notamment distinguer les modèles A129 et AG129, correspondant aux lignées murines 129 déficientes en récepteurs aux interférons de type I (A129) et de types I et II (AG129). Ainsi, les mécanismes de transmissions sexuelle et transplacentaire ont largement été étudiés et ont permis de confirmer la pertinence de ces modèles pour l'infection par ZIKV. De façon intéressante, la susceptibilité de souris IFNAR$^{-/-}$ à l'infection par voie intra-anale démontra la capacité de ZIKV à infecter un hôte en franchissant la barrière

intestinale[122]. De plus, la détection de particules virales infectieuses dans les fèces de souris infectées par voie intrapéritonéale confirma la réplication virale dans le tractus gasto-intestinal[122].

Il a également été démontré chez la souris (modèle AG129) que ZIKV pouvait disséminer dans les glandes mammaires et infecter les cellules myoépithéliales[126]. En revanche, bien que l'excrétion de ZIKV dans le lait maternel de ces souris lactantes ait été montrée, la transmission du virus aux souriceaux via l'allaitement n'a pas été mise en évidence.

Enfin, la susceptibilité de plusieurs modèles animaux (cochons d'Inde, PNH) à l'infection ZIKV suite à une exposition intranasale[113] soulève des hypothèses quant au rôle de l'épithélium respiratoire dans l'entrée virale, notamment chez le nouveau-né allaité suite à l'absorption de lait maternel infectieux par les voies respiratoires (« fausses routes » fréquentes chez le nourrisson).

II. LA GLANDE MAMMAIRE ET SON FLUIDE ASSOCIE : LE LAIT MATERNEL

La présence de glandes mammaires constitue aujourd'hui une caractéristique exclusive à la classe des Mammifères. Contrairement à d'autres organes, celles-ci se développent à la fois avant et après la naissance, et les nombreux remodelages structuraux et fonctionnels au cours de la vie de la femelle des Mammifères font de celles-ci, de façon intéressante, un organe très dynamique. En tant que glandes exocrines, leur fonction principale est de produire et d'excréter le lait maternel, fluide biologique riche en nutriments et en facteurs immunologiques permettant la nutrition, le développement, et la protection du nourrisson via l'allaitement. Cependant, dans l'espèce humaine, lorsqu'une femme est infectée par un agent pathogène, certains d'entre eux peuvent être transmis au nouveau-né via le lait maternel, rendant ainsi la pratique de l'allaitement maternel contre-indiquée dans certains cas.

A. Architecture de la glande mammaire : de l'organe à la cellule

1. Organisation générale

Les glandes mammaires sont constituées d'une structure épithéliale ancrée dans une masse de tissu conjonctif fibro-adipeux, le stroma mammaire. Différenciée et mature, la structure épithéliale est composée de deux entités structurales distinctes : les alvéoles mammaires, unité productrices et sécrétrices de lait, et le réseau de canaux lactifères ou galactophores, permettant le transport du lait des alvéoles vers le mamelon.

- La glande mammaire humaine

Au nombre de deux, les glandes mammaires humaines sont inclues dans les seins, structures hémisphériques thoraciques maintenues au niveau de la poitrine par les ligaments de Cooper.

Chaque sein comporte une aréole pigmentée au centre de laquelle l'ouverture du tissu mammaire est marquée par une protubérance, le mamelon (ou téton). Turgescente lors de l'allaitement maternel, celle-ci facilite notamment la tétée du sein par le nourrisson.

D'un point de vue interne, plusieurs canaux lactifères primaires divergent à partir du mamelon et se dilatent en chambres d'environ 2-4 mm de diamètre, les sinus galactophores. Par élongation et invasion dans le stroma mammaire, ces canaux lactifères primaires se ramifient en canaux lactifères secondaires et tertiaires, formant plusieurs lobes et lobules (Figure 13A). Chaque glande mammaire humaine est composée d'une vingtaine de lobes, eux-mêmes constitués de 20 à 40 lobules, disposés de façon radiale autour du mamelon (Figure 13B). Lors de la gestation, les extrémités de chaque canal lactifère se différencient en unités sécrétrices de lait, les alvéoles mammaires. Après l'accouchement, celles-ci produisent et sécrètent le lait maternel, chaque lobule étant alors constitué d'une centaine d'alvéoles mammaires.

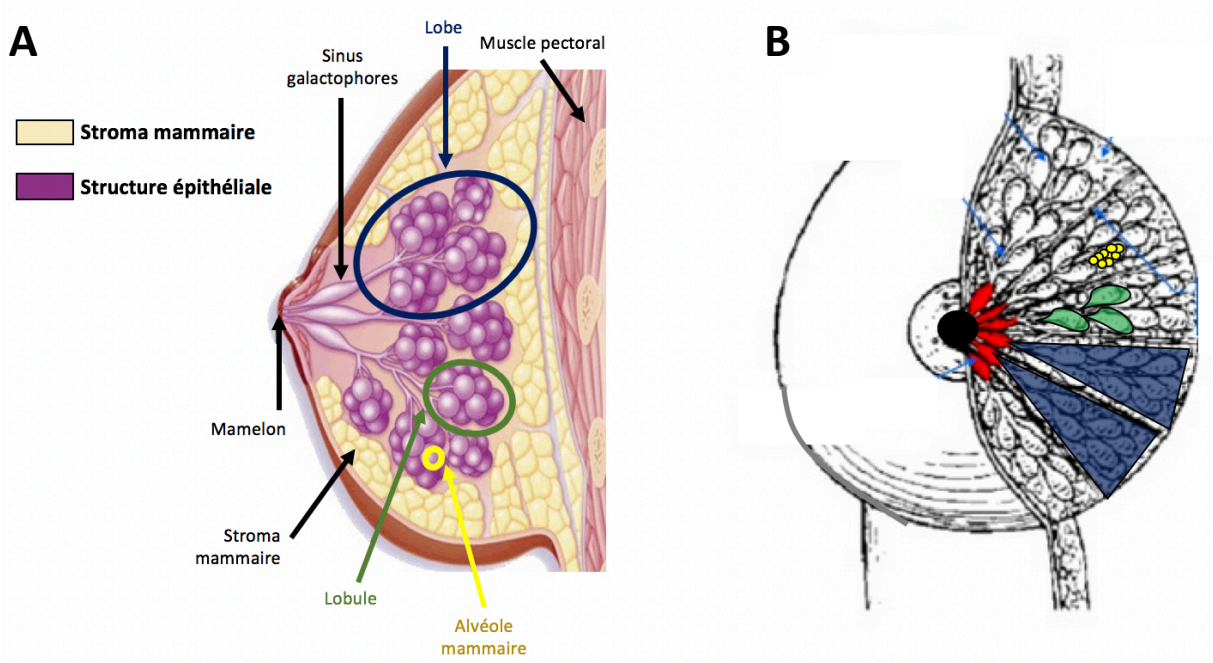


Figure 13. Organisation générale de la glande mammaire humaine

(A) Coupe schématique d'un sein humain en phase de lactation. Les glandes mammaires humaines ont une structure épithéliale de nature glandulaire. Celle-ci est constituée d'une vingtaine de lobes (cercle bleu) constitués d'une quarantaine de lobules (cercle vert). En période de gestation, la structure épithéliale se différencie et chaque lobule comporte une centaine d'alvéoles mammaires (cercle jaune), unités productrices et sécrétrices de lait maternel. **(B)** Une vingtaine de canaux lactifères directement connectés au mamelon (noir) se dilatent en sinus galactophores (rouge), et se ramifient en formant des lobes mammaires (bleus) disposés de façon radiale autour du mamelon. Ceux-ci de divisent en lobules (vert) et en alvéoles mammaires (jaune).

La glande mammaire constitue un organe unique de par le remodelage dynamique de la structure épithéliale selon le contexte hormonal et les besoins du nourrisson (allaitement). En effet, rudimentaire à la naissance, la glande mammaire se développe au cours de la puberté en un organe mature et fonctionnel. La fonction de la glande mammaire étant de produire du lait maternel afin de répondre aux besoins du nourrisson, celle-ci se différencie en organe sécréteur au cours de la gestation, où les alvéoles mammaires se développent. Celles-ci produisent du lait maternel sous l'influence de la tétée par le nourrisson, au cours de la lactation. En absence de tétée, la glande mammaire régresse et revient à son état pré-gestation, c'est l'involution.

- Comparaisons Homme/souris

Bien que communes aux Mammifères, les glandes mammaires se présentent sous différentes formes selon les espèces. De plus, leur nombre varie et dépend souvent du nombre de progénitures par portée. Eu égard aux modèles murins d'infection utilisés dans de nombreuses études dont cette présente, il semble important de préciser les différences observées entre l'Homme et la souris.

Contrairement à l'Homme, la structure épithéliale des glandes mammaires murines ne s'organise pas en lobes ou lobules. Celles-ci adoptent une organisation plutôt canalaire, leur conférant un aspect relativement plat contrairement à l'aspect hémisphérique des seins humains (Figure 14).

De plus, une paire unique de glandes mammaires est présente chez l'Homme. En revanche, cinq paires coexistent chez la souris, numérotées de 1 à 5 selon un axe cranio-caudal : une paire cervicale (paire n°1), deux paires thoraciques (paires n°2 et 3), une paire abdominale (paire n°4), et une paire inguinale (paire n°5) (Figure 15). De façon intéressante, les glandes mammaires abdominales et inguinales sont plus sensibles aux hormones et produisent plus de lait que les glandes mammaires cervicales et thoraciques, mettant en évidence un gradient de différenciation des glandes mammaires murines selon un axe cranio-caudal[171].

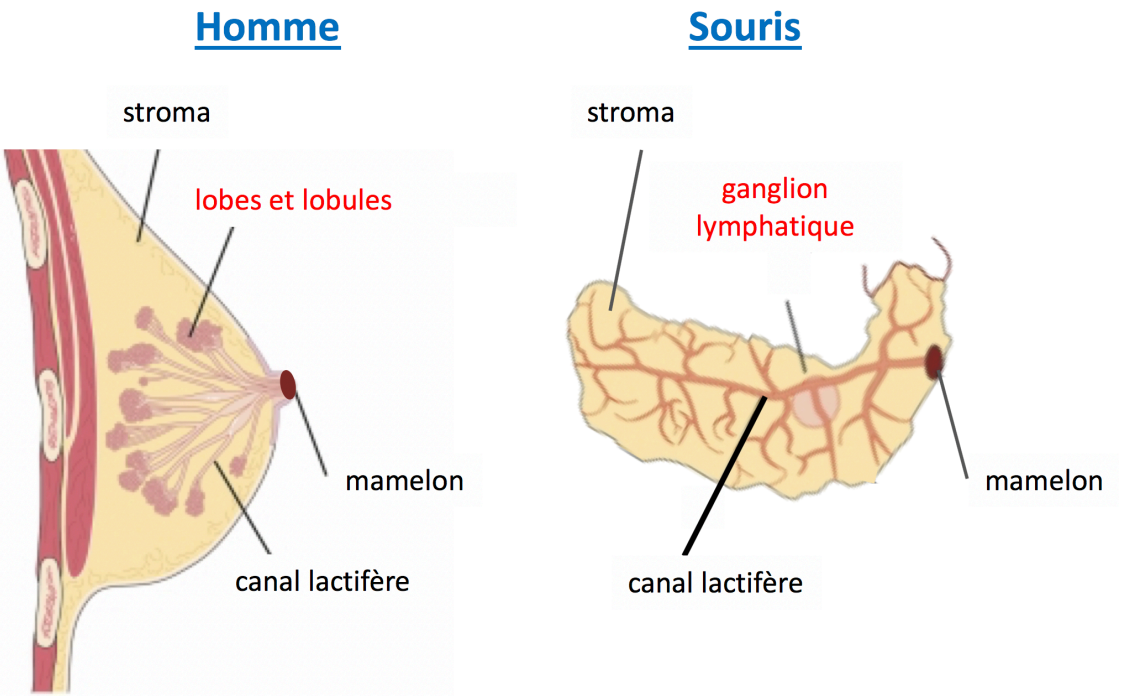


Figure 14. Représentations schématiques des glandes mammaires humaine et murine

Chez l'Homme (gauche), à partir du mamelon, les canaux lactifères se ramifient dans le stroma et forment des lobes puis des lobules, résultant en une structure globulaire des glandes mammaires. Chez la souris (droite), la ramification des canaux lactifères reste canalaire. Un ganglion lymphatique est également présent dans certaines paires de glandes mammaires murines.
Adapté de Visvader J, 2009.

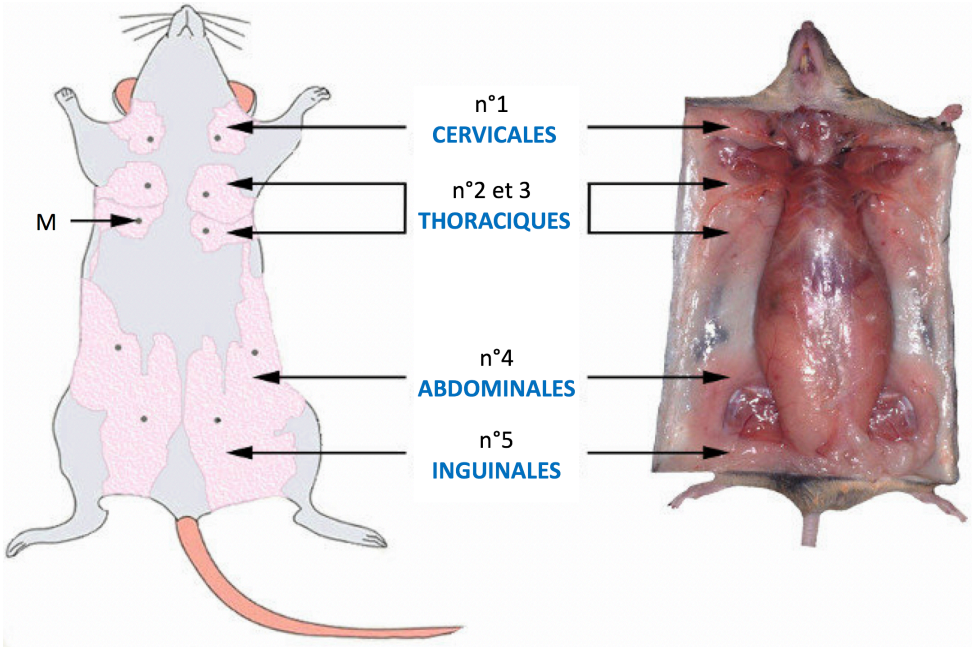


Figure 15. Localisation anatomique des glandes mammaires murines

Vue ventrale des cinq paires de glandes mammaires murines, numérotées de 1 à 5 selon un axe cranio-caudal. M : mamelon. Adapté de Honvo-Houéto et collègues, 2015.

Enfin, la composition du stroma mammaire dans lequel est ancrée la structure épithéliale est légèrement différente: plutôt fibreux chez l'Homme, celui-ci est plus riche en adipocytes chez la souris[172].

En dépit de ces disparités, la diversité cellulaire ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires régissant le développement et le fonctionnement des glandes mammaires sont conservés entre les deux espèces. Ces similarités permettent ainsi l'utilisation de la souris comme modèle d'étude et l'extrapolation à l'Homme d'un certain nombre de processus étudiés dans ce modèle.

- Diversité cellulaire de la glande mammaire

Comme la plupart des organes, les glandes mammaires sont composées de différentes populations cellulaires (cellules souches, cellules épithéliales, fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales, cellules immunitaires, cellules neurales) permettant la structure et le fonctionnement normal de l'organe[173]. Alors que les cellules épithéliales forment la structure épithéliale, ramifiée et sécrétrice de lait, les fibroblastes et les adipocytes constituent le stroma mammaire. Les cellules endothéliales, immunitaires, et neurales sont principalement impliquées dans la vascularisation, le drainage lymphatique, et l'innervation des glandes mammaires, nécessaires pour leur développement et leur fonctionnement.

2. La structure épithéliale

- L'épithélium mammaire

L'épithélium mammaire délimite la structure épithéliale de la glande mammaire et la sépare du stroma. Il compose les parois des canaux lactifères et, en période de lactation, forme les alvéoles mammaires. Bien que l'organisation de l'épithélium mammaire varie entre les canaux lactifères et les alvéoles mammaires, sa composition générale est commune aux deux structures.
En effet, l'épithélium mammaire est constitué de deux couches cellulaires liées entre elles par des jonctions intercellulaires : une couche interne au contact du lumen des alvéoles

mammaires et des canaux lactifères, et une couche externe reposant sur une lame basale au contact du stroma mammaire (Figure 16). La lame basale, mesurant environ 100 nm d'épaisseur et principalement constituée de fibres de collagène IV, de polymères de lamines, et de protéoglycanes[174], soutient l'épithélium mammaire.

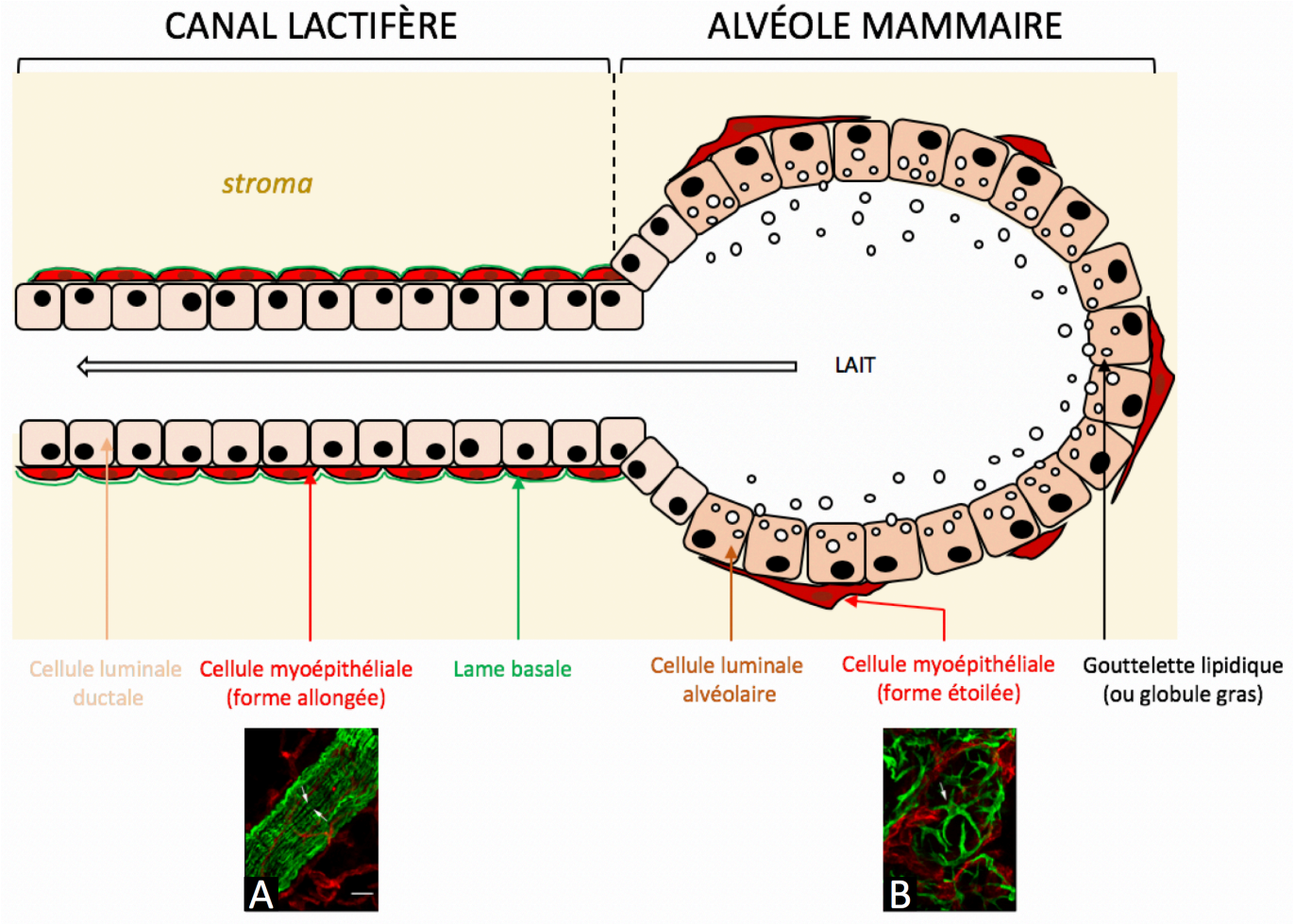


Figure 16. L'épithélium mammaire

Coupe schématique des deux entités structurales constituant la structure épithéliale mammaire : le canal lactifère (à gauche) et l'alvéole mammaire (à droite). L'épithélium mammaire de ces deux entités structurales est constitué de deux couches cellulaires : une couche interne de cellules luminales (beige) et une couche externe de cellules myoépithéliales (rouge) reposant sur une lame basale (vert). Au niveau des canaux lactifères, les cellules myoépithéliales sont de forme allongée et l'épithélium mammaire est bistratifié (photo A, flèches blanches). Au niveau des alvéoles mammaires, les cellules myoépithéliales sont de forme étoilée et l'épithélium mammaire est alors pseudostratifié (photo B, flèche blanche).

- La couche interne de l'épithélium mammaire : les cellules luminales

La couche épithéliale interne est constituée de cellules luminales. Ces cellules, d'aspect cuboïde, sont polarisées et liées entre elles par des jonctions serrées, délimitant un pôle apical et un pôle basolatéral. Alors que leur pôle apical est orienté vers le lumen des canaux lactifères ou des alvéoles mammaires, leur pôle basolatéral interagit avec les cellules myoépithéliales sous-jacentes via les desmosomes. Ces cellules expriment les cytokératines 8/18 et 19, ainsi que certains marqueurs tels que MUC1, CD24, et le facteur de transcription GATA3. Certaines sous-populations de cellules luminales expriment également les récepteurs hormonaux aux estrogènes, à la progestérone, et à la prolactine.

Selon la structure épithéliale, deux types de cellules luminales coexistent : les cellules luminales ductales et les cellules luminales alvéolaires. Ces cellules tapissent les parois internes des canaux lactifères et des alvéoles mammaires, respectivement. Ainsi, en période de lactation, seules les cellules luminales alvéolaires ont pour fonction principale de produire et sécréter le lait maternel. Celles-ci sont caractérisées par l'expression supplémentaire de protéines du lait telles que la β-caséine ou la WAP (« whey acidic protein », en anglais), ainsi que par la présence de gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme. D'un point de vue morphologique, ces gouttelettes lipidiques cytoplasmiques leur confèrent un aspect plus gros par rapport aux cellules luminales ductales (Figure 16).

- La couche externe de l'épithélium mammaire : les cellules myoépithéliales

La couche épithéliale externe est constituée de cellules myoépithéliales. Celles-ci expriment de nombreux marqueurs épithéliaux de type basal comme les filaments intermédiaires de type cytokératines 5, 14, et 17, ainsi que le facteur de transcription p63[172]. Les cellules myoépithéliales ont deux fonctions principales : assurer le maintien de la structure épithéliale dans le stroma mammaire, et permettre l'éjection du lait maternel depuis son site de production jusqu'au mamelon pendant la tétée. De par leur emplacement intermédiaire entre la couche cellulaire luminale et la membrane basale, les cellules myoépithéliales synthétisent de nombreux composants de la lame basale et assurent la cohésion interne de l'épithélium mammaire mature. En effet, celles-ci expriment plusieurs molécules d'adhérence telles que la cadhérine P et les cadhérines de desmosome de type Dsc-3 (desmocolline-3) et Dsg-3

(desmogléine-3), permettant la mise en relation des cellules myoépithéliales avec les cellules luminales ainsi que la lame basale via les desmosomes et les hémidesmosomes, respectivement[172]. Les interactions entre les cellules myoépithéliales et la lame basale sont également renforcées par l'expression de plusieurs dimères d'intégrines, jouant le rôle de récepteurs des composants de la lame basale : α1β1 et α2β1 (récepteurs aux collagènes), α5β1, αVβ3 (récepteurs aux fibronectines), α3β1, α6β1, et α6β4 (récepteurs aux lamines)[172].

De façon intéressante, les cellules myoépithéliales matures ont la propriété d'être contractiles. Celles-ci expriment plusieurs protéines impliquées dans la contraction musculaire, telles que l'actine du muscle lisse α-SMA (« α-smooth muscle actin », en anglais), la myosine du muscle lisse, et la calponine. En réponse à l'ocytocine, produite au cours de l'allaitement, les cellules myoépithéliales exercent ainsi des contractions synchronisées au niveau des alvéoles mammaires, permettant l'éjection du lait maternel des alvéoles mammaires, sites de production du lait, vers les canaux lactifères et le mamelon.

L'organisation du myoépithélium diffère dans les canaux lactifères et les alvéoles mammaires[172] (Figure 16). Au niveau des canaux lactifères, les cellules myoépithéliales adoptent une forme allongée et forment une monocouche cellulaire continue, assurant le maintien et la cohésion de l'épithélium mammaire dans le stroma. En revanche, au niveau des alvéoles mammaires, les cellules myoépithéliales adoptent une forme étoilée et ne couvrent pas l'intégralité de la couche cellulaire luminale (Figure 16). Cette morphologie cellulaire autorise les contacts entre les cellules luminales et les vaisseaux sanguins au moment de la lactation, et facilite l'éjection du lait des alvéoles mammaires médiée par les contractions cellulaires.

Alors que la composition de l'épithélium mammaire était bien caractérisée, il a plus tard été démontré que la couche externe de l'épithélium mammaire abritait également des cellules souches, capables de se différencier à la fois en cellules luminales et en cellules myoépithéliales[175–177].

3. Le stroma mammaire, allié indispensable de la structure épithéliale

Le stroma mammaire est le tissu conjonctif au sein duquel est ancrée la structure épithéliale. De façon intéressante, sa composition varie selon les espèces et s'organise de façon adaptée à la structure épithéliale. Ainsi, l'arborescence de la structure épithéliale des glandes

mammaires humaines étant plus ramifiée que chez la souris, le tissu fibreux présent entre les canaux et les structures globulaires (lobes et lobules) prédomine sur le tissu adipeux. De plus, les différents types cellulaires présents dans les glandes mammaires sont responsables de la production de divers constituants de la matrice extracellulaire nécessaire, entre autres, au maintien de la structure épithéliale. Celle-ci est organisée selon trois niveaux : la lame basale (soutenant l'épithélium mammaire et constituée de lamines, collagène IV, nidogène, proéoglycanes), le stroma intra- et inter-lobulaire (adjacent à la lame basale et constitué de fibres de collagène, fibronectine, tenascine, et d'autres protéoglycanes), et le tissus fibreux (permettant le maintien global et l'élasticité du tissu mammaire et constitué de fibres élastiques)[178].

Outre le maintien de la structure épithéliale, le stroma mammaire est également indispensable au développement de celle-ci. En effet, des expériences de transplantations ont démontré l'importance de la nature du stroma dans la détermination de l'architecture de la structure épithéliale. Ainsi, lorsque des cellules épithéliales de glandes salivaires sont injectées dans un stroma mammaire, celles-ci forment une architecture de type mammaire[173]. A l'inverse, lorsque des cellules épithéliales mammaires sont injectées dans un stroma salivaire, la structure épithéliale formée, bien que d'origine mammaire, est similaire à celle retrouvée dans les glandes salivaires[173]. En particulier, lors de la puberté, le stroma mammaire communique avec la structure épithéliale afin de permettre sa morphogénèse.

Essentiellement composé de fibroblastes et d'adipocytes, le stroma mammaire est également composé de cellules endothéliales, immunitaires, et nerveuses permettant la vascularisation, le drainage lymphatique, et l'innervation de la structure épithéliale, nécessaires au bon développement et fonctionnement de la glande mammaire.

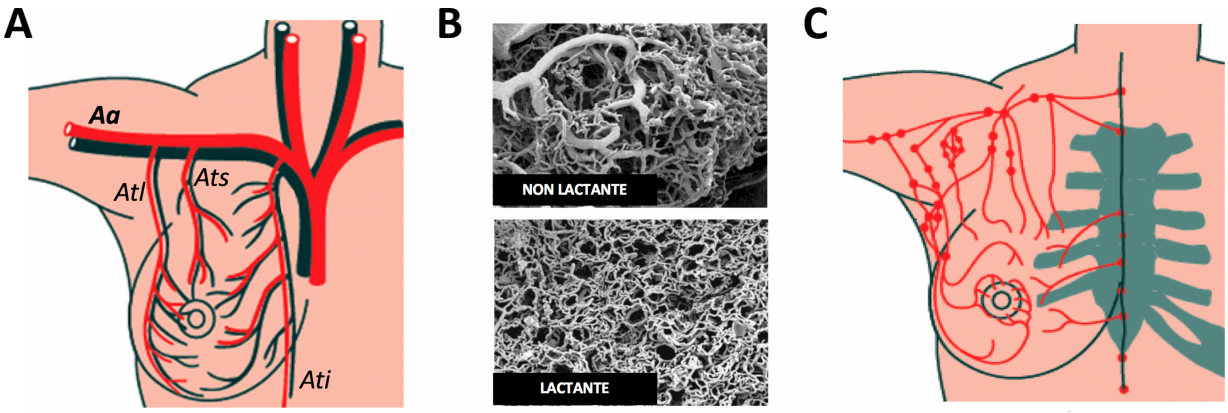


Figure 17. Vascularisation et drainage lymphatique de la glande mammaire

(A) Organisation de la vascularisation de la glande mammaire. L'irrigation de la glande mammaire est assurée par les ramifications de l'artère axillaire (Aa) en artères thoraciques latérale (Atl), supérieure (Ats) et interne (Ati). Cette dernière se ramifie en artères intercostales, dont seules les artères intercostales n°2 et 4 irriguent la glande mammaire. **(B)** Micrographes électroniques à balayage de moulages de la vascularisation des glandes mammaires murines non lactantes (haut) et lactantes (bas). Par perfusion sanguine, les vaisseaux sanguins ont été imprégnés d'une résine liquide de méthacrylate. Après durcissement, le tissu mammaire est extrait et dissout par une solution d'hydroxyde de potassium (KOH), révélant le moulage solidifié de la vascularisation mammaire, plus dense au cours de la lactation. Adapté de Djonov V. et collègues (2001) **(C)** Organisation générale de la complexité du réseau lymphatique drainant la glande mammaire. Les vaisseaux et les ganglions lymphatiques sont représentés par des traits et des cercles rouges pleins, respectivement.

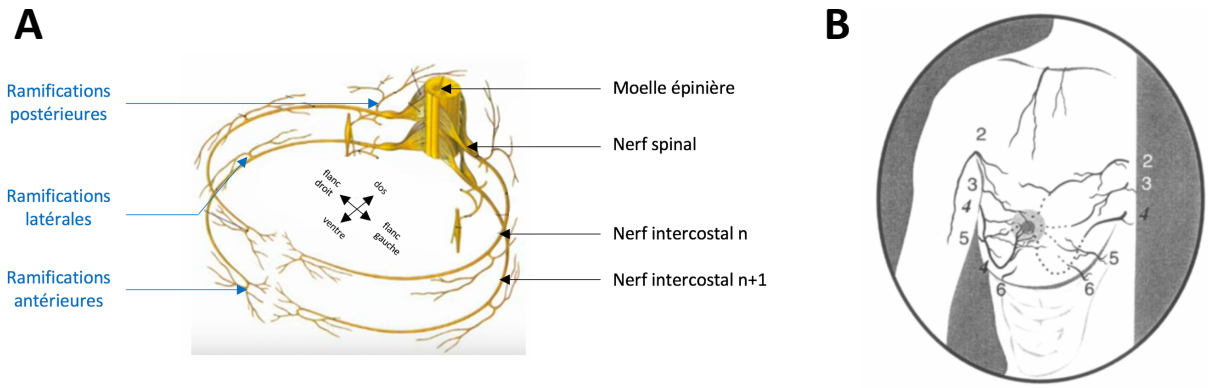


Figure 18. Innervation de la glande mammaire

(A) Organisation du système nerveux périphérique débouchant de la moelle épinière dans la région du sein. Plusieurs nerfs spinaux débouchent de la moelle épinière. Parcourant la région entre les côtes, ces nerfs sont alors appelés nerfs intercostaux, et son numérotés selon un axe rostro-caudal. A partir de ces derniers, plusieurs ramifications permettent l'innervation de différentes régions du corps (ramifications postérieures, latérales, et antérieures). **(B)** Les glandes mammaires humaines sont innervées par les ramifications latérales et antérieures des nerfs intercostaux n°2 à 6. Il est à noter que seul le mamelon est innervé. Adapté de Sarhadi et collègues (1996).

4. Vascularisation, drainage lymphatique, innervation

- Vascularisation

Comme tout organe, les apports en nutriments et en oxygène sont indispensables au bon fonctionnement de la glande mammaire. La vascularisation des glandes mammaires permet l'irrigation sanguine de la structure épithéliale. Celle-ci est assurée par des capillaires sanguins issus des ramifications des artères thoraciques latérale, supérieure et interne (Figure 17A). Au niveau des canaux lactifères et des alvéoles mammaires, la vascularisation mammaire varie selon les besoins de la structure épithéliale et se développe essentiellement pendant la puberté, la gestation, et la lactation. Durant ces phases, le contexte hormonal promeut en effet la synthèse du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF (« vascular endothelium growth factor », en anglais), impliqué dans l'angiogenèse[179]. Dans la glande mammaire lactante, les alvéoles mammaires sont ainsi enveloppées d'un réseau de capillaires sanguins larges et organisés de façon sinusoïdale, permettant le ralentissement du flux sanguin et l'augmentation des échanges entre les cellules épithéliales mammaires et la circulation sanguine au cours de la lactation (Figure 17B)[180,181]

Puis, de façon concomitante à l'involution de la structure épithéliale mammaire, la vascularisation de cette dernière régresse et reprend sa configuration initiale 10 jours après l'interruption de la lactation[11].

- Drainage lymphatique

De façon juxtaposée au réseau sanguin, le système lymphatique draine l'intégralité de la glande mammaire (Figure 17C). Notamment au cours de la lactation, celui-ci complète le rôle des vaisseaux sanguins en assurant l'approvisionnement des cellules épithéliales en certains facteurs et en eau, ainsi que l'élimination des excès de liquide interstitiel et des métabolites des cellules épithéliales et stromales. De par leur lien avec les ganglions lymphatiques, les vaisseaux lymphatiques permettent également l'élimination des agents pathogènes et servir d'intermédiaires entre l'épithélium mammaire et les cellules immunitaires, essentielles au bon développement et fonctionnement de la glande mammaire[182].

Chez la souris, les glandes mammaires abdominales (paire n°4) se distinguent par la présence d'un ganglion lymphatique (ganglion lymphatique inguinal) au sein même du tissu mammaire.

- Innervation

Enfin, la glande mammaire est également innervée.

A partir de la moelle épinière, le nerf spinal se divise en plusieurs nerfs intercostaux, parcourant la membrane localisée entre les côtes (Figure 18A). Afin d'innerver plusieurs organes, chaque nerf intercostal se ramifie en plusieurs branches, telles que les branches latérales (provenant d'une région intercostale localisée au niveau d'un flanc) ou les branches antérieures (provenant d'une région intercostale localisée au niveau du sternum) (Figure 18A). Les seins humains étant centrés au niveau thoracique du tronc humain, ce sont les nerfs intercostaux n°2 à 6 qui innervent les glandes mammaires humaines, et plus particulièrement le mamelon[183] (Figure 18B).

Lors de l'allaitement maternel, la stimulation du mamelon par la tétée entraîne un signal nerveux, véhiculé au système nerveux central via les nerfs innervant les glandes mammaires, permettant en retour la libération d'ocytocine nécessaire à l'éjection du lait.

B. Dynamique de la glande mammaire adulte

Comme mentionné dans la section « Architecture de la glande mammaire, de l'organe à la cellule », le développement des glandes mammaires a lieu à la fois avant et après la naissance. Alors qu'une ébauche rudimentaire se forme au cours du développement embryonnaire, celle-ci se développe essentiellement au cours de la puberté sous l'influence du système hormonal (Figure 19). Puis, à l'âge adulte, la glande mammaire se distingue des autres organes par sa capacité d'adaptation selon les besoins de la progéniture et son remodelage avant et après la lactation. En effet, celle-ci se différencie en organe sécréteur au cours de la gestation afin de répondre aux besoins du nourrisson et d'exercer sa fonction première de production et de sécrétion de lait maternel au cours de la lactation. Lorsque cette dernière est stoppée, la production de lait s'arrête, et la structure épithéliale retrouver sa forme initiale et quiescente lors de l'involution.

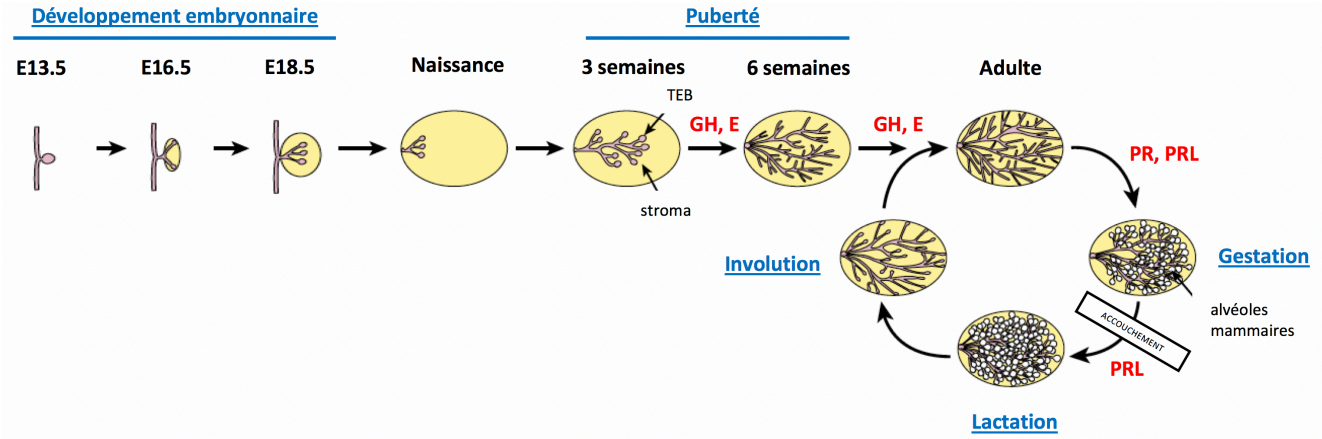


Figure 19. Évolution de l'architecture de la glande mammaire au cours de la vie
Au cours du développement embryonnaire, des amas de cellules épithéliales présents au niveau de l'épiderme se développent dans le mésenchyme sous-jacent, donnant naissance à des bourgeons mammaires – les placodes – puis à une structure épithéliale arborescente rudimentaire. Au cours de la puberté, sous l'effet de l'hormone de croissance (GH) et des estrogènes (E), celle-ci se développe par la prolifération des extrémités des canaux lactifères, appelées TEBs (« terminal end buds », en anglais), résultant en l'invasion du stroma mammaire par les canaux lactifères. À l'âge adulte, la structure épithéliale a envahi l'intégralité du stroma mammaire. Lors de la gestation, l'action synergique de la progestérone (PR) et de la prolactine (PRL) permet la différenciation lobulo-alvéolaire de la structure épithéliale, résultant en la formation d'alvéoles mammaires. Unités productrices et sécrétrices de lait, celles-ci produisent le lait maternel après l'accouchement au cours de la lactation. Suite à l'arrêt de la tétée, la lactation est interrompue, provoquant l'involution de la structure épithéliale.
Adapté de Visvader et collègues (2014)

1. Gestation

Au cours de la gestation, la glande mammaire se transforme en un organe complètement mature et différencié afin de permettre la production et la sécrétion de lait lors de l'allaitement maternel. Cette maturation s'effectue en deux étapes . Dans un premier temps, la formation de branches épithéliales latérales et de bourgeons alvéolaires, futurs sites de production et de sécrétion de lait maternel, est induite par la progestérone afin d'étendre la surface de l'épithélium mammaire. Puis, l'action synergique de la progestérone et de la prolactine entraîne la différenciation lobulo-alvéolaire des cellules luminales en cellules productrices de lait au niveau des bourgeons alvéolaires, devenus alvéoles mammaires.

La progestérone, sécrétée par les ovaires, est seule responsable des ramifications latérales des canaux lactifères en début de gestation. Des souris déficientes en récepteurs de progestérone *Pgr*$^{-/-}$présentent des glandes mammaires peu développées et ne subissent, par la suite, pas de différenciation alvéolaire[185]. Des expériences de transplantation mammaire ont également démontré que seule l'expression du récepteur PGR à la surface des cellules épithéliales, mais pas des cellules stromales, était requise pour la ramification des canaux lactifères[186]. Deux isoformes du récepteur PGR existent : PGR-A et PGR-B. Bien que l'isoforme PGR-A soit majoritaire dans les glandes mammaires, c'est l'isoforme PGR-B qui est responsable de l'effet de la progestérone sur les ramifications des canaux lactifères et la formation des alvéoles mammaires[187]. Ainsi, l'interaction entre la progestérone et le récepteur PRG-B à la surface des cellules luminales induit l'expression de la protéine RANKL, impliquée dans l'induction de la voie NF-κB et de la prolifération cellulaire. Étant donné que l'expression de PGR-B n'est pas ubiquitaire à l'intégralité de la population cellulaire luminale, il est supposé que RANKL peut agir de façon paracrine sur les cellules adjacentes et induire ainsi la prolifération cellulaire des cellules n'exprimant pas PGR-B. De plus, en réponse à la progestérone, la stimulation de la croissance des branches latérales et bourgeons alvéolaires ainsi que la formation et le maintien de ces structures sont également induites suite à l'expression de Wnt-4 et de la cycline D1, respectivement.

La différenciation des cellules luminales alvéolaires et la maturation de la glande mammaire sont majoritairement permises par la prolactine. Sécrétée par la glande pituitaire, la prolactine induit l'expression du facteur de transcription ELF5, impliqué dans la différenciation des cellules luminales alvéolaires[188]. Celle-ci se fixe à son récepteur PRLR, active la voie Jak/STAT, et induit l'expression de plusieurs protéines du lait telles que la caséine β et la protéine WAP[184]. L'absence d'alvéoles mammaires dans l'arborescence épithéliale des glandes mammaires de souris *Prl*$^{-/-}$, *Prlr*$^{-/-}$, *Jak2*$^{-/-}$, et *Stat5*$^{-/-}$ permirent de définir la voie Jak2/STAT5 comme la principale voie de signalisation induite par l'interaction entre la prolactine et son récepteur PRLR à la surface des cellules luminales[184].

La progestérone et la prolactine agissent ainsi en concert afin de promouvoir la ramification latérale des canaux lactifères, la formation de bourgeons alvéolaires, et la différenciation des cellules luminales en cellules productrices de lait alvéolaires. En fin de gestation, la structure épithéliale mammaire, extrêmement ramifiée et remplissant la totalité du stroma mammaire, est riche en alvéoles mammaires, unités productrices et sécrétrices de lait.

2. Lactation

La lactation constitue la phase durant laquelle les alvéoles mammaires produisent et sécrètent le lait maternel. Cette phase fait suite à la lactogénèse, ou production de lait, qui se déroule en deux étapes : la lactogénèse I et la lactogénèse II.

La lactogénèse I, ou différenciation sécrétoire, a lieu pendant la gestation. Celle-ci se caractérise par la différenciation lobulo-alvéolaire de la structure épithéliale sous l'action de la prolactine[184]. Alors que la prolactine est sécrétée par la glande pituitaire, une production locale au niveau de la glande mammaire est également induite par l'activation de la voie PI3K/Akt en fin de gestation[189], permettant l'amplification de la synthèse de différents constituants du lait. Cependant, cette production reste limitée par les niveaux élevés de progestérone. En effet, alors que l'interaction entre certains glucocorticoïdes et leur récepteur, exprimé par les cellules luminales, permet la translocation de ce dernier dans le noyau et l'activation, en synergie avec la prolactine, de l'expression des protéines de lait, la progestérone entre en compétition avec les glucocorticoïdes, bloquant ainsi cet effet synergique[190]. A la naissance, l'éjection du placenta, producteur de progestérone, induit l'effondrement du taux de progestérone aboutissant au lever de l'inhibition de la production de lait et à l'initiation de la lactogénèse II, ou activation sécrétoire. L'activation sécrétoire apparaît entre 30 et 40h après la naissance chez l'Homme, et se caractérise par une production massive de protéines du lait associée à la sécrétion du lactose et des lipides. De plus, la chute des niveaux de progestérone est associée à la fermeture des jonctions serrées par l'épithélium mammaire, le rendant ainsi plus imperméable au passage paracellulaire de protéines sériques et de cellules immunitaires circulantes[191].

Le fluide biologique produit durant les premières 48h après la naissance est nommé colostrum. L'épithélium mammaire étant perméable, le colostrum est ainsi riche en facteurs sanguins. Suite aux effets de la chute de progestérone et à la mise en place de l'activation sécrétoire, le colostrum s'enrichit en lactose et en lipides afin de devenir plus copieux, devenant alors lait mature. Alors que l'épithélium mammaire est imperméable, le lait mature comporte moins de cellules immunitaires maternelles.

Chez la souris, la lactation dure environ 3 semaines. Chez l'Homme, l'OMS recommande un allaitement exclusif d'une durée de 6 mois, suivi de l'introduction d'une alimentation diversifiée en parallèle à l'allaitement jusqu'à l'âge de 2 ans ou plus.

L'entretien de la lactation, ou galactopoïèse, est assuré par l'action coordonnée de la prolactine et de l'ocytocine, agissant sur la production et l'éjection du lait, respectivement. En revanche, ce processus est stoppé lorsque l'allaitement est interrompu, aboutissant à une régression de la glande mammaire et un retour de l'architecture au stade pré-gestationnel.

3. Involution

Lorsque l'allaitement maternel est interrompu, la structure épithéliale différenciée de la glande mammaire régresse et retrouve une morphologie post-pubertaire et pré-gestationnelle. Ce stade, nommé involution, démontre la plasticité de la glande mammaire et l'adaptabilité de la structure épithéliale aux besoins physiologiques du nourrisson en termes de lait maternel. L'involution de la glande mammaire a lieu en deux étapes[184].

Lors de la première étape de l'involution mammaire, l'arrêt de la tétée provoque l'accumulation de lait maternel dans les alvéoles mammaires qui, au bout de 3 à 6h, entraîne la mort cellulaire des cellules luminales alvéolaires et leur détachement dans le lumen[184]. En effet, la déphosphorylation de STAT5 suite à l'accumulation de lait dans les alvéoles entraîne une diminution de la sensibilité des cellules à la prolactine. De plus, la surexpression de STAT3, qui antagonise STAT5, inhibe la prolifération et la survie cellulaire et induit l'apoptose des cellules luminales alvéolaires[184]. La première phase involutive étant réversible, la production de lait maternel reprend lors de la reprise de la tétée.

Au bout de 48h d'accumulation de lait, la seconde phase de l'involution mammaire débute. Cette dernière est irréversible, et est caractérisée par l'apoptose massive des cellules luminales alvéolaires ainsi que d'importants remodelages du stroma mammaire proche des alvéoles. En effet, l'activation du plasminogène en plasmine par la sérine-protéase KLK1 locale perturbe les interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire, entraînant l'apoptose des cellules luminales alvéolaires[184]. De plus, la surexpression de certaines métalloprotéinases de matrice telles que MMP2 et MMP3 et la libération de ces dernières de leurs inhibiteurs induisent la dégradation de la lame basale[184]. Suite à la destruction de la structure épithéliale, les adipocytes se développent et envahissent l'espace préalablement occupé par cette

dernière. De la même façon, la vascularisation s'adapte au microenvironnement et régresse lorsque la structure épithéliale est détruite[180]. L'un des mécanismes associés à l'involution des vaisseaux sanguins est l'expression, sous le contrôle de STAT3, de la cathépsine D par les cellules épithéliales mammaires. Appartenant à la famille des pepsines, la cathépsine D clive la prolactine en fragments peptidiques aux propriétés antiangiogéniques, appelés vasoinhibines[180].

La structure épithéliale de la glande mammaire restera ainsi quiescente jusqu'à l'avènement d'une nouvelle gestation.

C. Le lait maternel

Le lait maternel est le produit de sécrétion des glandes mammaires différenciées et matures. Ce fluide biologique, excrété uniquement après l'accouchement, constitue l'aliment de base du nourrisson. Celui-ci est constitué de divers composants nécessaires à la nutrition, au développement, et à la protection du nourrisson, tels que des protéines, des glucides, des lipides, des sels minéraux, des vitamines, des facteurs de croissance, des immunoglobulines, des cytokines, et des cellules maternelles (cellules immunes et non immunes). Tous ces composants sont synthétisés *de novo* par les cellules luminales alvéolaires au cours de la lactation ou dérivent de la circulation sanguine maternelle. Ainsi, en cas d'infection, l'agent étiologique peut également être excrété dans le lait maternel et être transmis au nourrisson allaitant.

1. Production et éjection du lait maternel

- Biosynthèse

La production du lait maternel, également appelée lactogénèse, s'effectue en deux étapes : la différenciation sécrétoire (ou lactogénèse I) qui a lieu pendant la gestation, et l'activation sécrétoire (ou lactogénèse II) qui a lieu dès la fin de la gestation et persiste quelques jours après l'accouchement[190]. Durant ces phases, d'importantes régulations métaboliques ont lieu au sein des cellules luminales alvéolaires afin de synthétiser les différents constituants du lait

maternel d'une part, et les sécréter dans le lumen des alvéoles mammaires d'autre part. Ainsi, des bouleversements métaboliques tels que la chute du catabolisme protidique et lipidique (β-oxydation) associé à l'augmentation accrue des synthèses protidique, glucidique, et lipidique dans les cellules luminales alvéolaires marquent les débuts de la lactogénèse (Figure 20).

- *Protéines*

Durant la gestation, la différenciation sécrétoire (ou lactogénèse I) est principalement médiée par la prolactine, qui induit la différenciation lobulo-alvéolaire de la structure épithéliale et la formation des alvéoles mammaires (voir section « Gestation »). Durant cette phase, cette hormone induit l'expression de plusieurs gènes codant pour plusieurs protéines du lait, telles que les caséines (α, β, γ, κ), WAP, WDNM1, ou encore MFGM-E8[188]. En revanche, la traduction des ARN messagers codant pour ces protéines n'aurait lieu qu'en fin de gestation, suite à l'expression d'Akt1[188] (Figure 20). Dans le même temps, l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la biosynthèse et la sécrétion des composants du lait, telles que l'α-lactalbumine (impliquée dans la synthèse du lactose), la butyrophiline et la xanthine oxydoréductase (impliquées dans la sécrétion des lipides), ou la protéine PTHrP (« parathyroid hormone related protein », en anglais, impliquée dans la sécrétion du calcium) marque l'entrée de la lactogénèse en phase II (activation sécrétoire)[188].

- *Glucides*

Lors de l'activation sécrétoire, les taux élevés de prolactine entraînent une surexpression massive du transporteur de glucose GLUT1 dans les cellules luminales alvéolaires (augmentation de l'ordre de 300%)[188], résultant en une augmentation drastique de l'internalisation du glucose par ces cellules. Les cellules luminales alvéolaires présentent alors des concentrations intracellulaires en glucose supérieures (0,34 – 1,5 mM) à la plupart des autres cellules (0,1 – 0,4 mM)[188,192]. L'α-lactalbumine, exprimée exclusivement au cours de l'activation sécrétoire, s'associe alors à la β-1,4 galactosyl-transférase pour former la lactose synthase (Figure 20). Dans l'appareil de Golgi, cette enzyme catalyse la synthèse du lactose à partir du glucose et de l'UDP-galactose.

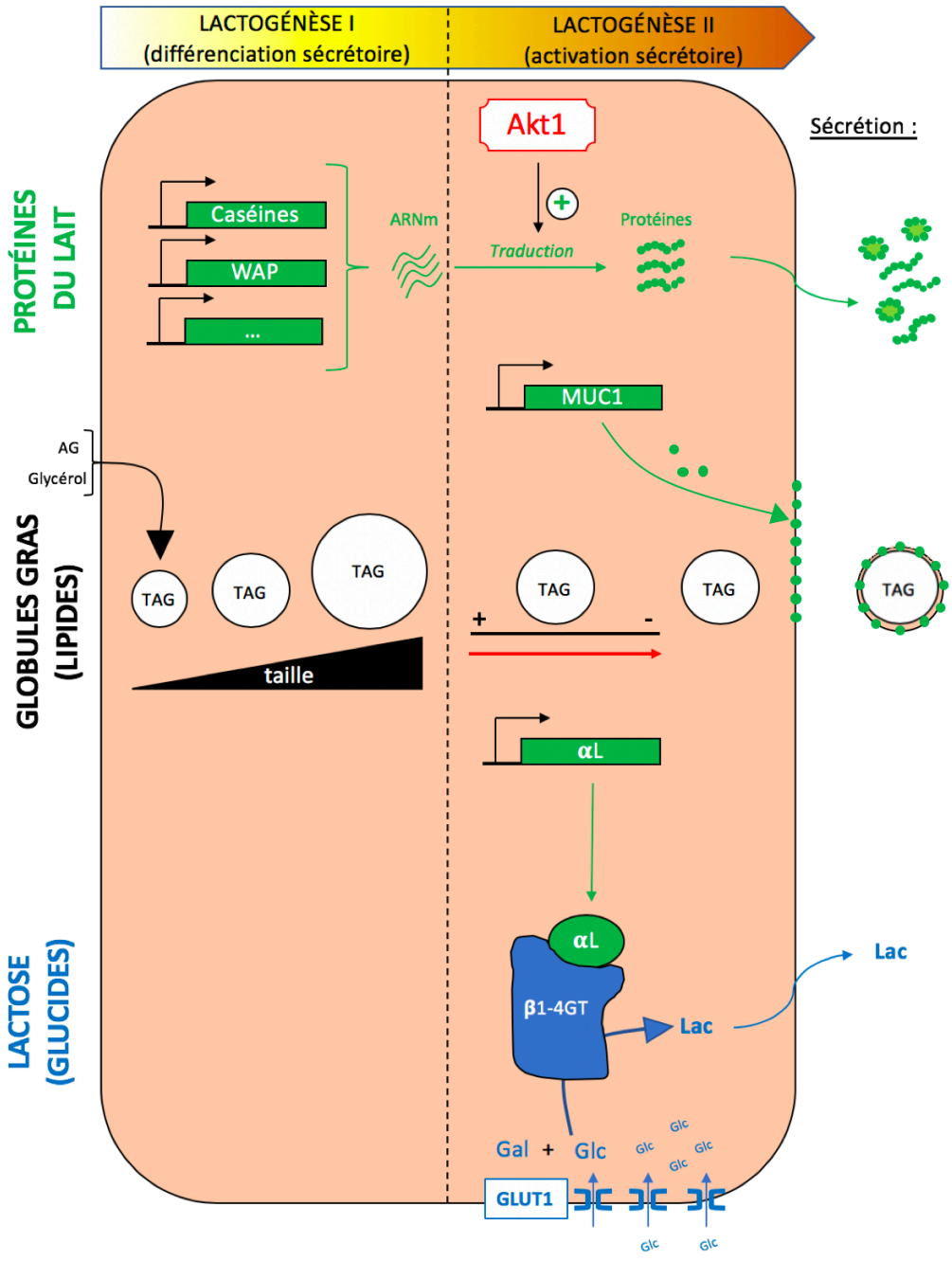


Figure 20. Biosynthèse des constituants protidiques, lipidiques, et lipidiques du lait maternel

Les protéines du lait, les globules gras, ainsi que le lactose sont produits au cours de la lactogénèse. Alors que les gènes codant pour certaines protéines du lait (caséines, WAP,…) sont exprimés au cours de la différenciation sécrétoire (lactogénèse I), celles-ci ne seraient traduites et sécrétées qu'au cours de l'activation sécrétoire (lactogénèse II). De plus, d'autres protéines telles que la mucine 1 (MUC1) ou l'α-lactalbumine (αL) ne sont exprimées qu'au cours de l'activation sécrétoire. Alors que des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques riches en triglycérides (TAG) se forment dès la différenciation sécrétoire à partir d'acides gras libres (AG) et de glycérol, celles-ci ne migrent vers le pôle apical via les microtubules que lors de l'activation sécrétoire. Enfin, l'augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT1 associée à l'expression de l' α-lactalbumine (αL) au cours de l'activation sécrétoire permettent la synthèse du lactose, principal glucide du lait maternel.

- *Lipides*

La glande mammaire constitue l'un des organes les plus producteurs et sécréteurs de lipides. Dans le lait maternel, ceux-ci se présentent majoritairement sous forme de globules gras dérivés de gouttelettes lipidiques cytolasmiques. En effet, le lait maternel est une émulsion directe (ou « huile dans eau ») constituée d'une phase lipophile (globules gras) dispersée au sein d'une phase aqueuse (lactosérum). Ces gouttelettes lipidiques prennent naissance au sein des cellules luminales alvéolaires au cours de la différenciation sécrétoire, dès la phase de gestation[193]. Ainsi, la biosynthèse des lipides du lait se caractérise par l'apparition progressive de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules luminales alvéolaires en cours de différenciation. N'excédant pas 1 µm de diamètre en milieu de gestation, celles-ci grossissent et adoptent un diamètre d'environ 10 µm juste avant l'accouchement[193]. Suite à l'accouchement, la chute du taux de progestérone entraîne une diminution brutale du diamètre des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques, et leur migration vers le pôle apical des cellules luminales alvéolaires, site de sécrétion dans le lumen des alvéoles mammaires (Figure 20). Dans le lait maternel, les globules gras ont un diamètre moyen de 4 µm.

D'un point de vue moléculaire, ces gouttelettes lipidiques sont essentiellement constituées de triglycérides. Ceux-ci sont synthétisés *de novo* dans la cellule luminale alvéolaire grâce à l'estérification de molécules de glycérol avec trois chaînes d'acides gras, qui proviennent à la fois de la circulation sanguine et du tissu adipeux en cours de dégradation[188]. Dans le cytoplasme, les gouttelettes lipidiques sont délimitées par une membrane phospholipidique dans laquelle sont ancrées plusieurs protéines nécessaires à leur formation, trafic, et sécrétion. La présence de protéines du réticulum endoplasmique (RE) associée à la membrane des gouttelettes lipidiques suggère que celles-ci pourraient être formées par l'accumulation de triglycérides néosynthétisés entre les feuillet interne et externe de la membrane du RE[193] et le bourgeonnement subséquent au niveau de la membrane du RE.

Enfin, la biosynthèse des lipides par la glande mammaire est maintenue au cours de la lactation. En effet, lors de l'activation sécrétoire, la protéine Akt exerce également un effet stabilisateur sur la protéine SREBP1 (« sterol-regulatory element-binding protein 1 », en anglais), ensuite clivée en facteurs de transcription SREBP1 et SREBP2 permettant l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et du cholestérol, respectivement[188].

- *Évolution du lait maternel au cours du temps*

Au cours de la lactation, la composition du lait maternel évolue. Quelques jours avant et après l'accouchement, le premier fluide biologique produit par les glandes mammaires est le colostrum. Celui-ci, plus translucide que le lait mature, est produit en très faible quantité et est pauvre en lipides et en lactose. Le principal rôle du colostrum étant en effet d'assurer la continuité du transfert de l'immunité au cours des premières heures après la naissance plutôt que d'accomplir un rôle nutritif, celui-ci est plus riche en protéines, et notamment en facteurs protecteurs immuns (IgA, cellules immunitaires) et non immuns (lactoferrine, lysozyme)[194]. De 2 jours à deux semaines post-partum, le lait maternel est qualifié de transitionnel. Celui-ci est sécrété après la fermeture des jonctions serrées de l'épithélium mammaire et s'enrichit en lactose et en lipides. Enfin, le lait est qualifié de complètement mature et est plus copieux à partir de deux semaines de lactation. Celui-ci est plus riche en lipides et en lactose alors que la teneur en protéines diminue. Dans le même temps, les IgA et les cellules immunitaires sont présentes en très faible quantité. La composition du lait maternel mature reste ensuite relativement stable jusqu'à l'arrêt de la lactation.

- Sécrétion dans les alvéoles mammaires

Suite à la biosynthèse des différents constituants du lait maternel au sein des cellules luminales alvéolaires, ceux-ci sont sécrétés dans le lumen mammaire. De nature différente, ceux-ci sont sécrétés par différents mécanismes (Figure 21).

- *Diffusion membranaire*

Constituant un fluide biologique, le lait maternel est essentiellement composé d'eau. Celle-ci est sécrétée dans le lumen des alvéoles mammaires par diffusion simple à travers la membrane plasmique. De plus, les échanges d'ions Na^+, K^+, Cl^- et Ca^{2+} via les transporteurs ioniques entre les compartiments extracellulaire et intracellulaire pourraient contribuer à la sécrétion d'eau. Ainsi, comme pour d'autres glandes exocrines telles que les glandes salivaires et pancréatiques, l'accumulation intracellulaire d'ions Cl^- par le co-transporteur (Na^+ - K^+ - Cl^-) entrainerait la sécrétion d'eau et de sels minéraux dans le lumen alvéolaire à travers la membrane apicale[195].

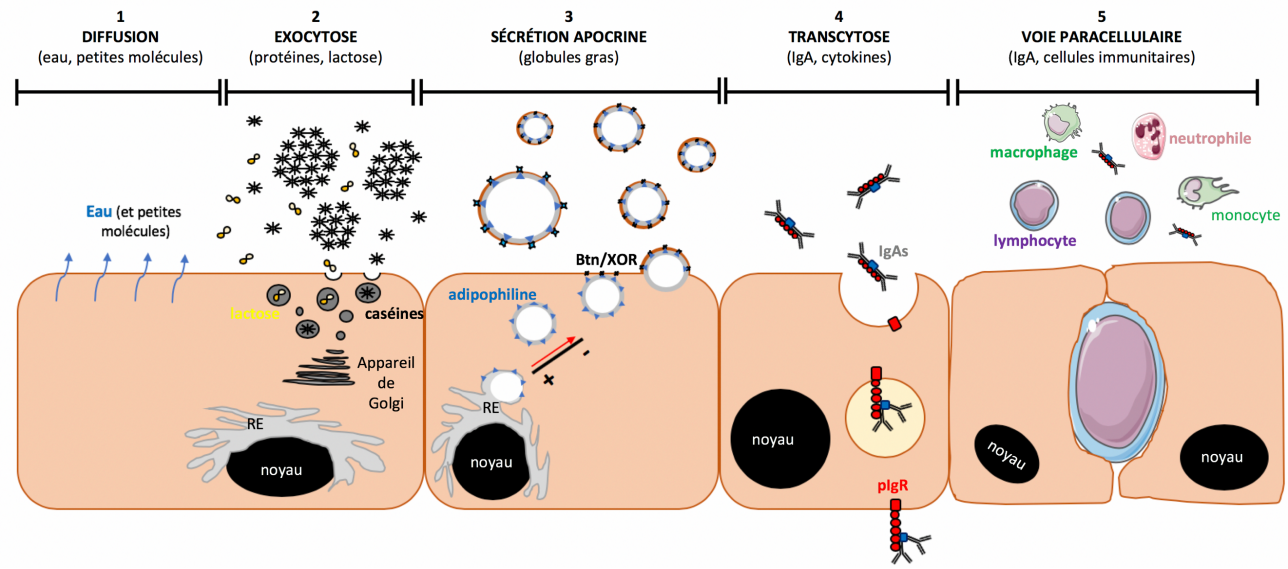


Figure 21. Voies de sécrétion des constituants du lait

Cinq voies de sécrétion majeures contribuent à la sécrétion des différents constituants du lait maternel. L'eau, les sels minéraux, et les petites molécules telles que le glucose ou les acides aminés diffusent à travers la membrane cytoplasmique apicale (1). Les protéines et le lactose sont sécrétés par la voie d'exocytose, suite à la fusion membranaire des vésicules dérivées de l'appareil de Golgi et de la membrane cytoplasmique apicale (2). Les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques sont libérées dans le lumen alvéolaire par sécrétion apocrine, donnant naissance aux globules gras (3). Les protéines sériques, telles que les immunoglobulines (ex: IgA), sont traversent l'épithélium mammaire par transcytose (5). Les cellules immunitaires circulantes franchissement l'épithélium mammaire par voie paracellulaire (6).

RE : réticulum endoplasmique, Btn : butyrophiline, XOR : xanthine oxydoréductase, pIgR : récepteur des immunoglobulines polymériques, IgAs : immunoglobuline A sécrétoire. Voir texte pour les détails.

En revanche, bien que plusieurs aquaporines soient exprimées dans les glandes mammaires, leur localisation subcellulaire est restreinte à la membrane plasmique des cellules endothéliales et au pôle basolatéral des cellules luminales (alvéolaires et ductales), suggérant que celles-ci ne sont pas impliquées dans la sécrétion d'eau par les cellules luminales. De plus, aucun défaut de lactation n'a été observé chez des souris déficientes en plusieurs aquaporines[195]. Néanmoins, celles-ci pourraient être impliquées dans la réhydratation des cellules luminales via le pôle basolatéral.

- *Exocytose*

Les protéines et le lactose sont libérées par la voie classique d'exocytose, suite à la fusion membranaire des vésicules d'exocytose (dérivées de l'appareil de Golgi) avec la membrane cytoplasmique apicale. De façon intéressante, l'accumulation de protéines et de lactose dans le compartiment extracellulaire (lumen des alvéoles mammaires) entraîne une osmolarité supérieure dans le lumen par rapport au cytoplasme, générant également des mouvements d'eau du cytoplasme vers le compartiment extracellulaire[195].

- *Sécrétion apocrine*

Les lipides sont excrétés dans le lait maternel sous forme de gouttelettes lipidiques par sécrétion apocrine[196]. Suite à leur formation entre les feuillets interne et externe de la membrane du RE, les gouttelettes lipidiques néoformées sont transportées vers le pôle apical via le réseau microtubulaire[195]. Lors de l'activation sécrétoire, celles-ci sont sécrétées dans le lumen des alvéoles mammaires par bourgeonnement à la membrane cytoplasmique, générant la formation de globules gras enveloppés d'une triple couche lipidique. D'un point de vue moléculaire, plusieurs modèles hypothétiques de sécrétion lipidique ont été proposés[197]. Parmi ceux-ci, le bourgeonnement à la membrane cytoplasmique serait induit suite à l'interaction entre l'adipophiline présente à la surface des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques et le complexe Btn/XOR (butyrophiline/xanthine oxydoréductase) localisé sous le feuillet interne de la membrane cytoplasmique apicale[195,198].

- *Transcytose*

Plusieurs protéines présentes dans le lait maternel dérivent de la circulation sanguine, telles que certaines immunoglobulines (Ig), cytokines, et hormones. Certaines d'entre elles gagnent

le lumen des alvéoles mammaires par transcytose via les cellules luminales alvéolaires. Parmi les immunoglobulines sécrétées dans le lait maternel, l'isotype A est le plus représenté. Celles-ci, associées en dimères grâce à la pièce de jonction (pièce J), sont produites sous l'épithélium mammaire puis reconnues par le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR) exprimé au pôle basolatéral des cellules épithéliales luminales[199]. La transcytose basolatéro-apicale du complexe aboutit alors au relargage de celui-ci dans le lumen des alvéoles mammaires. Lors de l'exocytose, le domaine extracellulaire du récepteur pIgR reste lié de façon covalente au dimère d'IgA, permettant la formation de la pièce sécrétoire nécessaire à la linéarisation et la stabilisation du dimère d'IgA secrété. Les dimères d'IgA sont alors appelés IgA sécrétoires. Il est à noter que ce mécanisme est également impliqué dans la transcytose d'autres Ig polymériques telles que les IgM, pentamériques[199].

- *Passage paracellulaire*

Les cellules maternelles dérivées de la circulation sanguine, telles que les cellules immunitaires, sont majoritaires dans le colostrum. En effet, celles-ci gagnent le compartiment alvéolaire par passage paracellulaire au cours des premières 48h après la naissance, lorsque l'épithélium mammaire est perméable[191]. Suite à l'effet de la chute de progestérone sérique et à l'activation sécrétoire (lactogénèse II), les jonctions serrées se referment, limitant ainsi le franchissement paracellulaire de l'épithélium mammaire[191].

Il est également admis que l'abondance de protéines sériques détectées dans le colostrum, telles que les immunoglobulines, serait due au passage paracellulaire de celles-ci au cours des premières 48h après la naissance.

- Éjection vers le mamelon

Une fois sécrété au sein des alvéoles mammaires, le lait maternel est éjecté vers le mamelon. Cependant, l'éjection du lait maternel n'est pas constitutivement activée. En effet, le processus d'éjection est un réflexe induit en réponse à plusieurs stimuli ayant lieu lors de l'allaitement maternel, tels que la tétée et les cris du nourrisson.

Comme tout réflexe, l'éjection du lait en réponse à un stimulus suit une voie afférente (transmission du « signal-stimulus » depuis le récepteur vers le SNC) et une voie efférente (transmission du « signal-réponse » depuis le SNC vers le site effecteur). Alors que la voie

afférente est strictement nerveuse, la voie efférente est exclusivement hormonale, les alvéoles mammaires n'étant pas innervées.

- *Voie afférente*

Suite à la pression mécanique exercée par la bouche du nourrisson sur le mamelon lors de la tétée, la stimulation des récepteurs tactiles présents dans le derme du mamelon est dans un premier temps transformée en signal électrique. Celui-ci est transmis à la moelle épinière via les nerfs sensoriels innervant le mamelon, puis aux neurones ocytocinergiques présents dans l'hypothalamus[200]. Suite à la stimulation électrique, ces derniers produisent l'ocytocine, sécrétée par l'axone de ces mêmes neurones au niveau de la glande pituitaire, résultant en un relargage dans la circulation sanguine.

- *Voie efférente*

A partir de la libération d'ocytocine par les neurones ocytocinergiques, la voie efférente débute. L'ocytocine gagne les glandes mammaires via la circulation sanguine et se lie au récepteur à l'ocytocine présent à la surface des cellules myoépithéliales. Cette interaction entraîne l'activation des systèmes de contraction cellulaire tels que les systèmes myosine-actine ou les systèmes impliquant l'actine du muscle lisse α-SMA ou la voie RhoA/ROCK[172] (Figure 22).

De façon intéressante, les cellules myoépithéliales alvéolaires et ductales sont toutes les deux sensibles à l'ocytocine et capables de se contracter afin d'éjecter le lait maternel vers le mamelon à partir des alvéoles mammaires et des canaux lactifères, respectivement[201].

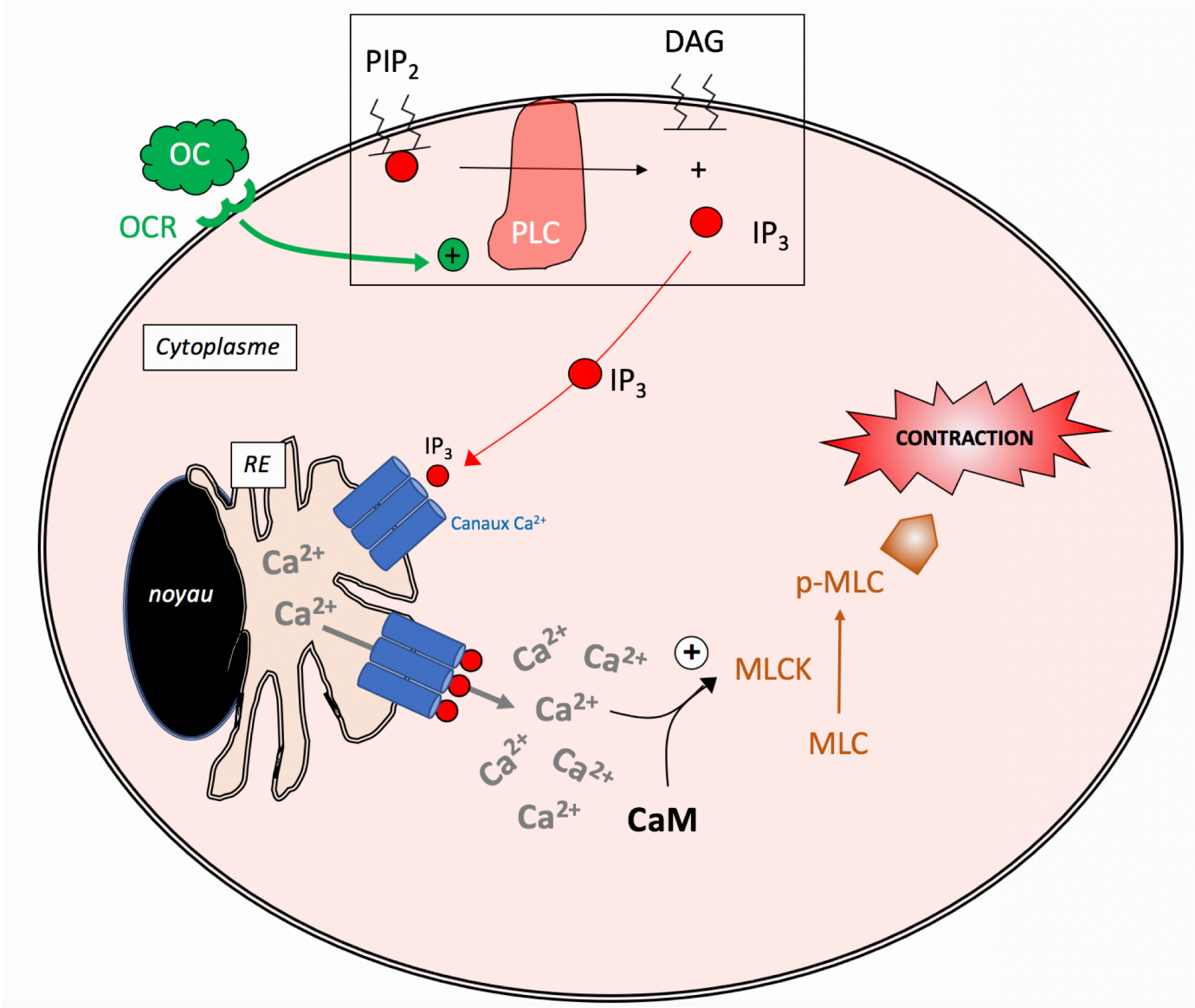


Figure 22. Mécanisme de contraction des cellules myoépithéliales en réponse à l'ocytocine
La fixation de l'ocytocine (OC) sur son récepteur (OCR) entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) qui catalyse la réaction d'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate membranaire (PIP_2) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). L'IP_3 diffuse alors dans le cytosol et active la pompe à cations Ca^{2+} permettant le relargage d'ions Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (RE) vers le cytosol. En association avec la calmoduline (CaM), ceux-ci active la protéine kinase MLCK, qui phosphoryle la chaîne légère des myosines MLC en p-MLC. Alors activée, la myosine permet, en association avec l'actine, la contraction des cellules myoépithéliales.

2. L'allaitement, un continuum post-natal du lien entre la mère et l'enfant

- Généralités sur l'allaitement maternel

L'allaitement maternel est le processus par lequel la mère transfère le lait maternel à son nourrisson. L'OMS recommande l'initiation de l'allaitement maternel dès les premières heures après la naissance sans aucune complétion par toute autre source d'alimentation (allaitement exclusif). Absorbé seul, le lait maternel est en effet considéré comme suffisant pour l'hydratation et l'alimentation complètes du nourrisson. Au-delà de 6 mois, l'OMS recommande de prolonger l'allaitement jusqu'à au moins 2 ans, en introduisant progressivement de nouvelles sources d'alimentation.

L'importance de l'allaitement maternel sur la santé du nourrisson a été démontré à plusieurs reprises : celui-ci le protège du syndrome de mort subite, des entérocolites nécrosantes, ainsi que de plusieurs infections gastro-intestinales et respiratoires[202]. L'amélioration de la qualité de vie du nourrisson allaité (diminution de la morbidité et de la mortalité) est également associée à d'autres effets bénéfiques du lait maternel, comme la réduction de l'asthme, de certaines maladies auto-immunes (diabète de type 1, maladie cœliaque), de l'obésité, et des maladies associées à l'obésité (maladies cardiovasculaires, hypertension, hypercholestérolémie, diabète de type 2,…). Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de confirmer leur lien avec l'allaitement maternel[202].

Alors que le placenta permet les échanges sanguins entre la mère et l'enfant durant la gestation, l'allaitement maternel assure ainsi le continuum du lien entre la mère et l'enfant après la naissance. Bien que de nombreux efforts soient mis en place pour concevoir des formulations artificielles de lait maternel, la composition de ce dernier varie d'une personne à une autre et est hautement adaptée au nourrisson pour qui il est dédié. Celui-ci, riche en facteurs protecteurs, trophiques, et nutritifs, protège le nourrisson des agents pathogènes, favorise le développement des organes du nourrisson, et apporte l'énergie nécessaire à leur bon fonctionnement. De façon intéressante, la majorité des composants du lait sont pléïotropes et peuvent donc exercer plusieurs fonctions différentes (nutritive, développementale, protectrice).

- Apport d'énergie et nutrition du nourrisson

De par la richesse et la diversité des constituants du lait maternel, celui-ci est considéré comme aliment de base pour le nourrisson. Deux catégories de facteurs nutritifs coexistent dans le lait maternel : les macronutriments et les micronutriments.

- *Macronutriments*

Les macronutriments présents dans le lait maternel peuvent être classés en trois catégories : les lipides, les protéines, et les glucides.

Les lipides constituent la source d'énergie la plus importante du lait maternel (≈ 50% de l'énergie totale). Ces lipides sont essentiels à la prise de masse du nourrisson ainsi qu'au développement de son système nerveux. Majoritairement constitués de triglycérides (98%), ces derniers sont également composés de di- et mono-glycérides, ainsi que d'acides gras libres, de phospholipides, et de cholestérol. De façon intéressante, la teneur en lipides dans le lait maternel varie selon les besoins du nourrisson, notamment au cours de la lactation mais également au sein d'une même tétée. Ainsi, la concentration lipidique du lait maternel éjecté en fin de tétée (ou « hindmilk ») est deux à trois fois supérieures que celle du lait éjecté en début de tétée (ou « foremilk »).

La deuxième source d'énergie véhiculée par le lait maternel est apportée par les protéines. Plus de 400 protéines différentes sont présentes dans le lait maternel, contribuant à environ 40% de l'apport énergétique total du lait maternel. Dégradées lors de la digestion, les protéines du lait maternel servent essentiellement de source en acides aminés, mais sont également impliquées, de par leur pléïotropie, dans le développement et la protection du nourrisson. Deux types de protéines coexistent dans le lait maternel : les protéines solubles et les protéines insolubles. La majorité des protéines du lait sont solubilisées dans le lactosérum, dont les plus abondantes sont la lactoferrine, l'α-lactalbumine, les lysozymes, les immunoglobulines et l'albumine sérique. Alors que certaines caséines sont également solubilisées dans le lactosérum, la plupart sont insolubles. Ainsi, les caséines α et β, insolubles, s'organisent en micelles stabilisées par les caséines κ, et les molécules de phoshate de calcium permettent le pontage inter-micellaire et la formation d'agrégats micellaires.

Enfin, le principal glucide présent dans le lait maternel est le lactose, hétérodisaccharide formé par la liaison covalente d'une molécule de glucose avec une molécule de galactose.

Uniquement produit par la glande mammaire en lactation, celui-ci constitue un sucre exclusif au lait maternel. Comme les lipides, la teneur en lactose reste stable au cours du temps dans le lait maternel mature. Celui-ci est en effet essentiel au maintien de la pression osmotique nécessaire à la sécrétion d'eau par les cellules luminales, et contribue également à l'absorption des sels minéraux (dont le calcium) par l'épithélium intestinal du nourrisson. D'autres glucides sont présents dans le lait maternel, tels que les oligosaccharides. En revanche, ces derniers ne présentent aucun rôle nutritionnel reconnu mais présentent plutôt un rôle protecteur (voir section « Protection du nourrisson »).

- *Micronutriments*

Le lait maternel contient de nombreux micronutriments essentiels à la nutrition du nourrisson, tels que des sels minéraux et des vitamines. De façon intéressante, celui-ci constitue une source importante de vitamines A, B1, B2, B6, et B12. Provenant de la circulation sanguine maternelle, la teneur en vitamines dans le lait maternel est étroitement liée à la diète maternelle, et il est ainsi recommandé à la mère de suivre un régime multivitaminé au cours de la lactation. En revanche, de façon indépendante à la diète, les vitamines K et D sont présentes en très faible quantité dans le lait maternel, et il est conseillé de supplémenter l'allaitement maternel du nourrisson avec ces deux vitamines.

- Développement du nourrisson

Outre le pouvoir nutritif important du lait maternel pour le nourrisson, celui-ci constitue également une source de facteurs de croissance nécessaires au développement et à la maturation post-natale de plusieurs organes. Ceux-ci agissent principalement au niveau de l'épithélium intestinal.

A la naissance, l'épithélium intestinal du nourrisson est partiellement mature (voir partie « La barrière intestinale, une barrière physiologique complexe »). Certains facteurs de croissance présents dans le lait maternel contribuent au développement et à la maturation de la barrière intestinale du nourrisson. Parmi ceux-ci, le facteur de croissance épidermique EGF (« epidermal growth factor », en anglais) est présent en grande quantité dans le lait maternel. Dans le colostrum et le lait mature, celui-ci est en effet 2000 fois et 100 fois plus concentré

que dans le sérum, respectivement. Résistant au pH acide de l'estomac et aux enzymes protéolytiques, l'EGF présent dans le lait maternel induit la prolifération cellulaire des entérocytes, stimule la synthèse protéique entérocytaire, et facilite l'absorption de l'eau et du glucose par l'épithélium intestinal[203]. De par l'inhibition de l'apoptose et la protection des jonctions serrées intestinales des effets de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α, l'EGF participe au maintien de la structure de l'épithélium intestinal et réduit les risques d'entérocolite nécrosante[204]. Les jonctions serrées intestinales sont également préservées par d'autres facteurs trophiques présents dans le lait maternel, telle que l'érythropoïétine, qui pourrait également jouer un rôle important dans la prévention des entérocolites nécrosantes par le lait maternel[205]. Enfin, d'autres facteurs de croissance présents dans le lait maternel permettent le développement et l'expansion de l'épithélium intestinal, tel que le facteur de croissance hématopoïétique granulocytaire humain G-CSF (« granulocyte – colony stimulating factor », en anglais)[206].
De plus, plusieurs neurotrophines telles que le GDNF, le CNTF, et le BDNF[203,207,208], essentielles à la croissance neurale et au développement des connexions synaptiques, sont présentes dans le lait maternel. Leur présence en grande quantité dans le lait maternel pourrait ainsi accélérer le développement du système nerveux entérique du nourrisson et la mise en place du péristaltisme de son tube digestif[203].

Enfin, le lait maternel permet également le développement et la maturation du système immunitaire du nourrisson. Celle-ci est permise par de nombreuses cytokines et chimiokines[209] présentes dans le lait maternel, ainsi que certains oligosaccharides enrichis en fucose, celui-ci étant important la modulation et la stimulation du système immunitaire du nourrisson.

- Protection du nourrisson

Après la naissance, les liens médiés par le placenta entre la mère et l'enfant sont interrompus et le nourrisson devient indépendant de sa mère. Cependant, le fonctionnement de son système immunitaire reste relativement immature. En effet, bien que plusieurs cellules immunitaires se développent au cours de la gestation[210], la coopération de celles-ci au cours de la régulation de la réponse immunitaire est imparfaite et nécessite d'être assistée de façon

exogène. Ainsi, le lait maternel permet le continuum du transfert de l'immunité de la mère à l'enfant après la naissance et la protection du nourrisson vis-à-vis des agents pathogènes. Cette protection est assurée par de nombreux facteurs, non immunologiques et immunologiques.

- *Facteurs non immunologiques*

Outre leur fonction nutritive et/ou développementale, certains facteurs protéiques et glucidiques exercent également une activité protectrice, tels que la lactoferrine, le lysozyme, la lactadhérine, les mucines, ou encore les oligosaccharides.

La lactoferrine constitue l'une des protéines solubles les plus abondantes dans le lactosérum (1 à 3 g/L). Son action antimicrobienne a été démontrée chez plusieurs agents pathogènes tels que certains virus, levures, et bactéries[203]. Les mécanismes d'action antivirale médiée par la lactoferrine sont principalement liés à la phase d'entrée du virus au sein de la cellule cible, en interférant notamment avec l'adsorption virale à la surface cellulaire[211]. La lactoferrine exerce également un effet à la fois bactériostatique en empêchant la croissance bactérienne via la séquestration du fer, et bactéricide en dégradant les membranes bactériennes[203].

Le lysozyme exerce également une action bactéricide en dégradant le peptidoglycane, constituant principal de la paroi bactérienne.

D'autres protéines, présentes à la surface des globules gras, protègent le nourrisson de façon aspécifique en exerçant une activité antimicrobienne. Ainsi, la lactadhérine protège le nourrisson de l'infection par le Rotavirus, alors que certaines mucines (MUC1, MUC4) exercent une action antimicrobienne à large spectre contre plusieurs virus (VIH, Rotavirus, virus Norwalk) et bactéries (*Salmonella enterica*). De plus, la digestion des globules gras par les sucs gastriques permet la libération des triglycérides, digérés en acides gras et monoglycérides. Ces produits de dégradation agissent comme détergeants et dégradent les membranes de certains virus enveloppés et de certaines bactéries[110,111,212].

Enfin, le lait maternel comporte de nombreux oligosaccharides. Au nombre d'environ 200, les oligosaccharides constituent des polymères osidiques comportant entre 3 et 32 monosaccharides par molécule, dont les cinq représentants sont le L-fucose, le D-glucose, le D-galactose, la N-acetylglucosamine, et l'acide N-acétylneuraminique (ou acide sialique). En mimant les récepteurs cellulaires de nombreux agents pathogènes, les oligosaccharides

préviennent la fixation de ces derniers sur les récepteurs exprimés à la surface de l'épithélium intestinal[203].

- *Facteurs immunologiques*

Alors que de nombreux facteurs non immunologiques jouent un rôle dans la protection aspécifique du nourrisson vis-à-vis de plusieurs agents pathogènes, le lait maternel assure également la continuité du transfert de l'immunité maternelle à son enfant après la naissance. Les facteurs immunologiques impliqués dans ce transfert d'immunité peuvent être solubles (immunoglobulines) et cellulaires (cellules immunitaires).

Facteurs solubles. Les immunoglobulines majoritairement présentes dans le colostrum et le lait maternel sont les IgA (87 à 90%), les IgM (8 à 10%), et les IgG (2 à 3%)[213]. Les proportions de chaque isotype sont conservées au cours de la lactation, bien que la teneur en immunoglobulines maternelles totales soit nettement supérieure dans le colostrum que dans le lait mature[213]. Ainsi, alors que la teneur en IgA dans le colostrum s'élève à 12-17g/L, celle-ci chute à environ 1g/L dans le lait mature, les autres immunoglobulines (IgM et IgG) n'étant par conséquent que très peu représentées dans le lait mature[213,214]. Ces disparités de teneur en immunoglobulines totales dans le colostrum par rapport au lait mature peuvent être expliquées par la perméabilité de l'épithélium mammaire au cours des premières 48h heures après la naissance. De plus, seules les immunoglobulines polymériques (IgA et IgM) franchissent l'épithélium mammaire imperméable par transcytose, via le récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR), expliquant la faible teneur en IgG dans le lait maternel.

Les IgA maternelles transmises au nourrisson via le lait maternel sont essentiellement spécifiques d'agents pathogènes entériques. En effet, suite à l'exposition de la mère à un agent pathogène entérique, celui-ci est pris en charge par les cellules immunitaires du tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT ou « gut-associated lymphoid tissue », en anglais), entraînant l'activation des lymphocytes T et la stimulation des lymphocytes B. Ces derniers, produisant des IgA, sont alors appelés plasmocytes, et migrent vers le tissu mammaire selon un axe entéro-mammaire. Les IgA dimériques produits par les plasmocytes sous l'épithélium mammaire et sécrétés dans le colostrum et/ou le lait maternel sont alors spécifiques des agents pathogènes rencontrés par la mère et contribuent ainsi à la protection du nourrisson

vis-à-vis des agents pathogènes auxquels celui-ci pourrait être exposé. Celles-ci agissent localement au niveau de l'épithélium intestinal en neutralisant les agents pathogènes dans le lumen intestinal et en empêchant ainsi la pénétration de ces derniers au sein de l'épithélium intestinal. Il a été démontré que des IgA sécrétoires spécifiques de plusieurs protéines du VIH étaient sécrétés dans le lait maternel de femmes infectées. Leur action protectrice a été démontrée à plusieurs reprises, via la neutralisation du virus afin d'empêcher la transcytose virale à travers l'épithélium intestinal, démontrant le rôle protecteur et spécifique des IgA présentes dans le lait maternel.

De façon intéressante, un deuxième axe « site inducteur/site effecteur », l'axe broncho-mammaire, permettant la migration des plasmocytes depuis l'appareil respiratoire de la mère vers le tissu mammaire, pourrait également résulter en la sécrétion d'IgA dans le lait maternel et contribuer ainsi à la protection du nourrisson des agents pathogènes respiratoires[215]. Les « fausses routes » étant fréquentes chez le nourrisson tétant, l'hypothèse d'une protection locale des IgA sécrétoires maternelles au niveau de l'appareil respiratoire du nourrisson ne peut être exclue. Bien que les mécanismes exacts de protection n'aient pas été investigués, il a été démontré que l'allaitement prolongé de plus de 6 mois était protecteur de certaines infections respiratoires[216,217].

Facteurs cellulaires. Bien que la plupart des cellules présentes dans le lait maternel soient d'origine mammaire (cellules épithéliales luminales et myoépithéliales, cellules souches), celui-ci comporte également de nombreuses cellules immunitaires. La composition des cellules immunitaires reste aujourd'hui très discutée. En effet, alors que certaines études démontrent que les macrophages représenteraient les principales cellules présentes dans le lait maternel (80%)[203], d'autres affirment que la majorité des leucocytes présents dans le lait maternel seraient les neutrophiles (80%), puis les monocytes/macrophages (15%) et les lymphocytes (4%)[218]. En 2015, une étude visant à caractériser précisément les proportions des différentes populations leucocytaires du lait maternel aboutit à la conclusion que les cellules immunitaires maternelles présentes dans le lait maternel étaient représentées par 12 à 27% de neutrophiles, 9 à 20% de précurseurs myéloïdes, 8 à 17% de granulocytes immatures, et 6 à 7% de lymphocytes T non cytotoxiques[219].

Comme les IgA, les cellules immunitaires sont plus abondantes dans le colostrum (13 à 20% des cellules totales) que dans le lait mature (1 à 2%). De façon intéressante, il a été montré

que plusieurs cellules immunitaires présentes dans le lait maternel exprimaient des marqueurs spécifiques de certaines muqueuses[218], suggérant que la majorité de ces cellules proviennent de plusieurs sites inducteurs, tels que les amygdales et les plaques de Peyer suite à leur migration broncho- et entéro-mammaire. Celles-ci confèrent une immunité active au nourrisson en phagocytant les agents pathogènes, en sécrétant des cytokines, et en assistant le développement du système immunitaire du nourrisson. En guise d'exemple, les monocytes du lait maternel sont capables de se différencier en cellules dendritiques suite à l'effet autocrine du facteur de croissance GM-CSF (« granulocyte-macrophage colony stimulating factor », en anglais) et de l'interleukine-4 (IL-4), et ainsi stimuler l'activité des lymphocytes T du nourrisson[220]. De façon intéressante, il a été démontré que ces cellules étaient également capables de pénétrer chez le nourrisson et s'y installer de façon pérenne. Ce phénomène, appelé microchimérisme, aurait exclusivement lieu lors des premiers jours après la naissance lorsque l'épithélium intestinal est perméable, et permettrait d'assister le développement du système immunitaire du nourrisson et sa protection. Aujourd'hui, ce microchimérisme de cellules maternelles à l'enfant a été mis en évidence chez plusieurs modèles animaux (souris, babouins, etc)[221].

Enfin, le statut infectieux de la mère ou du nourrisson a un impact sur l'abondance des cellules immunitaires dans le lait maternel, dévoilant les interactions dynamiques entre la mère et l'enfant lors de l'allaitement maternel[222]. En effet, il a été démontré que le nombre de leucocytes augmentait significativement dans le lait maternel en cas d'infection de la mère (mastite, infection gastro-intestinale, mycose vaginale) mais aussi du nourrisson (rougeole, rhume infantile)[223] afin de répondre aux besoins du nourrisson. Cependant, si les cellules immunitaires maternelles sont les cibles d'un agent pathogène au cours d'une infection maternelle, celui-ci aura d'autant plus de chances d'être transmis au nourrisson.

3. Le lait maternel, un fluide biologique vecteur d'agents pathogènes

Puisque certains constituants du lait maternel proviennent de la circulation sanguine maternelle, certains agents chimiques (tabac, alcool, drogues, médicaments, antibiotiques,…) et biologiques néfastes peuvent également être excrétés dans le lait maternel et être transmis au nourrisson. Bien que les bénéfices physiologiques (nutritifs, développementaux,

protecteurs) liés à l'allaitement maternel surpassent souvent les risques liés à l'ingestion de plusieurs de ces agents par le nourrisson, l'allaitement maternel peut néanmoins être contre-indiqué dans certains cas.

- Bactéries

Chez le nourrisson, les infections bactériennes sont fréquentes. En revanche, très peu d'entre elles ont été démontrées comme étant transmises par le lait maternel au cours de l'allaitement. En effet, seules *M. tuberculosis*, *S. aureus*, et *St. Agalactiae* ont été, en association avec des infections et/ou lésions du sein résultant en mastites, décrites comme transmises via le lait maternel[224]. Alors que les infections bactériennes maternelles sont rarement accompagnées d'une transmission au nourrisson au cours de l'allaitement, cette dernière pourrait en effet être inhibée par les facteurs protecteurs présents dans le lait maternel.

En revanche, il est aujourd'hui admis que le lait maternel véhicule de nombreuses bactéries commensales. En effet, le lait maternel ingéré par le nourrisson ne constitue pas un fluide biologique stérile mais abrite une diversité bactérienne (microbiote) essentiellement dominée par les genres bactériens *Staphylococcus* (abondance relative : 15,8%) et *Streptococcus* (8,2%)[225]. D'autres bactéries sont représentées telles que les bactéries du genre *Serratia* ou les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), partiellement ou strictement anaérobiques. Alors que certaines populations bactériennes proviennent de la peau du mamelon, d'autres sont, comme les cellules immunitaires présentes dans le lait maternel, originaires des intestins de la mère allaitante. En effet, celles-ci sont principalement véhiculées par les cellules dendritiques, aboutissant à un transfert efficace du microbiote intestinal maternel à l'enfant[226]. Par des expériences d'allaitement croisé réalisées au cours des 48 premières heures après la naissance, il a été démontré que le microbiote intestinal de souriceaux était dicté par la souris allaitante et non par la souris mère[227], démontrant le rôle du microbiote du lait maternel dans la colonisation des intestins du nouveau-né. Les rôles du microbiote intestinal dans la protection et le développement du nouveau-né sont développés dans la partie « La barrière intestinale : une barrière physiologique complexe ».

- Virus

Les principaux agents pathogènes transmis au cours de l'allaitement maternel sont des virus. Bien que le génome et/ou des particules infectieuses de plusieurs espèces virales aient été détectés dans le lait maternel de femmes infectées, seuls trois virus sont reconnus comme efficacement transmis par le lait maternel et résultant en une infection chronique chez le nourrisson : le cytomégalovirus (CMV), le virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1), et le virus de la leucémie T humaine de type 1 (HTLV-1).

- *Principaux milk-borne virus : CMV, VIH-1, HTLV-1*

Le cytomégalovirus (CMV). Le CMV est un virus appartenant à la famille des *Herpesviridae*. En France, environ 40% des femmes sont infectées par le CMV[228]. Au cours de la grossesse, et plus particulièrement au cours du 3ème trimestre, celles-ci transfèrent leur immunité spécifique (IgG anti-CMV) au nourrisson par voie transplacentaire[229]. Puis, après la naissance, le CMV est réactivé dans la glande mammaire en lactation[230] et est excrété dans le lait maternel chez 80% des femmes séropositives, soit sous forme associée aux cellules ou de particule virale libre[231]. Non détecté dans le colostrum, l'excrétion virale du CMV dans le lait maternel augmente ensuite au cours du temps jusqu'à atteindre un pic d'excrétion maximal entre 4 et 8 semaines post-partum[231].
Alors que le taux de transmission du CMV au cours de l'allaitement maternel est compris entre 20 et 40% dans les pays développés, celui-ci s'élève à 80-90% dans les pays sous-développés[231]. Certains facteurs de risques augmentant l'efficacité de transmission du CMV par le lait maternel sont aujourd'hui bien connus, tels que la charge virale dans le lait maternel, la durée de l'allaitement, ainsi que la précocité du processus d'excrétion virale dans le lait maternel au cours de la lactation, signifiant *a fortiori* la précocité d'exposition du nourrisson[231,232]. Bien que l'infection par le CMV au cours de l'allaitement maternel soit majoritairement asymptomatique, celle-ci s'accompagne de manifestations cliniques importantes chez les nourrissons nés prématurément (syndrome proche du sepsis, troubles développementaux du système nerveux). Ces différences de symptomatologie pourraient être liées à un défaut de protection dû à l'interruption du transfert transplacentaire d'IgG au cours du troisième trimestre de grossesse chez les nourrissons nés prématurément[233].

D'un point de vue mécanistique, des cellules primaires de glande mammaire humaine sont permissives à l'infection par le CMV[234], suggérant que les cellules épithéliales de la glande mammaire peuvent être impliquées dans l'excrétion virale du CMV dans le lait maternel. Chez le nourrisson, l'infection productive des entérocytes pourrait enfin permettre le franchissement de la barrière intestinale et l'entrée virale chez l'hôte[235].

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Le VIH-1 appartient à la famille des *Retroviridae* et au genre *Lentivirus*. En 2017, alors que la prévalence de l'infection par le VIH-1 chez les enfants était de 1,8 millions, 180 000 nouveaux cas d'infection infantile ont été recensés[231]. Bien que la transmission mère-enfant du VIH-1 puisse être assurée *ante-partum* (par voie transplacentaire), *intra-partum* (au cours de l'accouchement suite à l'échange de fluides biologiques), et *post-partum* (par allaitement maternel), cette dernière voie de transmission est majoritaire et est responsable d'environ 100 000 nouveaux cas par an[231]. D'après différentes études, le génome viral ou proviral est détecté dans le lait maternel de 20 à 90% des femmes infectées[231,236], et ce de façon plus importante juste après la naissance ainsi que chez les femmes à partir desquelles la transmission à l'enfant a eu lieu[237,238]. Ainsi, la charge virale, la précocité du démarrage ainsi que la durée de l'allaitement (effet cumulatif) constituent des facteurs de risque importants. Comme le CMV, des particules infectieuses libres et des cellules infectées ont été détectées dans le lait maternel. Cependant, l'entité infectieuse responsable de la transmission virale de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement reste indéterminée. Alors que la particule virale libre est capable de franchir un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal par transcytose[239], l'intrusion de cellules maternelles infectées au sein de l'épithélium intestinal puis leur dissémination dans l'organisme ne peut être exclue. Aujourd'hui, la prévention de la transmission mère-enfant du VIH-1 au cours de l'allaitement maternel a progressé et est essentiellement permise par le traitement antirétroviral de la mère et la prophylaxie post-exposition du nouveau-né[231,240]. De plus, bien que ce ne soit pas le cas des pays sous-développés, l'allaitement maternel peut aisément être substitué dans les pays développés.

Le virus de la leucémie T de l'adulte de type 1 (HTLV-1). Parmi les rétrovirus, le virus HTLV-1 appartient au genre *Deltaretrovirus*. Également transmis par voies sexuelle et sanguine, l'allaitement maternel constitue l'un des modes de transmission majeurs d'HTLV-1[241]. Bien

que des études épidémiologiques n'aient pas été réalisées dans toutes les régions du monde, la prévalence mondiale de l'infection HTLV-1 est estimée à au moins 5 à 10 millions d'individus[242], répartis de façon hétérogène en plusieurs zones d'endémie dans lesquelles l'allaitement maternel est une pratique courante (Japon, Afrique subsaharienne, Amérique du Sud, Caraïbes, Australo-Mélanésie). Dans les années 1980, un programme de prévention mené dans l'une de ces régions (Nagasaki, au Japon) consista en la suppression de l'allaitement maternel par les femmes infectées afin de réduire l'incidence de l'infection HTLV-1 chez les nourrissons. En effet, ce programme résulta en une diminution drastique de la transmission mère-enfant du virus HTLV-1 (20,3% puis 2,5% avant et après le programme, respectivement)[243]. Exclusivement transmis sous forme associée aux cellules, les risques de transmission du virus HTLV-1 sont directement corrélés à la charge provirale dans le lait maternel. Cependant, les anticorps maternels présents dans le lait maternel sembleraient protéger le nourrisson de l'infection par HTLV-1 au cours de l'allaitement. La durée de l'allaitement maternel constituant un facteur de risque important pour la transmission mère-enfant du virus HTLV-1, la disparition des anticorps maternels au cours du temps pourrait expliquer ces observations. En revanche, de façon surprenante, des taux élevés d'anticorps circulants spécifiques dans le sang maternel constitueraient un facteur de risque de transmission. Corrélant avec la charge provirale, ces derniers pourraient cependant refléter l'importance la charge provirale. En moyenne, 10 à 25% des nourrissons allaités par une femme infectée par HTLV-1 acquièrent le virus[231]. D'un point de vue expérimental, des cellules épithéliales luminales de glande mammaire humaine ainsi que des macrophages présents dans le lait maternel ont, *in vitro*, été démontrés comme sensibles à l'infection HTLV-1, accompagnée d'une transformation cellulaire, suggérant que ces cellules pourraient constituer des entités infectieuses et jouer un rôle dans la transmission par l'allaitement. Sandra Martin-Latil et ses collègues ont démontré que le virus HTLV-1 était également capable de franchir un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal par transcytose[244], suggérant l'épithélium intestinal comme potentielle porte d'entrée du virus chez le nourrisson. Alors que la transmigration des cellules infectées par HTLV-1 à travers l'épithélium intestinal n'a pas été démontrée, le microchimérisme de cellules infectées par HTLV-1 pourrait également contribuer à la transmission du virus au nourrisson.

- *Arbovirus*

Plusieurs arbovirus ont été décrits comme étant excrétés dans le lait maternel. Dans la plupart des cas, seul le génome viral a été détecté, mais l'isolement de particules infectieuses à partir de certains échantillons révèle un risque de transmission au nourrisson via l'allaitement maternel. A 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[107,245].

Virus du chikungunya (CHIKV). Au retour d'un voyage en zone d'endémie pour CHIKV, DENV, et ZIKV, une femme âgée de 28 ans a développé des symptômes non spécifiques tels que des éruptions cutanées et des maux de tête accompagnés d'une asthénie (fatigue). Trois jours après l'apparition des symptômes, l'infection par CHIKV fut confirmée et les infections DENV et ZIKV écartées[245]. De façon intéressante, le génome viral de CHIKV a également été détecté dans le lait maternel 3 et 23 jours après l'apparition des symptômes, après la clairance virale dans la circulation sanguine, démontrant une persistance virale de CHIKV dans le lait maternel[245]. L'allaitement du nourrisson, âgé de 3 mois, a été interrompu dès l'apparition des symptômes, et celui-ci n'a pas été infecté.

Virus de la dengue – sérotype 1 (DENV-1). Le génome viral de DENV-1 a été détecté dans le lait maternel de femmes infectées dès le premier jour et jusqu'à 14 jours après l'apparition des symptômes[107]. De façon intéressante, la cinétique d'excrétion virale de DENV-1 dans le lait maternel a pu être réalisée chez des femmes infectées quelques jours avant ou après l'accouchement pendant une épidémie de dengue en Nouvelle-Calédonie (décembre 2012 à octobre 2013)[246]. Contrairement à la virémie, dont la courbe représentative au cours du temps a l'allure d'un pic, l'excrétion virale de DENV-1 dans le lait maternel est caractérisée par un plateau associé à une détection prolongée du génome viral jusqu'à 18 jours après la naissance[246]. Dans cette étude, l'infection d'un nouveau-né associée à l'absence de virémie dans le sang de cordon ombilical suggère une potentielle transmission par le lait maternel. Dans une autre étude, des particules infectieuses de DENV-1 ont été isolées dans le lait maternel, et la transmission mère-enfant de DENV-1 au cours de l'allaitement a fortement été suggérée chez un nourrisson ayant contracté l'infection DENV-1 après avoir été allaité par une femme infectée[247].

Virus du Nil occidental (WNV). Le 2 septembre 2002, une femme âgée de 40 ans accoucha et reçut deux concentrés de globules rouges provenant d'un donneur, plus tard diagnostiqué comme infecté par WNV[248]. 13 jours plus tard, des IgM spécifiques anti-WNV ont été détectés dans le liquide céphalo-rachidien, confirmant l'infection de la mère par WNV. Au 16ème jour, le génome de WNV a été détecté dans le lait maternel[248]. L'allaitement ayant été entrepris le jour de la naissance, des tests diagnostiques moléculaires et sérologiques ont été réalisés chez le nourrisson : bien que les premiers furent négatifs, le nourrisson présenta des IgM spécifiques anti-WNV[248]. Le génome viral de WNV a également été détecté dans le colostrum de femmes ayant été infectées avant l'accouchement[249]. De façon intéressante, des IgG, IgM, et IgA spécifiques de WNV ont été détectés dans le colostrum et le lait maternel.[249] En revanche, étant donné que l'infection maternelle a eu lieu longtemps avant la naissance, la cinétique d'excrétion de ces anticorps à partir de l'apparition des symptômes ne peut être évaluée de façon fiable. Enfin, alors que le génome viral n'a jamais été détecté chez le nourrisson, l'infection de ce dernier a été démontrée de façon indirecte par la présence d'IgM spécifiques anti-WNV.

Virus de la fièvre jaune (YFV). Suite à une vaccination contre la fièvre jaune, trois cas de transmission mère-enfant de la souche vaccinale 17D de YFV via l'allaitement maternel ont été décrits[107], parmi lesquels un cas a été confirmé[250]. Le 7 avril 2009, une femme âgée de 22 ans ayant accouché par voie césarienne se présente à l'hôpital pour une intervention post-chirurgicale et reçoit, en raison du contexte endémique de la fièvre jaune (Brésil), la souche vaccinale 17DD de YFV[250]. A partir du 15 avril, soit 23 jours après l'accouchement, le nourrisson, allaité depuis le jour de sa naissance, développa de la fièvre accompagnée de convulsions de plus en plus fréquentes et intenses. Le 19 avril, l'ARN viral de la souche 17DD ainsi que des IgM spécifiques de YFV furent détectés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) du nourrisson. Bien que le lait maternel n'ait pas été testé, la transmission de la souche vaccinale 17DD de YFV par allaitement maternel fut confirmée suite au séquençage de l'isolat prélevé dans le LCR du nourrisson[250]. De façon intéressante, la transmission de la souche vaccinale 17DD au nourrisson par allaitement maternel fut accompagnée d'une pathogénicité neurologique sévère, obligeant les instances à contre-indiquer la vaccination contre la fièvre jaune en période d'allaitement.

Virus Zika (ZIKV). Le génome viral de ZIKV a été détecté dans le lait maternel de plusieurs femmes infectées[107]. Celui-ci a été quantifié dans certaines études, révélant des charges virales importantes ($2{,}9.10^4$ à $2{,}4.10^6$ copies/mL), nettement supérieures à celles détectées dans la circulation sanguine (0 à $7{,}0.10^4$ copies/mL)[107]. Majoritairement détectées dans le lait maternel entre 3 et 5 jours après l'apparition des symptômes, d'importantes charges virales ont également été détectées plus tardivement, correspondant à différentes périodes de la lactation. Ainsi, Sotelo et collègues ont pour la première fois décrit une excrétion virale de ZIKV dans le lait maternel 14 jours, 23 jours, et plus de 30 jours après l'apparition des symptômes, sans chute drastique de la charge virale entre 14 et 30 jours ($2{,}4.10^6$ et $2{,}2.10^5$ copies/mL, respectivement), démontrant la capacité de ZIKV à persister dans ce fluide biologique et à être excrété au cours de la lactation[90]. De façon intéressante, l'infection de la mère ayant eu lieu avant la naissance, ces prélèvements correspondent au colostrum et au lait transitionnel. Bien que non systématique, la présence de particules infectieuses dans le lait maternel a également été démontrée à plusieurs reprises, y compris dans le colostrum et dans le lait transitionnel[88,90].

Parmi les études ayant rapporté la présence de génome viral et/ou de particules infectieuses dans le lait maternel, deux ont décrit une transmission probable de ZIKV de la mère au nourrisson par le lait maternel[76,108] (Figure 11 de la partie I : ZIKV). Dans la première étude, bien qu'aucune particule virale infectieuse n'ait pu être isolée, de fortes charges virales dans le lait maternel associées à l'infection du nourrisson permirent de chronologiquement suspecter une transmission via l'allaitement[76]. Dans la seconde étude, les ARN viraux ZIKV extraits à partir du lait maternel de la mère infectée et de l'urine du nourrisson âgé de 5 mois furent identiques à 99%, démontrant une transmission de la mère à l'enfant de ZIKV au cours de l'allaitement maternel[108,109]. De plus, l'âge avancé du nourrisson (5 mois) ainsi que le maintien de celui-ci à l'abri de vecteurs potentiels (habitation sous air climatisé) permit de renforcer la plausibilité de ce mode de transmission. Ce dernier aurait ainsi pu, au cours de l'épidémie ZIKV en Amérique Latine (2015-2016), être impliqué dans l'augmentation du nombre de nourrissons infectés.

Pour conclure, la transmission mère-enfant des arbovirus, bien que difficile à démontrer, a à ce jour été confirmée pour YFV et fortement suggérée pour ZIKV. Alors que l'allaitement maternel est indispensable pour le développement et la survie des nourrissons dans plusieurs

pays sous-développés, l'abstinence de cette pratique en raison d'une infection virale maternelle peut être fatale pour le nourrisson. Ainsi, il est nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la transmission de ces virus au cours de l'allaitement afin de proposer des stratégies thérapeutiques adaptées tout en maintenant le processus d'allaitement. Pour les trois principaux virus transmis par le lait maternel (CMV, HTLV-1, VIH-1), l'infection des cellules épithéliales de glande mammaire humaine et le franchissement de la barrière intestinale ont été démontrés. En revanche, peu d'études ont, à l'heure actuelle, investigué les potentiels mécanismes de transmission d'autres virus détectés dans le lait maternel, tels que ZIKV.

III. LA BARRIERE INTESTINALE : UNE BARRIERE PHYSIOLOGIQUE COMPLEXE

A. Généralités

1. Anatomie et fonctionnement de l'appareil digestif

L'appareil digestif, ou tractus gastro-intestinal, existe chez tous les êtres vivants pluricellulaires. Celui-ci permet l'alimentation de l'organisme nécessaire à son bon développement et fonctionnement.

- Anatomie de l'appareil digestif

L'appareil digestif se présente sous la forme d'un tube – le tube digestif – autour duquel des glandes annexes exocrines et amphicrines (c'est-à-dire à la fois endocrines et exocrines) facilitent le processus de digestion, telles que les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire, et le pancréas. Formé au cours du développement embryonnaire, le tube digestif couvre environ 300 m^2 et constitue la plus vaste surface d'échange de l'organisme avec l'environnement extérieur[251]. Celui-ci est divisé en plusieurs compartiments aux fonctions bien distinctes : la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléum), le gros intestin (cæcum, colon ascendant, colon transverse, colon descendant, colon sigmoïde, rectum), et l'anus (Figure 23).

- Fonctionnement de l'appareil digestif

Au cours du passage successif du bol alimentaire dans les différents compartiments du tube digestif, le tractus gastro-intestinal assure la nutrition de l'organisme par trois processus principaux: la digestion progressive des aliments en nutriments, puis l'absorption des nutriments qui constituent une source d'énergie, et l'élimination des nutriments non assimilables ainsi que des déchets métaboliques.

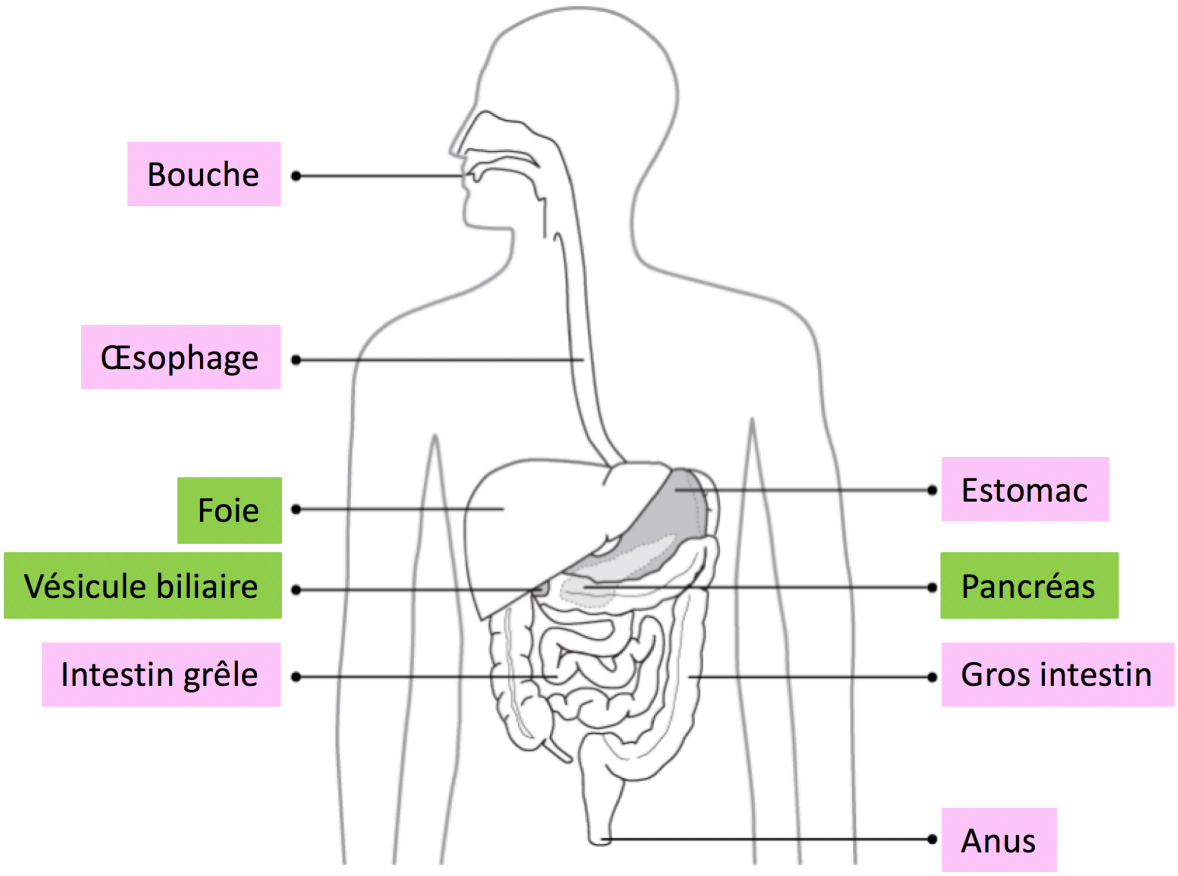


Figure 23. L'appareil digestif, ou tractus gastro-intestinal
L'appareil digestif, ou tractus gastro-intestinal, est constitué d'un tube digestif divisé en 6 compartiments (rose) : la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin, et l'anus. La progression et la digestion des aliments dans le tube digestif sont facilitées par les excrétions des glandes annexes du tube digestif (vert) : le foie, la vésicule biliaire, et le pancréas.
Adapté de la Société Canadienne du Cancer.

La digestion des aliments est essentiellement permise par la bouche, l'estomac, et le duodénum. Dans la bouche, la mastication des aliments associée à l'action de la salive, riche en hydrolases et en mucines (MUC5B, MUC7)[252], permet le broyage, le déchiquetage, et le

regroupement des aliments en masses compactes et lubrifiées facilement ingurgitées, le bol alimentaire. Au cours du passage de celui-ci dans le pharynx, la déglutition entraîne une suite de contractions involontaires et non contrôlées des parois de l'œsophage (péristaltisme), permettant le transport du bol alimentaire de la bouche vers l'estomac. L'entrée du bol alimentaire dans celui-ci entraine alors la production de gastrine par les cellules neuroendocriniennes stomacales, appelées cellules G, qui augmente la motilité intestinale et active la sécrétion d'acide chlorhydrique (HCl) et de pepsinogène (activé en pepsine en conditions acides) dans le lumen stomacal. Sous l'action du broyage mécanique et de l'action chimique des sucs gastriques (HCl, pepsine), le bol alimentaire est alors transformé en bouillie alimentaire, appelée chyme. A la sortie de l'estomac, le chyme se déverse dans le duodénum, premier segment de l'intestin grêle.

L'intestin grêle mesure environ 7 mètres de long et peut être divisé en 3 parties : le duodénum, spécialisé dans la digestion finale des macromolécules présentes dans le chyme (protéines, glucides, lipides), le jéjunum, spécialisé dans l'absorption des produits de digestion (acides aminés, monosaccharides, acides gras), et l'iléum, spécialisé dans l'absorption de certaines vitamines.

Dans le duodénum, la digestion est permise par les enzymes localisées au niveau des microvillosités présentes à la surface des entérocytes, ainsi que par les sucs pancréatiques et les sels biliaires. Les sucs pancréatiques, excrétés par le pancréas, sont constitués d'ions bicarbonates (HCO_3^-) et d'enzymes protéolytiques (trypsinogène et chymotrypsinogène clivés en trypsine et chymotrypsine), glycolytiques (amylases), et lipolytiques (lipases), qui neutralisent l'acidité du chyme provenant de l'estomac et dégradent les macromolécules en nutriments assimilables (acides aminés, monosaccharides, acides gras, glycérol,…), respectivement. Les sels biliaires, produits par le foie et sécrétés par la vésicule biliaire, favorisent la réorganisation des lipides en micelles. Suite à ces digestions enzymatiques, le chyme est alors nommé chyle.

Bien que le transit intestinal soit rapide dans l'intestin grêle, la majorité des nutriments sont absorbés par l'épithélium du jéjunum, permettant l'apport d'énergie nécessaire au développement et au fonctionnement de l'organisme. Les vitamines, les lipides, ainsi que les sels biliaires sont essentiellement absorbés au niveau de l'iléum.

L'excès de déchets et les nutriments non assimilables du chyle sont ensuite transférés dans le gros intestin, constitué du cæcum, du colon (ascendant, transverse, descendant, sigmoïde) et du rectum. Le cæcum, impliqué dans le stockage et la fermentation de la cellulose chez les animaux herbivores, n'exerce à ce jour aucun rôle connu dans les processus de digestion et d'absorption chez l'Homme. En revanche, le colon est spécialisé dans l'absorption hydrique. Celui-ci absorbe l'eau du chyle, entrainant sa déshydratation et sa transformation en matière fécale.
Enfin, celle-ci est stockée dans le rectum, puis est éliminée de l'organisme par l'anus lors de la défécation.

- La place des intestins dans l'appareil digestif

Les intestins constituent la majeure partie de l'appareil digestif et jouent un rôle majeur dans le processus général d'alimentation de l'organisme. Impliqués dans la digestion finale des macromolécules en nutriments assimilables (duodénum), les intestins exercent de façon exclusive la fonction essentielle d'absorption des nutriments (jéjunum et iléum) et de l'eau (colon). Celle-ci est optimisée par une vaste surface d'échanges d'environ 300m^2 répartie sur une longueur d'environ 8 mètres grâce à trois niveaux d'amplification, permettant de multiplier la surface d'échange par 600 : les valvules conniventes de Kerckring (replis internes des parois intestinales), les villosités et les cryptes intestinales (projections dans le lumen et invaginations de l'épithélium intestinal), et les microvillosités (localisées à la membrane apicale des cellules épithéliales intestinales, ou entérocytes) (Figure 24).
Ainsi, de par leur vaste surface d'échange et leur fonction d'absorption, les intestins constituent l'organe fonctionnel principal du tractus gastro-intestinal. De façon intéressante, la muqueuse intestinale régule les échanges entre les milieux extérieur (lumen) et intérieur (organisme) afin de permettre l'absorption des éléments nutritifs sans faciliter l'entrée des agents pathogènes dans l'organisme. La muqueuse intestinale exerce donc une fonction de barrière, et est ainsi plus communément appelée barrière intestinale.

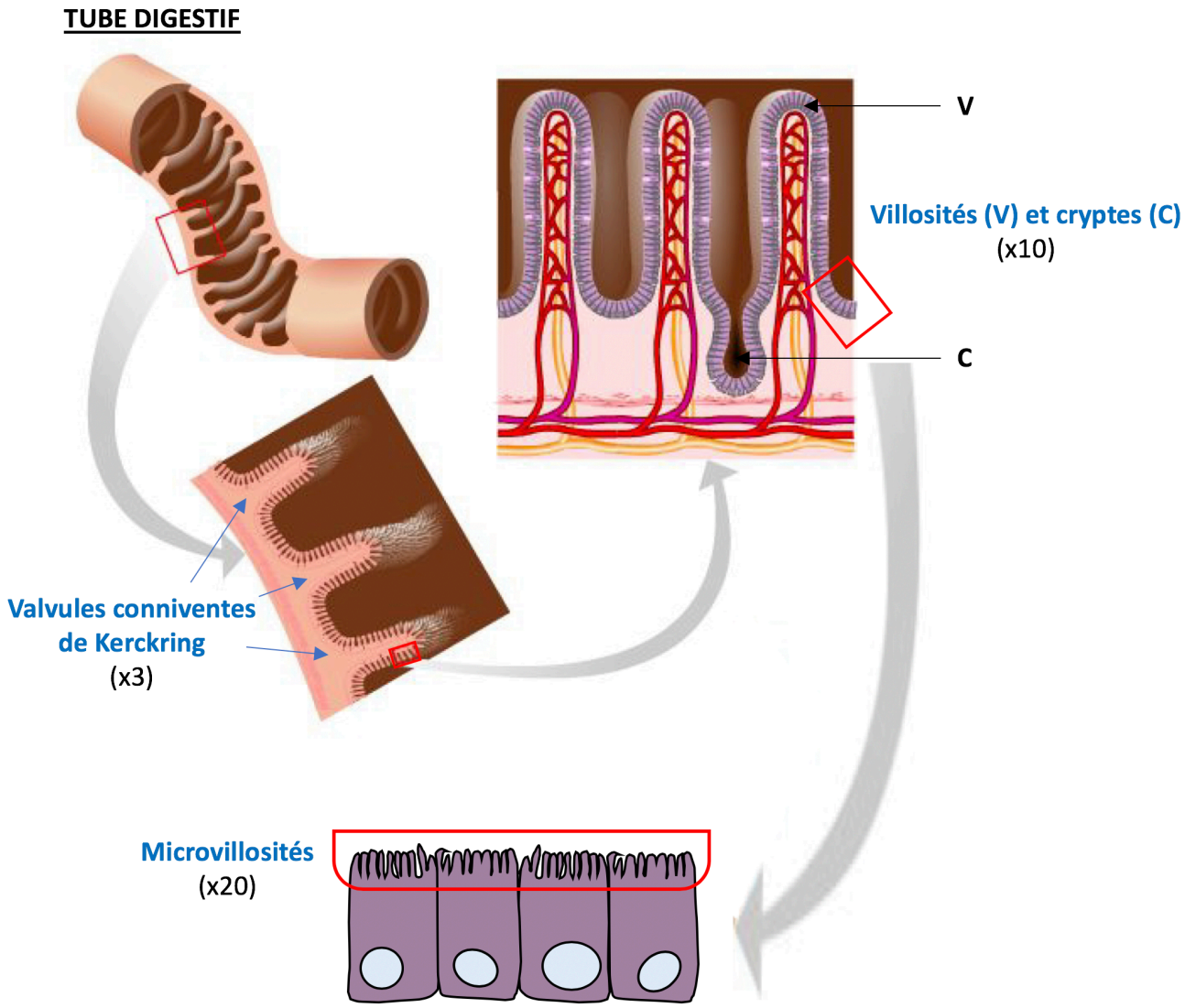


Figure 24. Niveaux d'amplification de la surface intestinale

La surface d'échange des parois intestinales, impliquées dans l'absorption des nutriments, est multipliée par 600 grâce à trois types de structures : les valvules conniventes de Kerckring (x3), les villosité et les cryptes intestinales (x10), et les microvillosités (x20).

Adapté de www.uclan.ac.uk

2. Structure et composition de la barrière intestinale

Les parois du tube digestif sont constituées d'une superposition de plusieurs tuniques dont le rôle commun est d'entretenir le fonctionnement du tube digestif.

- Composition de la paroi du tube digestif

Les parois du tube digestif sont composées de 4 couches individualisées. Classées du milieu extérieur (lumen) vers le milieu intérieur (organisme), celles-ci sont : la couche muqueuse, la couche sous-muqueuse, la couche musculeuse, et la couche séreuse (Figure 25A).

La couche muqueuse peut être divisée en trois compartiments successifs : l'épithélium intestinal, le chorion (ou *lamina propria*), et la musculeuse. L'épithélium intestinal tapisse la face interne du tube digestif et constitue la couche la plus superficielle du tube digestif. Directement au contact du lumen intestinal, celui-ci constitue la zone d'échanges entre le lumen intestinal et l'organisme. Diverses populations cellulaires, tant absorbantes que sécrétrices, constituent l'épithélium intestinal afin d'assurer l'absorption des nutriments tout en exerçant une fonction de barrière pour limiter l'invasion de l'organisme par des agents pathogènes extérieurs. Le chorion, ou *lamina propria*, constitue le tissu conjonctif soutenant l'épithélium intestinal. Celui-ci est vascularisé, permettant l'oxygénation de l'épithélium sus-jacent ainsi que le transfert des nutriments absorbés, mais abrite également de nombreuses cellules immunitaires afin de mettre en place une réponse immunitaire contre certains agents pathogènes. En deçà de la *lamina propria*, la muqueuse musculeuse, comme son nom l'indique, est une fine couche musculaire lisse responsable des mouvements et des replis de l'intestin.

La couche sous-muqueuse soutient la muqueuse intestinale par un réseau dense de fibres conjonctives. De plus, celle-ci est riche en vaisseaux lymphatiques et est hautement vascularisée. Un important réseau nerveux y est également implanté : le plexus sous-muqueux de Meissner.

La couche musculeuse est composée de deux couches musculaires entre lesquelles un second réseau nerveux, le plexus myentérique d'Auerbach, est entrelacé. Les couches musculaires interne et externe sont constituées de fibres musculaires lisses organisées selon deux

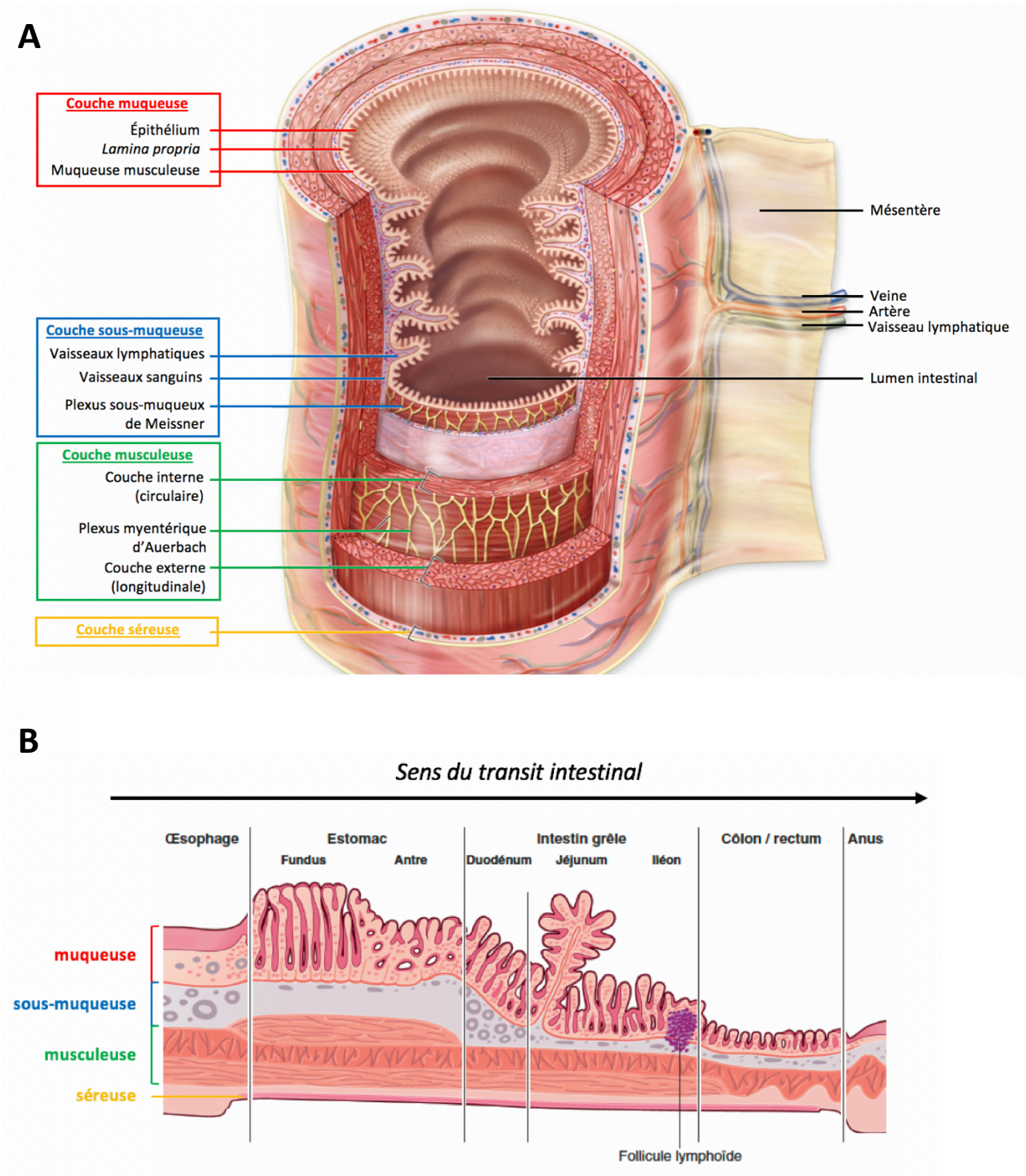


Figure 25. Organisation et composition de la paroi du tube digestif

(A) Coupe transverso-longitudinale de la paroi de l'intestin grêle et représentation des différentes couches composant les parois du tube digestif : la couche muqueuse (en rouge), la couche sous-muqueuse (en bleu), la couche musculeuse (en vert), et la couche séreuse (en orange). Adapté de l'ouvrage « Histology : Text and atlas, 15th edition », 2018. **(B)** Evolution de la composition de la paroi du tube digestif le long du tractus gastro-intestinal (œsophage, estomac, intestin grêle, gros intestin, anus). Adapté du chapitre 9 de l'ouvrage « Les fondamentaux de la pathologie digestive », 2014.

orientations différentes (circulaire et longitudinale), permettant une exécution optimale des contractions musculaires. Ces contractions, autonomes, sont contrôlées par le système nerveux entérique via le plexus myentérique d'Auerbach.
Enfin, la couche séreuse est constituée d'une fine membrane englobant le tube digestif. Riche en gros vaisseaux lymphatiques et sanguins, celui-ci permet le transport des antigènes et des nutriments aux ganglions lymphatiques mésentériques et au foie, respectivement. Le prolongement de cette fine membrane forme le mésentère, qui relie les parois intestinales aux ganglions lymphatiques mésentériques.

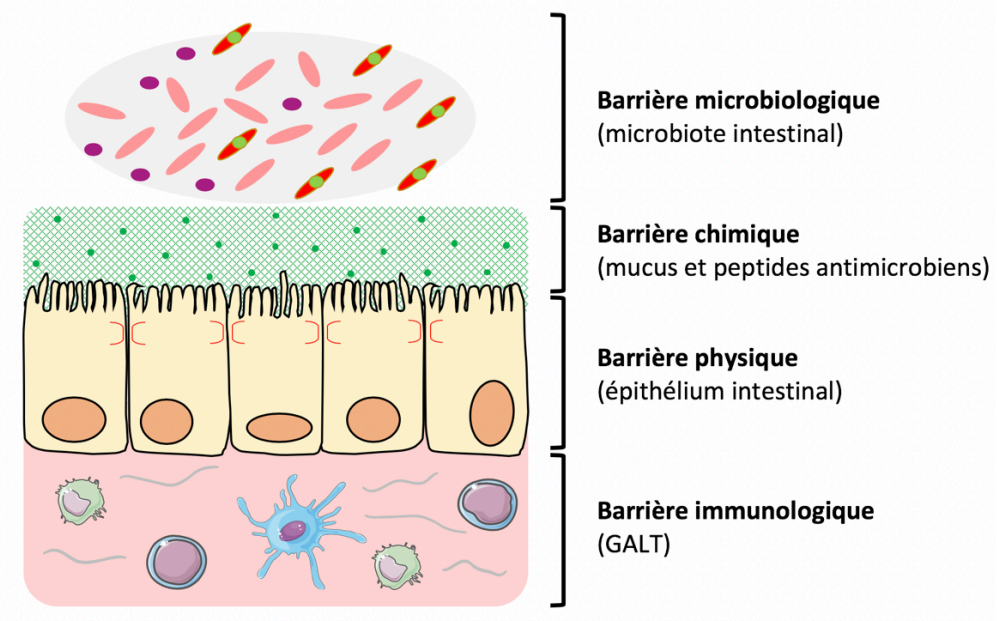
Bien que la structure histologique générale des parois du tube digestif soit commune dans les différents compartiments (œsophage, estomac, intestin grêle, gros intestin, anus), la taille et la composition des différentes couches varie selon la fonction exercée par ces derniers (Figure 25B). Ainsi, l'estomac, dont l'action mécanique des contractions des parois sont indispensables au broyage et au mélange du bol alimentaire, dispose de trois couches musculeuses. En revanche, le colon, compartiment dans lequel le transit intestinal est fortement ralenti, ne dispose que d'une couche unique.

- Structure de la barrière intestinale

Vaste surface d'échanges avec divers éléments provenant du milieu extérieur, la muqueuse intestinale constitue un site vulnérable à l'action nocive d'éléments étrangers et à l'entrée de nombreux agents pathogènes. Cependant, celle-ci est protégée par l'action simultanée de plusieurs composants du lumen intestinal et de la couche muqueuse pour former une interface physiologique complexe entre les milieux extérieur (lumen) et intérieur (organisme), la barrière intestinale. Celle-ci exerce sa fonction de barrière grâce à quatre acteurs majeurs : le microbiote intestinal (barrière microbiologique), le mucus et les sécrétions de peptides antimicrobiens (barrière chimique), l'épithélium intestinal (barrière physique), et le tissu lymphoïde associés aux intestins ou GALT (barrière immunologique) (Figure 26A).

Au niveau de l'intestin grêle, l'épithélium intestinal est constitué de divers types cellulaires liés entre eux par plusieurs catégories de jonctions intercellulaires, dont les jonctions serrées. Ainsi, la monocouche cellulaire formée par les différents types cellulaires épithéliaux forment

A



B

	INTESTIN GRELE	COLON
Barrière microbiologique	• Limitée (10^2) • Bactéries aéro-anaérobie	• Riche (10^{14} – 10^{15}) • Bactéries anaérobie
Barrière chimique	• Une couche unique de mucus lâche • Forte production de peptides antimicrobiens	• Deux couches de mucus (interne et externe) • Peu de peptides antimicrobiens
Barrière physique	• Villosités et cryptes • 6 types cellulaires • Jonctions serrées	• Cryptes uniquement • 4 types cellulaires • Jonctions serrées
Barrière immunologique	• Follicules lymphoïdes isolés • Plaques de Peyer • Sécrétion d'IgA	• Follicules lymphoïdes coloniques • Sécrétion d'IgA

Figure 26. La barrière intestinale

(A) Représentation schématique de la barrière intestinale, constituée de 4 acteurs majeurs : le microbiote intestinal (barrière microbiologique), le mucus et les peptides antimicrobiens (barrière chimique), l'épithélium intestinal (barrière physique), et le tissu lymphoïde associé aux intestins ou GALT (barrière immunologique). **(B)** Tableau récapitulatif des éléments de la barrière intestinale selon sa localisation (intestin grêle et colon).

une monocouche imperméable permettant d'empêcher la diffusion du contenu luminal au sein de la *lamina propria* sous-jacente et constitue une barrière physique autour de laquelle d'autres acteurs agissent en concert. En effet, à la surface de l'épithélium intestinal, une couche unique de mucus dans laquelle sont enchâssés divers peptides antimicrobiens (barrière chimique) permet de piéger les agents pathogènes, empêchant leur contact avec la membrane apicale de l'épithélium intestinal. Cependant, le transit intestinal étant accéléré par le péristaltisme et le complexe moteur migrant, les barrières microbiologique (microbiote intestinal) et chimique (mucus) sont déplacées avec le chyle et restent limitées. De ce fait, le microbiote intestinal présent dans l'intestin grêle est limité et est essentiellement constitué de bactéries à métabolisme aéro-anaérobie ou à croissance rapide. Enfin, en deçà de l'épithélium intestinal, le tissu conjonctif (appelé *lamina propria* ou chorion) soutient l'épithélium intestinal et permet le transfert des nutriments absorbés à la circulation sanguine. Celui-ci comporte de nombreuses cellules immunitaires résidentes, permettant la mise en place de la tolérance ou de la réponse immunitaire vis-à-vis des agents commensaux ou pathogènes, respectivement (barrière immunologique). Dans l'iléum, l'épithélium intestinal est particulièrement enrichi en agrégats lymphoïdes appelés plaques de Peyer, sites d'induction de la tolérance et de la réponse immunitaire (voir section « Le tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT) »).

La composition et l'organisation générale des différents acteurs de la barrière intestinale varient le long du tractus gastro-intestinal (Figure 26B). En effet, la couche musculeuse de la paroi intestinale du colon étant constituée d'une couche musculaire unique (couche interne circulaire), le transit intestinal est fortement ralenti, résultant en une accumulation du mucus (barrière chimique) et du microbiote intestinal (barrière microbiologique).

B. L'épithélium intestinal, acteur principal et multifonctionnel de la barrière intestinale

L'épithélium intestinal constitue la couche la plus superficielle de la paroi intestinale. Monostratifié, celui-ci est formé d'une monocouche cellulaire composée de différents types cellulaires aux propriétés absorbantes et sécrétrices, permettant d'assurer la fonction principale d'absorption de l'intestin grêle tout en exerçant une protection vis-à-vis des agents

pathogènes. De plus, liées entre elles par plusieurs complexes fonctionnels, dont les jonctions serrées, les cellules épithéliales intestinales forment une structure imperméable (barrière physique) délimitant le milieu extérieur (lumen intestinal) de l'intérieur de l'organisme.

1. Structure et composition

- Structure de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est organisé différemment selon sa localisation (Figure 27).

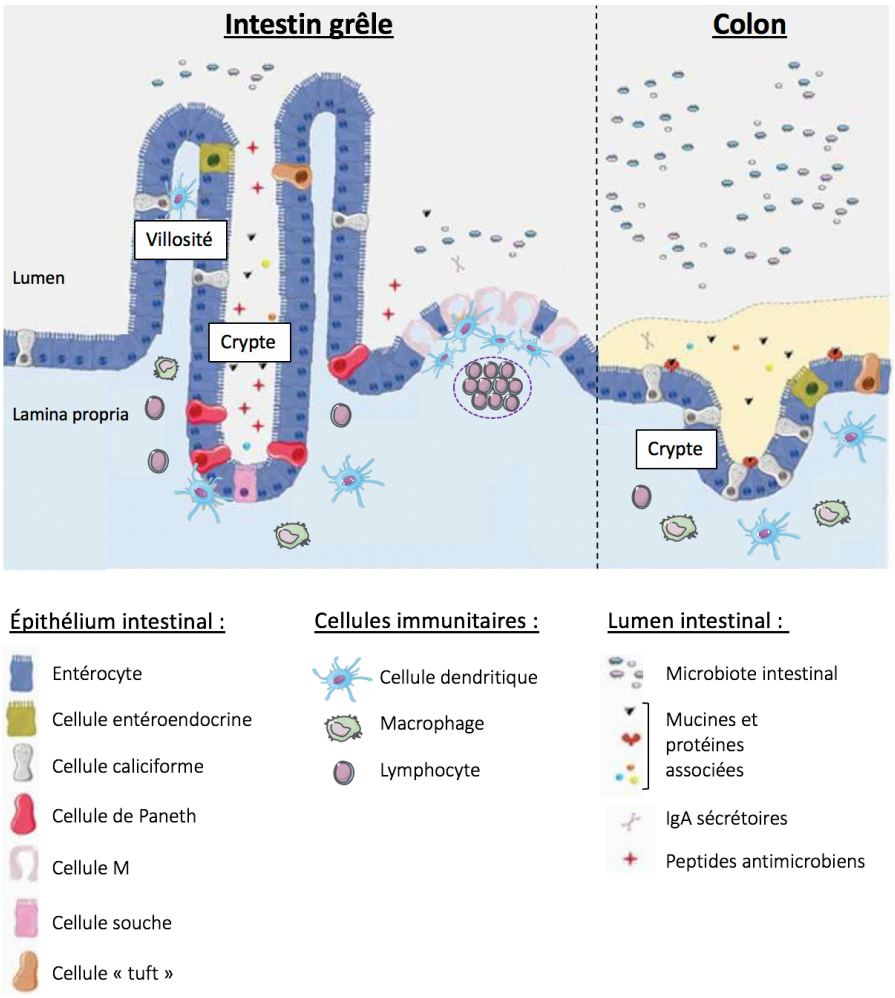


Figure 27. Architecture de l'épithélium intestinal
Représentation schématique de l'architecture de l'épithélium de l'intestin grêle (gauche) et du colon (droite). L'épithélium de l'intestin grêle s'organise en villosités et cryptes intestinales, et est constitué d'entérocytes, de cellules caliciformes, de cellules entéroendocrines, de cellules de Paneth, de cellules M, et de cellules « tuft ». L'épithélium du colon est organisé en cryptes au fond desquelles les cellules de Paneth sont absentes. Adapté de Basmaciyan et collègues, 2019.

Dans l'intestin grêle, spécialisé dans l'absorption des nutriments, l'épithélium intestinal forme des projections dans le lumen intestinal, appelées villosités. Celles-ci permettent d'augmenter les contacts de l'épithélium avec les constituants du lumen intestinal afin de faciliter l'absorption des nutriments. Également exposées à de nombreux éléments étrangers nocifs et/ou agents pathogènes, les cellules épithéliales localisées à l'apex des villosités sont rapidement éliminées par l'organisme afin de limiter les dommages cellulaires et d'assurer le renouvellement de l'épithélium intestinal en cellules hautement fonctionnelles. Ce renouvellement est permis par une seconde structure, la crypte intestinale ou crypte de Lieberkühn, caractérisée par une invagination de l'épithélium au sein du chorion. Les cryptes intestinales constituent de véritables niches de cellules souches permettant le renouvellement de l'épithélium intestinal en 3 à 7 jours[253].

Le colon, segment intestinal dans lequel l'absorption des nutriments n'est pas assurée, est dépourvu de villosités. L'épithélium intestinal du colon se caractérise ainsi par la présence unique de cryptes intestinales (Figure 27).

- Composition cellulaire

Plusieurs types cellulaires composent l'épithélium intestinal, dont certains sont nommés en fonction de leur aspect morphologique (Tableau 3). On distingue ainsi les cellules non sécrétrices, composées d'entérocytes, de cellules « tuft » et de cellules M, et les cellules sécrétrices, composées de cellules caliciformes (sécrétrices de mucus), de cellules de Paneth (sécrétrices de peptides antimicrobiens), et de cellules entéroendocrines (sécrétrices d'hormones).

Ainsi, alors que l'épithélium intestinal agit alors comme barrière physique, sa diversité cellulaire est également à l'origine de la mise en place et du fonctionnement des barrières chimique et immunologique.

- *Les cellules non sécrétrices*

Les entérocytes. Les entérocytes constituent les cellules majoritaires de l'épithélium intestinal. Représentant environ 90% de l'épithélium intestinal, celles-ci sont spécialisées dans l'absorption des nutriments et assurent ainsi la fonction principale des intestins. Celles-ci sont

liées entre elle par plusieurs complexes de jonctions intercellulaires telles que des jonctions serrées, résultant en une polarisation cellulaire et permettant de restreindre le passage des nutriments par voie transcellulaire plutôt que par voie paracellulaire. Afin d'augmenter la surface d'échange avec le lumen intestinal et d'optimiser l'expression de molécules transmembranaires impliquées dans l'absorption des nutriments, celles-ci se caractérisent par la présence de protrusions membranaires au niveau de leur membrane apicale, appelées microvillosités. Les microvillosités, de taille relativement constante (environ 100 nm de diamètre et 1 à 3 µm de hauteur) sont formées par la polymérisation des monomères d'actine G en filaments d'actine F en dessous de la membrane cytoplasmique apicale des entérocytes[254]. Plusieurs protéines telles que la villine, l'espine, la fimbrine, et la protéine EPS8, ont été décrites comme impliquées dans le regroupement des filaments d'actine (30 à

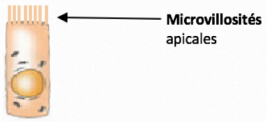
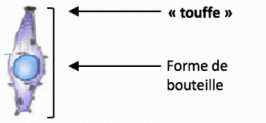
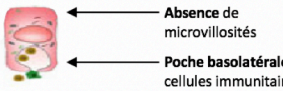
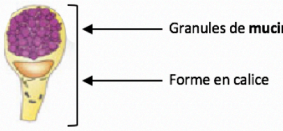
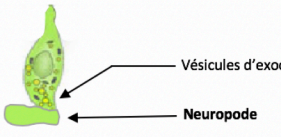
Cellule	Caractéristiques morphologiques	Fonction(s) principale(s)	Localisation	Part
Entérocyte		• Absorption des nutriments	Intestin grêle Colon	90%
Cellule « tuft »		• Réponse immunitaire antiparasitaire	Intestin grêle Colon	<1%
Cellule M		• Capture d'antigènes et de micro-organismes luminaux	Intestin grêle ***(principalement au niveau du FAE)***	10% du FAE
Cellule caliciforme		• Production de mucus • Capture d'antigènes luminaux	Intestin grêle Colon	10% (intestin grêle) 20% (colon)
Cellule de Paneth		• Production de peptides antimicrobiens	Intestin grêle ***(au fond des cryptes intestinales)***	Non documenté
Cellule entéroendocrine		• Contrôle du fonctionnement du tractus gastro-intestinal via la sécrétion d'hormones	Intestin grêle Colon	1%

Tableau 4. Caractéristiques générales des différents types cellulaires de l'épithélium intestinal

40 filaments d'actine par microvillosité) afin d'exercer une pression suffisante pour déformer la membrane cytoplasmique sous forme de protrusion. Après formation, ces protrusions membranaires sont maintenues et liées entre elles par des complexes protéiques inter-villositaires afin d'empêcher la fusion des microvillosités entre elles, résultant en un aspect en « bordure en brosse » caractéristique de la membrane apicale des entérocytes. Pour exercer leur fonction d'absorption des nutriments, plusieurs enzymes (glycolytiques et protéolytiques) et transporteurs impliqués dans l'absorption du glucose et des acides aminés sont présents au niveau de la bordure en brosse entérocytaire[255]. De façon intéressante, la glutamine, acide aminé libre le plus abondant dans le lait maternel[203], constitue la principale source d'énergie utilisée par les entérocytes.

Les cellules « tuft ». Les cellules « tuft » ont été décrites pour la première fois en 1956 chez les rongeurs (rat, souris) et en 1959 chez l'Homme[256]. Nommées ainsi d'après leur aspect en « touffe », les cellules « tuft » constituent moins de 1% des cellules épithéliales intestinales[257] et sont facilement distinguables des autres types cellulaires de par leur morphologie. Légèrement plus grandes que les entérocytes, celles-ci se caractérisent en effet par une forme de bouteille, surplombée par des microvillosités apicales reliées à l'appareil de Golgi par un réseau vésiculo-tubulaire[258]. De plus, des projections membranaires latérales, les cytospinules, pénètrent directement dans le cytoplasme des entérocytes adjacents et dont l'extrémité est connectée au noyau entérocytaire[259]. Les cellules « tuft » sont spécialisées dans la mise en place de la réponse immunitaire innée contre les parasites tels que certains protozoaires et helminthes. En effet, suite à la reconnaissance de certains protozoaires et helminthes ou la détection de leurs métabolites tels que le succinate, les cellules « tuft » sécrètent basolatéralement l'interleukine IL-25. Via l'axe IL-25/IL-17RB, celle-ci active les cellules lymphoïdes innées de type 2 résidentes de la *lamina propria*, entraînant la sécrétion d'interleukines (IL-5, IL-9, IL-13) impliquées dans la mise en place d'une réponse immunitaire de type Th2. De plus, l'IL-13 oriente la différenciation des cellules épithéliales non différenciées en cellules « tuft », le nombre de cellules « tuft » étant ainsi multiplié par un facteur 10 au cours d'une infection parasitaire[256].

Les cellules M. Les cellules « microfold », ou cellules M, constituent également une population cellulaire minoritaire de l'épithélium intestinal. Bien que certaines cellules M soient présentes

au sein des villosités intestinales, celles-ci sont principalement localisées dans l'épithélium sus-jacent des agrégats lymphoïdes tels que les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés, ou les follicules lymphoïdes coloniques[260]. Au niveau des plaques de Peyer, les cellules M constituent environ 10% des cellules de l'épithélium associé au follicule (ou FAE, « follicule-associated epithelium », en anglais) et sont spécialisées dans la capture et la transcytose d'antigènes et de micro-organismes luminaux afin de permettre leur translocation directe au follicule lymphoïde sous-jacent, riche en cellules immunitaires. Cette spécialisation cellulaire antagoniste de celle des entérocytes est permise par leur morphologie. En effet, à leur pôle apical, les cellules M sont dépourvues de glycocalyx et de microvillosités, autorisant ainsi les contacts rapprochés avec les antigènes et micro-organismes luminaux. Au pôle basolatéral, des invaginations membranaires permettent une proximité optimale des cellules M avec les cellules immunitaires sous-jacentes, telles que des lymphocytes B, des lymphocytes T, ou des cellules dendritiques. Sans aucun drainage lymphatique, les cellules M associées aux agrégats lymphoïdes permettent ainsi la mise en place rapide de la tolérance ou de la réponse immunitaire vis-à-vis des micro-organismes commensaux ou pathogènes, respectivement.

- *Les cellules sécrétrices*

Les cellules caliciformes. Comme leur nom l'indique, les cellules caliciformes se présentent sous forme de calice ou de coupe. Plus étroites à leur pôle basolatéral, ces cellules exposent une vaste surface apicale. En effet, les cellules caliciformes requièrent une surface d'échange importante avec le lumen intestinal afin d'exercer leurs deux fonctions principales : la sécrétion de mucus et l'internalisation d'antigènes luminaux[261,262].

La fonction première des cellules caliciformes est la production de mucus. Les cellules caliciformes intestinales synthétisent essentiellement la mucine MUC2, qui s'accumule sous forme de polymères repliés au sein de granules localisés sous la fine membrane cytoplasmique apicale[261]. Sous l'effet de différent stimuli apicaux (fibres alimentaires, acides gras, peptides bioactifs,…) ou basolatéraux (médiateurs immunitaires, hormones intestinales, neurotransmetteurs,…), les granules de mucines fusionnent avec la fine membrane cytoplasmique apicale permettant la libération et le déploiement des polymères de mucines en feuillets superposés en multiples couches. D'autres protéines aux fonctions bactériostatiques ou bactéricides sont également sécrétées dans le mucus par les cellules

caliciformes, telles que les protéines ZG16 (« zymogen granulae protein 16 », en anglais) ou RELM-β (« resistin-like molecule β », en anglais).
La seconde fonction des cellules caliciformes consiste en la capture d'antigènes luminaux et leur translocation vers les cellules immunitaires résidentes de la *lamina propria*. Le passage d'antigènes par les cellules caliciformes ou GAP (« Goblet cell-associated antigen passage », en anglais) a lieu de façon continue après l'interruption de l'allaitement et contribue au maintien de la tolérance immunitaire vis-à-vis des agents commensaux.
Alors que les cellules caliciformes représentent entre 10 et 15% des cellules de l'épithélium duodénal, leur proportion augmente progressivement le long du tractus intestinal jusqu'à atteindre 24% dans le colon.

Les cellules de Paneth. Les cellules de Paneth sont des cellules pyramidales localisées au fond des cryptes intestinales[263]. N'étant pas sujettes à la migration cellulaire ascendante le long de l'axe crypto-villositaire et à la desquamation à l'apex des villosités, ces cellules se distinguent de par leur localisation au fond des cryptes intestinales et par leur durée de vie supérieure (environ 30 jours) comparée à celle des autres types cellulaires (3 à 5 jours)[264]. De plus, les cellules de Paneth se caractérisent par la présence de larges structures endomembranaires reflétant une activité sécrétoire intense, ainsi que de granules intracytoplasmiques apicales riches en molécules cationiques[263]. En effet, la fonction des cellules de Paneth consiste en la protection de l'épithélium intestinal via la sécrétion de peptides antimicrobiens (défensines, lysozyme, phospholipases, lectines de type C, etc) qui diffusent au sein du mucus intestinal[265], permettant la mise en place d'une barrière chimique dont les deux principaux composants – le mucus et les peptides antimicrobiens – agissent mutuellement[266]. Les peptides antimicrobiens, à large spectre, préviennent la mise en contact de l'épithélium intestinal avec les agents pathogènes mais également avec les agents commensaux[263]. Ainsi, l'absence de cellules de Paneth au fond des cryptes intestinales coloniques pourrait expliquer l'abondance du microbiote intestinal dans le colon.

Les cellules entéroendocrines. Enfin, les cellules entéroendocrines sont dispersées au sein des villosités et des cryptes intestinales et constituent environ 1% des cellules épithéliales[267]. D'un point de vue morphologique, on distingue les cellules entéroendocrines « ouvertes », qui disposent d'un pôle apical faisant face au lumen intestinal et au niveau duquel des

microvillosités sont présentes, et les cellules entéroendocrines « fermées », de forme triangulaire et qui ne gagnent pas le lumen intestinal. Le rôle des cellules entéroendocrines est de moduler le fonctionnement physiologique du tractus gastro-intestinal (digestion, absorption, appétit, satiété) via la sécrétion de peptides et d'hormones suite à divers stimuli (nutriments, métabolites microbiens). Ces peptides et hormones sécrétées dans la *lamina propria* par les cellules entéroendocrines agissent selon trois modes distincts : de façon paracrine sur les autres types cellulaires de l'épithélium intestinal, de façon endocrine sur des organes distaux via la circulation sanguine, et par contact direct avec le système nerveux entérique via des neuropodes exhibant des fonctions synaptiques[268,269]. En fonction de leur localisation et de leurs produits de sécrétion, les cellules entéroendocrines peuvent être subdivisés en sous-populations (A, G, D, I, K, L, EC ou entérochromaffines)[267]. Les sous-populations de cellules entéroendocrines présentes dans l'intestin grêle sont les cellules D (type « fermé ») et les cellules I, K, L, et EC (type « ouvert »). Celles-ci sont notamment responsables de la sécrétion de somatostatine (qui inhibe la sécrétion des sucs gastriques par l'estomac), de GIP (« gastric inhibitory peptide », en anglais), de GLP (« glucagon-like peptide », en anglais), du peptide YY (qui provoque un sentiment de satiété et inhibe la prise de nourriture), et de sérotonine (impliquée dans la motilité intestinale)[267].

2. Renouvellement et différenciation de l'épithélium intestinal

Afin de limiter les dommages intestinaux causés par divers éléments extérieurs tels que certains agents pathogènes, l'épithélium intestinal est renouvelé tous les 3 à 5 jours. Ce renouvellement permanent reflète la présence de sites de prolifération cellulaire et de réservoirs de cellules souches capables de régénérer l'intégralité des types cellulaires constituant l'épithélium intestinal.

- Les zones de prolifération et de différenciation cellulaires : les cryptes intestinales

Les cryptes intestinales constituent le site de prolifération et de différenciation cellulaires. Celles-ci peuvent être divisées en 4 zones (du fond à la surface) : la niche de cellules souches, le site +4, la zone d'amplification transitoire, et la zone de différenciation (Figure 28).

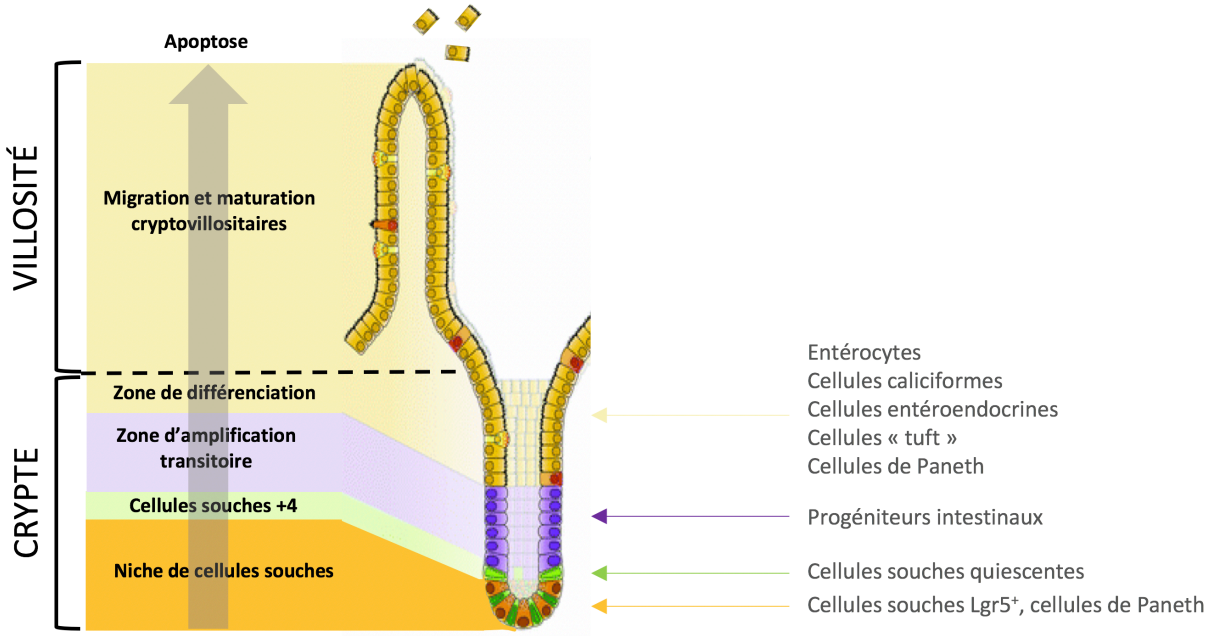


Figure 28. Coupe schématique d'une crypte intestinale

Le renouvellement de l'épithélium intestinal s'effectue en 3 à 7 jours. Les cellules souches intestinales Lgr5$^+$ localisées au fond des cryptes intestinales se divisent en progéniteurs intestinaux, qui prolifèrent puis se différencient en différents types cellulaires épithéliaux. Ceux-ci migrent le long de la villosité puis sont éliminés par apoptose au sommet de cette dernière. Adapté de Carulli et collègues, 2014.

La niche de cellules souches est localisée au fond de chaque crypte. Celle-ci est constituée de cellules souches multipotentes Lgr5$^+$ et de cellules de Paneth[270].

Le site +4, comme son nom l'évoque, désigne la 4ème position cellulaire en partant du fond de la crypte (contenant alors les cellules +1, +2 et +3). Les cellules souches positionnées en position +4 possèdent les caractéristiques des cellules souches intestinales sous-jacentes mais se distinguent de par leur sensibilité aux stimuli générateurs de mutations génétiques tels que les radiations[270]. En effet, alors qu'une dose radioactive de 10 Gy est nécessaire pour provoquer l'apoptose des cellules souches intestinales, une exposition à 1 Gy est suffisante pour provoquer une mort cellulaire programmée maximale des cellules +4[270]. Ainsi, les cellules +4 constitueraient des réservoirs de cellules à ADN non muté et pourraient régénérer des cellules souches intestinales saines[271].

Alors que la mitose de ces cellules est essentielle au maintien du réservoir de cellules souches, celle-ci peut être effectuée de façon symétrique (5%) ou asymétrique (95%)[272]. La division

asymétrique permet de régénérer le réservoir de cellules souches intestinales d'une part, tout en assurant une source pérenne de progéniteurs épithéliaux d'autre part. Les progéniteurs épithéliaux issus de la division cellulaire des cellules souches prolifèrent, caractérisant la zone d'amplification transitoire. Celle-ci constitue la principale région proliférative de la crypte intestinale.

Enfin, sous l'influence de plusieurs facteurs, ces progéniteurs se différencient selon les lignages sécréteur (cellules caliciformes, cellules entéroendocrines, cellules de Paneth, cellules « tuft ») et non sécréteur (entérocytes, cellules M). Bien que non sécrétrices, les cellules « tuft » ont été classées comme appartenant au lignage sécréteur basé sur leur programme génétique de différenciation.

- Ontogénie des différents types cellulaires

Toutes les cellules composant l'épithélium intestinal sont dérivées de la différenciation des cellules souches multipotentes résidant au fond des cryptes intestinales (Figure 28B).

La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans la différenciation en cellules sécrétrices ou non sécrétrices[272]. En absence de signaux Notch, les progéniteurs intestinaux se différencient spontanément en cellules sécrétrices sous l'action du facteur de transcription ATOH1 (Figure 29). Puis, d'autres facteurs de transcription permettent la différenciation spécifique en cellules caliciformes (*Gfi1*, *Klf4*), cellules entéroendocrines (*Ngn3*), cellules « tuft » (*Pouf2f3*), ou cellules de Paneth (*Sox9*).

En revanche, lorsque la voie Notch est activée, la différenciation en cellules sécrétrices est inhibée par le facteur de répression Hes1, qui réprime l'expression de ATOH1 et oriente alors la différenciation vers le lignage non sécréteur (entérocyte)[272].

Alors que les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules « tuft » migrent spontanément vers le sommet des villosités, les cellules de Paneth migrent vers le fond des cryptes intestinales. En surface de la crypte intestinale, les cellules épithéliales différenciées migrent le long de la villosité sous l'effet de la prolifération des cellules sous-jacentes présentes dans la zone d'amplification transitoire. Puis, à l'apex de la villosité, l'activation de la mort cellulaire programmée (apoptose) résulte en un détachement des

cellules épithéliales et leur élimination dans le lumen intestinal. De façon intéressante, lorsque la migration cellulaire est effectuée le long de l'épithélium associé aux follicules (FAE), le contexte lymphoïde sous-jacent oriente alors la différenciation des progéniteurs intestinaux ou des entérocytes matures en cellules M via l'expression du facteur de transcription *Spi-B*[273].

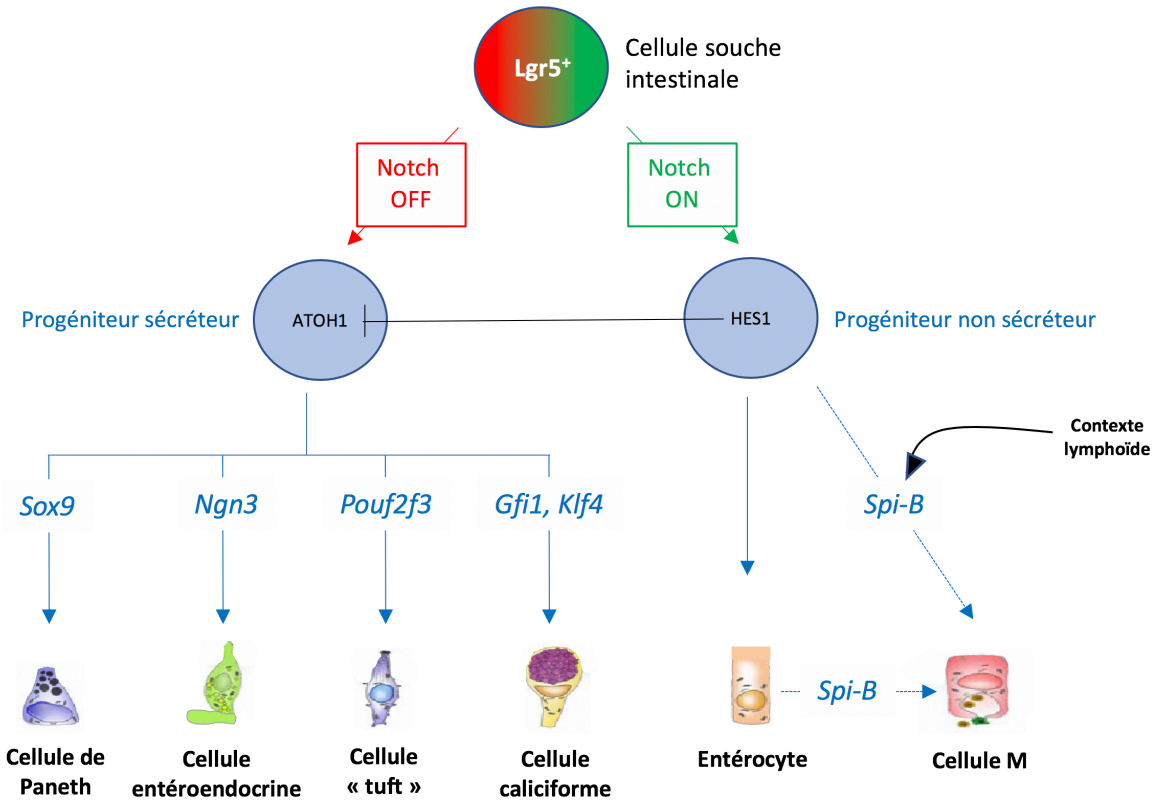


Figure 29. Ontogénie des cellules épithéliales intestinales

Schéma d'ontogénie des différents types cellulaires de l'épithélium intestinal à partir des cellules souches intestinales Lgr5$^+$. De façon spontanée, ces cellules se différencient en cellules sécrétrices. Lorsque la voie Notch est activée par des signaux provenant de la *lamina propria*, l'expression du répresseur HES1 inhibe la différenciation en cellules sécrétrices au profit de cellules non sécrétrices telles que les entérocytes.

Pour conclure, la régénération de l'épithélium intestinal est ainsi assuré par l'enchaînement successif de 5 événements : (1) la division symétrique ou asymétrique des cellules souches intestinales en progéniteurs épithéliaux, (2) la prolifération massive des progéniteurs épithéliaux dans la zone d'amplification transitoire, (3) la différenciation des progéniteurs épithéliaux en différents types cellulaires dans la zone de différenciation, (4) la migration des cellules épithéliales différenciées le long de la villosité, et (5) l'apoptose de ces dernières à l'apex de la villosité.

3. Les jonctions serrées, garantes de l'étanchéité physique de l'épithélium intestinal

La fonction de barrière physique de l'épithélium intestinal, monocouche cellulaire continue, est assurée par la présence de jonctions intercellulaires rendant celui-ci imperméable. Trois principaux types de jonctions intercellulaires coexistent au niveau de l'épithélium intestinal : les desmosomes, les jonctions adhérentes, et les jonctions serrées[274]. Alors que les desmosomes et les jonctions adhérentes assurent la jonction des cellules épithéliales entre elles, seules les jonctions serrées garantissent l'étanchéité de l'épithélium intestinal, lui conférant ainsi son rôle de barrière physique.

- Structure des jonctions serrées

Comme leur nom le suggère, les jonctions serrées sont responsables du rapprochement intime des cellules adjacentes, dont les membranes cytoplasmiques sont espacées de moins de 20 nm[274] (Figure 30). Celles-ci forment une ceinture périphérique reliant les cytosquelettes d'actine de deux cellules adjacentes par un complexe protéique constitué de diverses protéines. Les trois principales protéines constituant les jonctions serrées sont les occludines, les claudines, et les molécules d'adhésion jonctionnelle JAM (« junctional adhesion molecule », en anglais). Ces protéines, transmembranaires, interagissent entre elles de façon homo- ou hétérophilique dans l'espace périplasmique. Dans le cytosol, celles-ci sont reliées au cytosquelette d'actine par des protéines adaptatrices telles que ZO-1, ZO-2, et ZO-3 (*zonula occludens* -1, -2, et -3), permettant, de façon dépendante du calcium, le rapprochement des deux cellules voisines. Communément, ce rapprochement de deux cellules adjacentes par la mise en place de jonctions serrées imperméables aux macromolécules est nommé « fermeture des jonctions serrées ».

Les jonctions serrées constituent les premières jonctions intercellulaires au contact du lumen intestinal. Ainsi, les jonctions serrées servent de repère pour distinguer les pôles cellulaires apical et basolatéral.

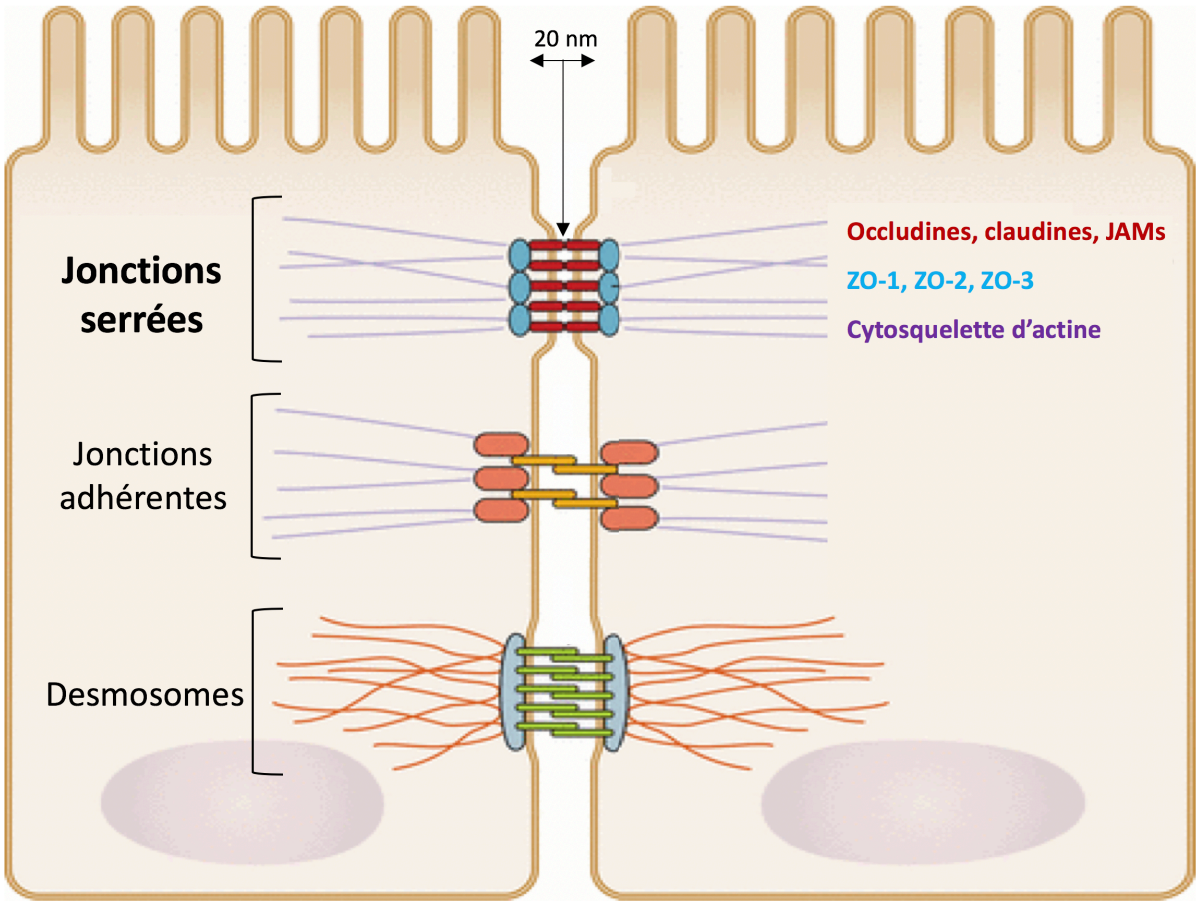


Figure 30. Les jonctions intercellulaires

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales liées entre elles par trois catégories de jonctions intercellulaires (du pôle apical vers le pôle basolatéral) : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, et les desmosomes. De par la restriction de la distance intercellulaire à une vingtaine de nanomètres, les jonctions serrées empêchent le passage paracellulaire de micro-organismes et de macromolécules, assurant ainsi l'étanchéité de l'épithélium intestinal. Celles-ci sont constituées de protéines transmembranaires (rouge) liées au cytosquelette d'actine (violet) par des protéines adaptatrices (bleu).

Adapté de Clinical Microbiology Reviews, Volume 32, Issue 4.

- La fermeture des jonctions serrées intestinales, ou « gut closure »

A la naissance, l'épithélium intestinal humain n'exerce pas sa fonction de barrière physique. En effet, sa perméabilité temporaire autorise le passage paracellulaire de macromolécules et d'immunoglobulines nécessaires à la nutrition et la protection du nourrisson, respectivement. Chez l'Homme, la période durant laquelle l'épithélium intestinal est fortement perméable est relativement courte (moins d'une semaine), comparé à d'autres animaux (souris, rats)[221]. Ainsi, la barrière physique assurée par l'épithélium intestinal se met en place et ne devient mature, d'un point de vue fonctionnel, que quelques jours après la naissance.

De façon intéressante, il a été démontré que l'allaitement maternel induisait une maturation plus rapide de l'épithélium intestinal et un raccourcissement de la période de perméabilité intestinale[275,276]. La fermeture des jonctions serrées pouvant être à l'origine de l'imperméabilisation de l'épithélium intestinal, celle-ci pourrait être favorisée par le lait maternel, riche en facteurs trophiques (EGF, érythropoïétine) et en calcium.

C. Autres acteurs de la barrière intestinale

La barrière physique façonnée par l'épithélium intestinal est complétée par l'action mutualiste d'autres acteurs formant plusieurs types de barrières d'ordres microbiologique (le microbiote intestinal), chimique (le mucus et les peptides antimicrobiens), et immunologique (le GALT).

1. Le microbiote intestinal

L'ensemble des communautés microbiennes non pathogènes (bactériennes, fongiques, virales) résidant dans l'organisme est nommé microbiote. De façon remarquable, une étude récente estima que le corps humain abritait autant de cellules humaines que de cellules bactériennes[277], permettant de qualifier l'Homme d'holobionte (ou de supra-organisme). En revanche, alors que plusieurs microbiotes coexistent au sein de l'organisme (cutané, vaginal, respiratoire, intestinal,…), le microbiote intestinal constitue de loin le plus important.

- Composition et évolution

- *Composition générale*

Le microbiote intestinal est composé d'environ 10^{14} bactéries, dont la majorité résident dans le colon[277]. De façon commune, le microbiote intestinal est dominé par quatre phyla bactériens principaux : les *Bacteroidetes*, les *Firmicutes*, les *Proteobacteria*, et les *Actinobacteria*. La prédominance d'un genre bactérien appartenant à l'un de ces phyla au sein d'un individu permet de définir son entérotype, l'entérotype 1 étant dominé par le genre *Bacteroides* (*Bacteroidetes)*, l'entérotype 2 par le genre *Prevotella* (*Bacteroidetes*), et l'entérotype 3 par le genre *Ruminococcus* (*Firmicutes*)[278].

A l'échelle d'une population, bien que la proportion de chaque phyla soit conservée au sein des individus d'un même entérotype, la composition du microbiote intestinal en genres bactériens est propre à chacun (variabilité interindividuelle). De plus, celle-ci varie au cours du temps et du mode de vie (variabilité intraindividuelle).

- *Évolution au cours de la vie*

A la naissance, le tractus gastro-intestinal du nourrisson n'est pas stérile. L'ingestion de liquide amniotique et de son microbiote au cours de la grossesse est à l'origine de la détection d'une flore bactérienne dans le méconium (premières fèces du nourrisson après la naissance)[279]. Celle-ci est peu diversifiée et varie selon les individus ainsi que l'état de santé de la mère. Suite aux premiers contacts avec l'environnement extérieur, les intestins du nourrisson sont rapidement colonisés par des bactéries aéro-anaérobies, qui consomment le dioxygène et offrent alors une niche écologique propice à l'implantation pérenne de bactéries anaérobies strictes[279]. Les premières années après la naissance constituent une période cruciale pour la mise en place du microbiote intestinal, dont la composition s'enrichit et se diversifie. La structuration du microbiote intestinal au cours de la première année de la vie est influencée par plusieurs facteurs tels que le mode d'accouchement (par voies basse ou césarienne), d'alimentation (allaitement maternel ou non), ainsi que la fréquence des hospitalisations (traitements antibiotiques)[279]. De plus, l'observation de signatures bactériennes caractéristiques de certaines populations suggère que des facteurs génétiques ou culturels (style de vie, alimentation,…) peuvent également moduler la composition du microbiote

intestinal[251]. A la fin de sa première année, le nourrisson dispose d'un microbiote intestinal qui lui est propre. Entre 2 et 5 ans, celui-ci se diversifie et se rapproche de la composition commune d'un microbiote intestinal adulte (domination des phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes*) puis reste relativement stable.

- Fonctions

Le microbiote intestinal exerce plusieurs rôles.

Premièrement, celui-ci protège l'épithélium intestinal des agents pathogènes. De par leur abondance, les bactéries commensales privent les agents pathogènes des nutriments nécessaires à leur croissance (compétition). Ainsi, des souris axéniques ou traitées par un cocktail d'antibiotiques sont plus sensibles aux infections par certaines bactéries pathogènes entériques telles que *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, ou *Listeria monocytogenes*[280]. De même, la sécrétion de peptides aux propriétés pro- et antibiotiques, les bactériocines, contribuent à la favorisation ou l'élimination de certaines bactéries[281].

Le microbiote intestinal permet également le développement et la maturation du système immunitaire, tant au niveau systémique que muqueux. Par exemple, des souris axéniques présentent des défauts de production d'anticorps ainsi qu'une diversité moindre de cellules immunitaires et de structures lymphoïdes (plaques de Peyer, follicules lymphoïdes isolés) que des souris conventionnelles. En revanche, la restauration du microbiote intestinal chez ces souris corrige ces défauts et anormalités[263].

De plus, le microbiote maintient l'homéostasie de l'épithélium intestinal en promouvant le renouvellement et la réparation cellulaires ainsi que la sécrétion de mucus.

Enfin, le microbiote intestinal joue un rôle nutritif en synthétisant *de novo* certaines vitamines non synthétisées par l'organisme (vitamine K, vitamine B12) et en métabolisant certains nutriments non digestibles (ex : fermentation des fibres alimentaires en acides gras à chaines courtes tels que l'acétate, le butyrate, et le propionate).

Ainsi, le microbiote intestinal constitue une véritable barrière microbiologique en s'opposant à l'implantation des agents pathogènes, et favorise le maintien des barrières chimique (sécrétions de mucus et de peptides antimicrobiens), physique (homéostasie de l'épithélium

intestinal), et immunologique (développement, maturation, et stimulation du système immunitaire).

2. Le mucus et les peptides antimicrobiens

Tapissant l'épithélium intestinal, la barrière chimique est composée d'une matrice de mucus au sein de laquelle diffusent de nombreux peptides antimicrobiens. Essentiellement produite par les cellules caliciformes (mucus) et les cellules de Paneth (peptides antimicrobiens) de l'épithélium intestinal sous-jacent, la barrière chimique prévient les contacts entre les agents commensaux ou pathogènes et l'épithélium intestinal.

- Le mucus

L'intégralité de l'épithélium intestinal est couvert d'une ou plusieurs couches de mucus. Celui-ci est principalement constitué d'eau et de protéines fortement glycosylées, appelées mucines. Celles-ci sont produites par les cellules caliciformes.
Le mucus de l'intestin grêle, constitué d'une couche unique, couvre l'intérieur des cryptes intestinales, l'espace inter-villositaire, ainsi que le sommet des villosités. Il est essentiellement constitué de polymères de mucines MUC2 qui s'organisent en un réseau lâche dans lequel sont emprisonnés des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth. En limitant la diffusion de ces derniers dans le lumen, le mucus intestinal permet de les concentrer à proximité de l'épithélium intestinal, repoussant ainsi certains agents pathogènes. Sous-l'influence du péristaltisme permanent, cette couche de mucus n'est pas attachée à l'épithélium intestinal mais est entraînée avec le chyle alimentaire et le microbiote intestinal. Cependant, une fine couche de mucines transmembranaires (MUC1), le glycocalyx, permet de limiter l'infection des entérocytes par des agents pathogènes ainsi que la diffusion non régulée de macromolécules au niveau de leur pôle apical.

Contrairement à l'intestin grêle, la motricité intestinale est quasi nulle dans le colon, résultant en une accumulation du mucus, qui forme alors deux couches aux propriétés bien distinctes. La couche interne, au contact de l'épithélium et d'une épaisseur d'environ 200µm, résulte de l'accumulation de mucines MUC2 immédiatement produites par les cellules caliciformes.

Formant un réseau dense ne laissant pénétrer les particules ou micro-organismes d'une taille supérieure à 0,5µm, la couche interne de mucus est considérée comme stérile. L'accumulation et la stagnation du mucus dans le colon permet la réalisation de clivages protéolytiques des mucines par des enzymes endogènes au sommet de la couche interne, générant un réseau secondaire qui occupe 2 à 3 fois plus d'espace que la couche interne. Cette couche externe, plus lâche que la couche interne, est occupée par de nombreuses bactéries appartenant au microbiote intestinal.

- Les peptides antimicrobiens (PAMs)

La sécrétion de peptides antimicrobiens (PAMs) est principalement assurée par les cellules de Paneth, localisées au fond des cryptes intestinales[263]. La diffusion progressive des PAMs au sein du réseau de mucines entraîne un gradient de concentration décroissant du fond des cryptes au sommet des villosités, empêchant le rapprochement de l'épithélium intestinal par les agents pathogènes ayant réussi à pénétrer dans la couche de mucus.

Les cellules de Paneth sécrètent de nombreux PAMs différents tels que les défensines α (les plus abondantes), les défensines β, les lectines de type C, les phospholipases... Ceux-ci peuvent être sécrétés de façon constitutive (défensines, phospholipases) ou en réponse à un stimulus (lectine REGIIIγ) telle que la détection de certains produits microbiens (lipopolysaccharide, acide lipoteichoïque)[263].

Différents mécanismes d'action permettent l'action antimicrobienne des PAMs, dont les principaux sont la perméabilisation et/ou destruction des membranes et parois microbiennes ainsi que l'inhibition de leur métabolisme . En usant d'un mécanisme unique ou de plusieurs mécanismes différents, un même PAM est ainsi capable d'exercer simultanément des actions antivirale, antibactérienne, antifongique, et antiparasitaire[282].

Les cellules de Paneth étant absentes dans le colon, celui-ci abrite un microbiote intestinal plus riche. Cependant, d'autres cellules épithéliales sont capables de sécréter quelques PAMs, telles que les défensines β ou la lectine REGIIIγ par les entérocytes[263,283].

3. Le tissu lymphoïde associé aux intestins (GALT)

Toutes les muqueuses de l'organisme sont dotées d'un système immunitaire associé permettant d'assurer l'immunité mucosale : le tissu lymphoïde associé aux muqueuses, ou MALT (« mucosa-associated lymphoid tissue », en anglais).
Au niveau du tube digestif, celui-ci est nommé GALT (« gut-associated lymphoid tissue », en anglais) et constitue l'ultime acteur principal de la barrière intestinale.

- Composition générale

L'épithélium intestinal est étroitement lié à de nombreuses cellules immunitaires pouvant être directement intriquées dans l'épithélium intestinal (lymphocytes intra-épithéliaux), libres dans la *lamina propria* (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes), ou regroupées en amas sous formes d'agrégats lymphoïdes (follicules lymphoïdes isolés, plaques de Peyer).

- *Cellules immunitaires intriquées dans l'épithélium intestinal*

Au sein-même de l'épithélium intestinal sont enchâssées plusieurs populations lymphocytaires, les lymphocytes intra-épithéliaux. Dans l'intestin grêle, ceux-ci sont majoritairement composés de lymphocytes T $CD8^+$, alors que la population T $CD4^+$ représente environ 50% des lymphocytes intra-épithéliaux dans le colon. De par leur phénotype similaire à celui des lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes intraépithéliaux jouent un rôle dans l'élimination des cellules infectées par un agent pathogène[284].

- *Cellules immunitaires libres et résidentes de la lamina propria*

La *lamina propria* est un tissu conjonctif au sein duquel résident de nombreuses cellules immunitaires, dont la plupart sont impliquées dans la réponse immunitaire innée (macrophages, cellules dendritiques). Celles-ci capturent les antigènes luminaux et jouent le rôle de cellules présentatrices de l'antigène (CPAs) afin de permettre la mise en place de l'immunité muqueuse par les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B). Dans la *lamina propria*, les lymphocytes B et T libres proviennent essentiellement des ganglions lymphatiques mésentériques.

- *Cellules immunitaires regroupées en agrégats lymphoïdes*

Enfin, la plupart des cellules de la réponse immunitaire adaptative (lymphocytes B et T) sont regroupées sous formes d'amas : les agrégats lymphoïdes. Selon leur complexité et diversité cellulaire, on distingue deux types d'agrégats lymphoïdes : les follicules lymphoïdes isolés et les plaques de Peyer.

Les follicules lymphoïdes isolés sont des agglomérations de lymphocytes B autour desquelles résident quelques lymphocytes T et de nombreuses cellules dendritiques (cellules dendritiques périfolliculaires). Comme leur nom l'indique, les follicules lymphoïdes isolés sont solitaires au sein de la *lamina propria*.

Les plaques de Peyer, plus complexes, sont constituées d'un regroupement de plusieurs follicules lymphoïdes (lymphocytes B) séparés entre eux par des régions inter-folliculaires riches en lymphocytes T et en cellules dendritiques. De plus, ceux-ci disposent d'un centre germinatif, site de maturation des lymphocytes B, les rendant plus volumineux et visibles macroscopiquement. Les plaques de Peyer sont situées sous une couche de cellules dendritiques périfolliculaires elles-mêmes localisées en deçà de l'épithélium intestinal.

La fonction des agrégats lymphoïdes est similaire à celle des ganglions lymphatiques, soit la présentation de l'antigène aux lymphocytes T par les cellules présentatrices de l'antigène (CPAs) et la mise en place subséquente d'une réponse immunitaire spécifique. D'un point de vue général, les ganglions lymphatiques drainent un ou plusieurs organes via des vaisseaux lymphatiques afférents et efférents. Les vaisseaux afférents transportent les CPAs depuis l'organe cible vers le ganglion lymphatique, au sein duquel ont lieu la présentation de l'antigène et l'activation des cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B). Les vaisseaux efférents contribuent à la migration de ces cellules activées vers le site cible. Contrairement aux ganglions lymphatiques, les follicules lymphoïdes ne disposent pas de signalisation afférente étant donnée leur proximité avec les CPAs locales. Sans aucun drainage afférent, les agrégats lymphoïdes permettent ainsi une mise en place rapide de la réponse immunitaire.

- Activation de l'immunité muqueuse

En réponse à un stimulus antigénique, les cellules immunitaires présentes au sein des différentes structures du GALT coopèrent afin de mettre en place une réponse immunitaire

contre les agents pathogènes tout en maintenant une tolérance immunitaire vis-à-vis des agents commensaux (microbiote intestinal).

- *Capture des antigènes et/ou micro-organismes luminaux*

L'activation de l'immunité muqueuse débute par la capture d'antigènes et/ou de micro-organismes dans le lumen intestinal. Celle-ci peut être effectuée selon deux mécanismes principaux : par transcytose à travers certaines populations cellulaires de l'épithélium intestinal (cellules M, cellules caliciformes), et par prolongements cytoplasmiques trans-épithéliaux des cellules phagocytaires CX3CR1^{+} de la *lamina propria* (cellules dendritiques, macrophages).

De façon intéressante, des souris dont l'épithélium intestinal est appauvri en cellules M présentent une sensibilité accrue face aux infections mucosales associée à des défauts de réponse immunitaire (production d'IgA)[285,286].

Les cellules M sont les cellules spécialisées dans la capture d'antigènes et/ou de micro-organismes au sein du lumen intestinal. Alors que certaines populations existent au sein des villosités intestinales (cellules M villositaires), la plupart des cellules M résident au sein de l'épithélium associé aux agrégats lymphoïdes tels que les plaques de Peyer. A la surface des cellules M, l'absence de microvillosités apicales permet un dépôt optimal des antigènes particulaires et des micro-organismes, et certains récepteurs tels que la protéine Gp2 ou le récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR) permettent également la reconnaissance de micro-organismes libres ou opsonisés. La transcytose de ces derniers aboutit à leur relargage au niveau d'une invagination basolatérale au sein de laquelle résident plusieurs cellules immunitaires phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques périfolliculaires)[260,273].

- *Induction de la réponse immunitaire*

Sous le FAE, les phagocytes (macrophages, cellules dendritiques) capturent l'antigène ou le micro-organisme et le présentent de façon locale aux lymphocytes T sous-jacents, permettant l'induction de la réponse immunitaire au niveau des plaques de Peyer. Au sein de celles-ci, la maturation des lymphocytes T (en T mémoire, T auxiliaire, T cytotoxique, T régulateur) et des lymphocytes B (en plasmocytes) a lieu. Une fraction des cellules présentatrices de l'antigène

(cellules dendritiques $CD103^+$) migre également vers les ganglions lymphatiques drainant les intestins, les ganglions lymphatiques mésentériques, afin de mettre en place la réponse immunitaire en périphérie et préparer l'organisme à une infection. A ce niveau, la maturation et l'activation des lymphocytes T et B résulte en une acquisition de marqueurs de « gut-homing », permettant leur retour (ou migration efférente) au sein de l'épithélium intestinal.

- *Réponse immunitaire au niveau de la muqueuse*

La plupart des lymphocytes résidents dans la *lamina propria* proviennent des sites inducteurs (agrégats lymphoïdes, ganglions lymphatiques mésentériques) afin d'assurer l'immunité locale au sein de la muqueuse intestinale. Parmi ceux-ci, les lymphocytes T CD8+ exercent une fonction cytotoxique alors que les lymphocytes B, différenciés en plasmocytes, produisent et sécrètent des immunoglobulines de type A. Celles-ci sont transportées dans le lumen intestinal par transcytose basolatéro-apicale à travers les entérocytes afin de neutraliser les agents pathogènes luminaux par opsonisation. De plus, les IgA repoussent également les agents pathogènes dans le lumen intestinal au cours de leur transcytose inverse (par exclusion des agents pathogènes présents dans la *lamina propria* ayant franchi l'épithélium intestinal et par neutralisation intracellulaire des agents pathogènes en cours de franchissement).

- Les tonsilles : la présence du GALT au niveau de l'appareil digestif proximal

- *Description*

Les tonsilles, anciennement appelées amygdales, constituent des structures lymphoïdes localisées au niveau des cavités nasale et buccale.

Chez l'Homme, quatre types de tonsilles coexistent dès la naissance[287] et sont réparties sous forme d'anneau, l'anneau de Waldeyer : les tonsilles pharyngées (au niveau du pharynx), les tonsilles tubales (à l'entrée des trompes d'Eustache), les tonsilles palatines (de part et d'autre de la voûte palatine), et les tonsilles linguales (tapissant la surface du troisième tiers de la langue) (Figure 31).

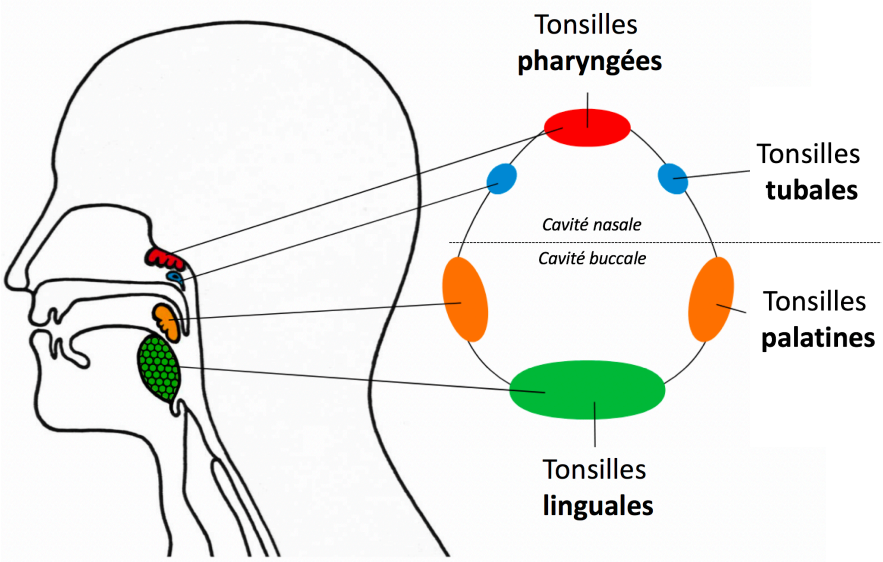


Figure 31. L'anneau de Waldeyer : une répartition circulaire des tonsilles.
Vues de profil (gauche) et de face (droite) de la distribution des tonsilles pharyngées (rouges) et tubales (bleues), localisées au niveau de la cavité nasale, et des tonsilles palatines (oranges) et linguales (vertes), localisées dans la cavité buccale. Adapté de Perry M. et collègues (1998).

- *Fonctions et structure*

La fonction principale des tonsilles est de capturer les antigènes présents dans l'environnement extérieur (notamment dans l'air inspiré et les aliments) afin de mettre en place une réponse immunitaire rapide et adaptée, préparant l'hôte à une éventuelle infection. De cette façon, les tonsilles sont reconnues comme tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT). Plus particulièrement, les tonsilles palatines et linguales peuvent, en raison de leur localisation au niveau de la cavité buccale, être considérées comme appartenant au GALT. En effet, celles-ci sont directement au contact des antigènes présents dans l'alimentation (exemple : le lait maternel) et ressemblent, d'un point de vue architectural, aux plaques de Peyer présentes au niveau de la barrière intestinale.

Les tonsilles sont des agrégats lymphoïdes composés de follicules riches en lymphocytes B autour desquels de nombreux lymphocytes T résident sous forme de zones périfolliculaires[287] (Figure 32). Comme les plaques de Peyer, celles-ci ne sont délimitées par aucune membrane ni capsule et, en raison de leur localisation à proximité du site de capture de l'antigène, ne disposent d'aucun drainage lymphatique afférent. Contrairement aux tonsilles nasales (pharyngées et tubales), tapissées d'un épithélium pseudostratifié et cilié comme le reste de l'appareil respiratoire, les tonsilles buccales (palatines et linguales) sont plutôt recouvertes

d'un épithélium pluristratifié et desquamant, en partie à cause du passage du bol alimentaire[287]. Afin d'amplifier la surface d'échanges, celui-ci forme une ou plusieurs cryptes – les cryptes tonsillaires – au fond desquelles résident de nombreuses cellules immunitaires (lymphocytes T, lymphocytes B, plasmocytes, macrophages, cellules dendritiques,…) (Figure 32). De façon intéressante, la présence de cellules M fonctionnelles au sein des tonsilles pharyngées a bien été décrite[288,289]. De ce fait, leur existence au sein des tonsilles buccales reste hautement probable.

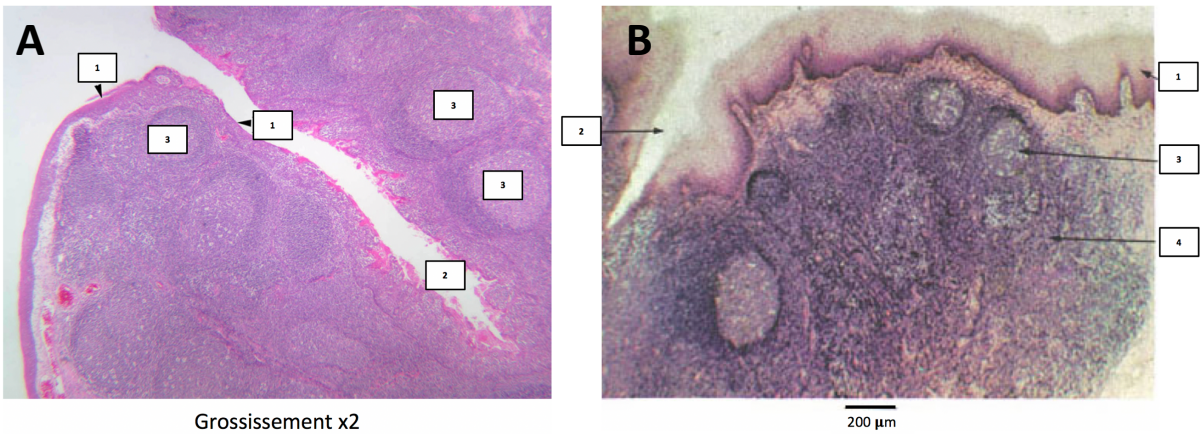


Figure 32. Structure des tonsilles
Coupes histologiques de tonsilles palatines humaines. L'épithélium pluristratifié desquamant (1) forme des cryptes tonsillaires (2). En deçà, des follicules de lymphocytes B (3) sont présents et dispersés au sein du tissu conjonctif dans lequel résident plusieurs cellules immunitaires (4). Marquage hématoxyline & éosine. Adapté de Digital Medical Library – Section 9 – Lymphatic System (1) et de www.medicalhistology.us (2).

- *Une porte d'entrée pour les agents pathogènes*

De par leur fonction de capture d'antigènes dans le lumen, les tonsilles peuvent jouer un rôle de porte d'entrée pour certains agents pathogènes. A la fin des années 1990, la détection d'antigènes viraux (Gag) ainsi que du génome viral du VIH-1 au sein des cellules épithéliales bordant les cryptes tonsillaires prouve la sensibilité de ces sites à l'infection par le VIH-1[290,291]. De plus, des expériences d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* permirent de mettre en évidence la présence de la protéine prion PrP^{sc}[292] ainsi que divers antigènes du virus de la rougeole[293] au sein des tonsilles bovines et humaines, respectivement. Enfin, des lymphocytes productivement infectés par EBV ont été détectés au sein de tonsilles humaines[294], et il a été démontré que ce virus était capable de franchir un modèle *in vitro* d'épithélium tonsillaire par transcytose[295]. Ainsi, les tonsilles pourraient jouer un rôle non négligeable dans la

transmission des virus transmis par voies respiratoire et orale, incluant ceux transmis au cours de l'allaitement maternel.

D. Détournement et franchissement de la barrière intestinale par les agents pathogènes

De par sa vaste surface d'échanges, l'épithélium intestinal constitue une porte d'entrée privilégiée pour de nombreux agents pathogènes (bactéries, levures, prions, virus). Bien que les différents acteurs de la barrière intestinale agissent en concert afin d'empêcher les micro-organismes de franchir l'épithélium intestinal, différentes stratégies ont été développées par ces derniers afin de détourner les différents acteurs de la barrière intestinale. Parmi ces stratégies, on distingue le passage paracellulaire par ouverture des jonctions serrées, le passage via les prolongements luminaux des cellules phagocytaires, et le passage transcellulaire suite à l'infection productive des entérocytes ou la transcytose à travers certaines cellules épithéliales.

1. Une porte d'entrée pour les bactéries, les levures, et les prions

Au niveau de l'intestin grêle, où les barrières microbiologique et chimique sont constamment emportées avec le chyle, certaines bactéries et levures parviennent à entrer en contact avec l'épithélium intestinal. De plus, afin d'optimiser ces contacts, certaines d'entre elles sont capables de franchir la barrière chimique résiduelle (mucus et peptides antimicrobiens) en se déplaçant à travers le réseau lâche de mucines, en dégradant le mucus, et en résistant aux PAMs[296]. De par cette résistance, l'accumulation de produits bactériens et/ou fongiques stimule la production massive de PAMs par l'épithélium intestinal, pouvant contribuer à la mise en place d'un contexte inflammatoire résultant en une perturbation de l'épithélium et du microbiote intestinal (dysbiose). L'affaiblissement de la barrière microbiologique favorise alors la prolifération des agents pathogènes extérieurs alors que la perméabilisation de l'épithélium intestinal facilite le passage de nombreuses bactéries et levures par voie paracellulaire.

Dans un contexte non inflammatoire, certaines bactéries et levures ayant franchi la barrière chimique sont capables d'adhérer solidement à la surface de l'épithélium intestinal afin de

résister aux contraintes mécaniques du transit intestinal. Alors que certaines bactéries infectent directement les entérocytes (*Listeria*), d'autres gagnent la *lamina propria* sous-jacente par transcytose à travers les cellules M (*Salmonella*, *Shigella, Yersinia, Vibrio,...*), les cellules caliciformes (*Listeria*), ou suite à la capture luminale par les cellules dendritiques (*Salmonella*). De plus, certaines bactéries altèrent également plus directement l'intégrité de la barrière épithéliale, telles que *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, et certaines *Escherichia coli* entéropathogènes. De façon intéressante, la levure *Candida albicans* est capable de pénétrer l'épithélium intestinal à la fois par voies paracellulaire (en induisant la rupture des jonctions serrées) et transcellulaire (à travers les entérocytes et les cellules M)[297].

Enfin, l'acquisition du prion par voie orale est assurée par transcytose via les cellules M[298,299].

2. Une porte d'entrée pour les virus

Plusieurs virus ont également été décrits comme étant capables de franchir l'épithélium intestinal. Ce franchissement est assuré par infection productive des cellules épithéliales intestinales ou par transcytose, et peut être accompagné d'une rupture de l'intégrité de la barrière physique par perturbation des jonctions serrées, autorisant le passage paracellulaire de nombreuses autres particules virales luminales (Figure 33).

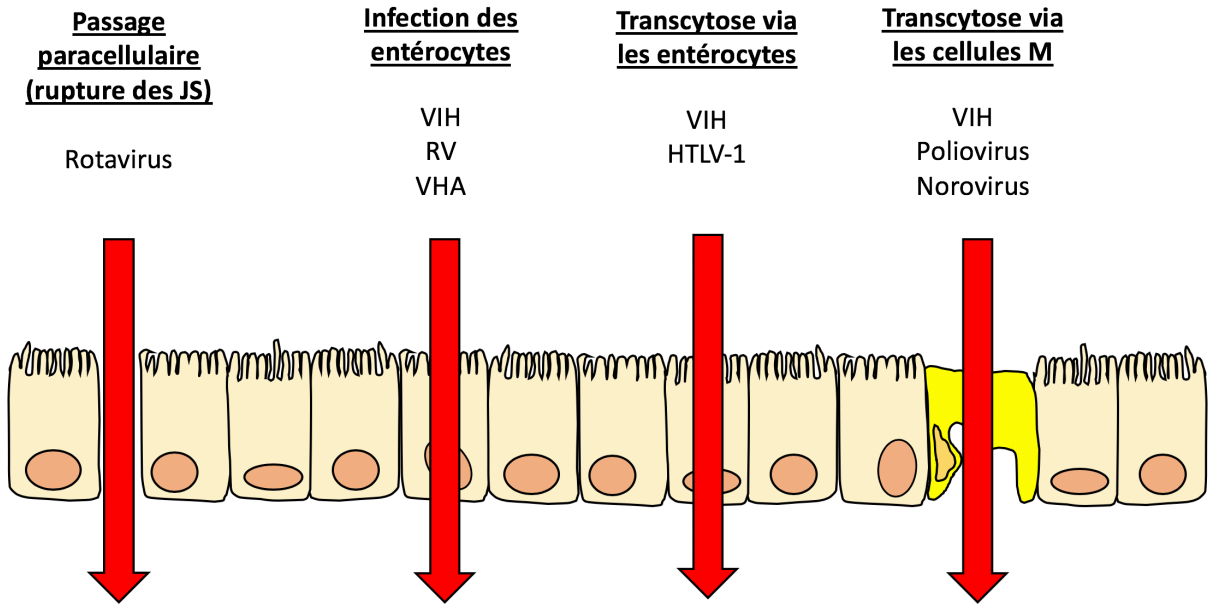


Figure 33 : Mécanismes de franchissement de la barrière intestinale par les virus

Légende en page suivante.

Le Rotavirus est capable d'infecter les entérocytes et d'induire la perméabilisation de l'épithélium intestinal. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peut franchir l'épithélium intestinal par transcytose à travers les entérocytes ou les cellules M. L'infection des entérocytes par le VIH a également été démontrée. Bien que non efficace, l'infection productive des entérocytes par le virus de l'hépatite A (VHA) peut contribuer à une libération de particules virales sous l'épithélium intestinal. Le virus HTLV-1 franchit l'épithélium intestinal par transcytose à travers les entérocytes. Le poliovirus et le norovirus exploitent les cellules M pour traverser l'épithélium intestinal par transcytose. JS : jonctions serrées.

- Le Rotavirus (RV)

Les Rotavirus (RV) constituent une cause majeure de déshydratation chez les enfants de moins de 5 ans et sont à l'origine de sévères gastro-entérites dont les manifestations les plus fréquentes sont les diarrhées (diarrhées de malabsorption).

Il a été démontré que les RV infectaient les entérocytes et induisaient leur mort cellulaire par apoptose[300], provoquant des dommages épithéliaux importants associés à une perte d'étanchéité de la barrière intestinale[301]. Par des études réalisées *in vitro,* l'apoptose induite par l'infection RV a été caractérisée comme étant intrinsèque (voie mitochondriale)[302] et dépendante de la protéine non structurale NSP4[303]. Essentiellement sécrétée via le pôle apical des entérocytes infectés[304], la protéine NSP4 libre constitue en effet une entérotoxine virale suffisante pour la perméabilisation de l'épithélium intestinal[305], autorisant ainsi le franchissement de la barrière intestinale par les particules virales présentes dans le lumen intestinal.

De façon intéressante, une étude récente a démontré que plusieurs particules virales RV pouvaient également être empaquetées et excrétées au sein de larges vésicules extracellulaires (entre 5 et 15 particules virales/vésicule) dans les fèces de porc et de souris[306], permettant à la fois leur stabilisation durant la transmission oro-fécale de RV mais également l'augmentation de l'efficacité de la transmission orale et de pathogénicité associée (par augmentation de la multiplicité d'infection au niveau de l'épithélium intestinal)[306].

- Le Poliovirus (PV)

Le poliovirus (PV) est essentiellement transmis par voie orale. En infectant *ex vivo* des explants humains de plaques de Peyer avec différentes souches du PV-1 (souche sauvage Mahoney et

souche vaccinale Sabin), il a été démontré que celles-ci ciblaient préférentiellement les cellules M[307]. En utilisant un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal enrichi ou non en cellules M, Ouzilou et ses collègues démontrèrent que le poliovirus franchit l'épithélium intestinal humain par transcytose via les cellules M[308]. De plus, l'inoculation directe de la souche Sabin du PV-1 dans l'iléum de macaques rhésus résulte en une internalisation du virus par les cellules M villositaires, renforçant l'hypothèse du rôle de ces cellules dans le franchissement de la barrière intestinale par le poliovirus. De façon intéressante, le lipopolysaccharide (LPS) dérivé de la membrane externe des bactéries à Gram négatif interagit avec la surface de la particule poliovirale afin d'augmenter sa stabilité (persistance dans l'environnement) et son attachement aux cellules cibles[309].

- Le VIH-1

Dans le cadre de l'allaitement maternel, le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) peut être transmis au nourrisson par voie orale. Alors que la perméabilité de l'épithélium intestinal du nouveau-né pourrait permettre le passage paracellulaire de cellules infectées au cours des premiers jours après la naissance, le franchissement de celui-ci lorsqu'il est imperméable est assuré par d'autres mécanismes. Dans un premier temps, l'infection des entérocytes à différentes souches du VIH a été démontrée *in vitro* sur cellules Caco-2[310]. L'infection de celles-ci est dépendante de l'expression du récepteur galactosyl-céramide (GalCer), qui remplace le récepteur CD4, et des co-récepteurs CCR5 et CXCR4[310]. Une stratégie alternative et plus rapide de franchissement de la barrière intestinale par le VIH a également été mise en évidence : la transcytose[239]. De façon intéressante, la présence d'anticorps dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe virale (gp120) ou le récepteur GalCer inhibe ce processus. L'inhibition de la transcytose du VIH-1 par les anticorps peut également être assurée par neutralisation intracellulaire au cours de la transcytose basolatéro-apicale des IgA ou des IgM[311]. Enfin, le rôle des cellules M dans la transcytose du VIH a également été démontré[310,312].

- HTLV-1

Le virus HTLV-1 est transmis de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel. Celui-ci se propage essentiellement de cellule en cellule par l'intermédiaire de biofilms viraux[313], de synapses virologiques[314], et de conduits cytoplasmiques[315]. A l'heure actuelle, les mécanismes de transmission de ce virus au cours de l'allaitement maternel restent peu connus, mais l'épithélium intestinal pourrait constituer une porte d'entrée. Dans les années 1990, Zacharopoulos et ses collègues ont démontré la sensibilité des entérocytes à l'infection par HTLV-1[316]. Suite à la co-culture de lymphocytes infectés avec la lignée entérocytaire humaine I407, des contacts rapprochés entre les deux types cellulaires furent observés avec une excrétion de particules virales libres dans l'espace périplasmique[316]. En revanche, la lignée utilisée (I407) est aujourd'hui reconnue par l'ATCC comme contaminée par des cellules HeLa, rendant ces résultats peu pertinents. Dans notre laboratoire, il a été démontré que la co-culture de lymphocytes infectés par HTLV-1 avec un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal (cellules Caco-2) conduisait en effet à un transfert des particules virales depuis la cellule infectée vers les entérocytes, mais sans infection de ces derniers[244]. De façon intéressante, l'utilisation de ce modèle permit de mettre en évidence un franchissement du modèle *in vitro* d'épithélium intestinal par transcytose au sein des entérocytes, sans aucune altération de la fonction de barrière[244]. Enfin, lorsque des cellules dendritiques humaines sont mises en culture au pôle basolatéral des entérocytes, la transcytose d'HTLV-1 à travers le modèle d'épithélium intestinal résulte en l'infection de ces cellules, elles-mêmes capables de transmettre l'infection à des lymphocytes T[244], démontrant la capacité du virus HTLV-1 à franchir un modèle simplifié de barrière intestinale.

- Les virus des hépatites

Les virus de l'hépatite A (VHA) et de l'hépatite E (VHE) sont majoritairement transmis par voie oro-fécale suite à l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés.

Concernant le VHA, Blank et collègues ont montré que l'infection d'un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal par le VHA résultait, sans perte d'intégrité de la barrière, en une production virale majoritaire par le pôle apical, la production basolatérale représentant environ 1% de la production apicale[317]. Les mécanismes de transcytose pouvant être à

l'origine de ce faible pourcentage de néovirions dans le compartiment basolatéral n'ont cependant pas été expérimentalement recherchés dans cette étude.
A ce jour, aucune étude publiée n'a démontré le franchissement de la barrière intestinale par le VHE.

- Le Norovirus (NoV)

Les Norovirus (NoV) sont responsables de la majorité des gastro-entérites virales et d'environ 200 000 décès infantiles chaque année[318]. Après ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, ceux-ci interagissent avec différents acteurs de la barrière intestinale afin de franchir l'épithélium intestinal. En effet, l'interaction entre le NoV et certains agents commensaux du microbiote intestinal pourrait favoriser l'entrée virale au sein de la *lamina propria*[318], riche en cellules cibles de l'infection par le NoV (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B)[319]. *In vitro*, il a de plus été démontré que le NoV murin était capable de franchir un modèle d'épithélium intestinal murin par transcytose à travers les cellules M[320], permettant l'infection virale des lymphocytes B localisés dans les plaques de Peyer[319].

Pour conclure, les mécanismes de franchissement de la barrière intestinale par les virus sont généralement associés à une infection des cellules épithéliales ou à une transcytose à travers les entérocytes ou les cellules M. De plus, certains facteurs peuvent faciliter l'entrée virale dans l'organisme au niveau de la barrière intestinale, tels que certains produits microbiens (LPS), ou au contraire inhiber certains mécanismes de franchissement (IgA).
Alors que certains virus ont été détectés dans le lait maternel et potentiellement associés à une transmission au cours de l'allaitement, tels que ZIKV, le rôle de la barrière intestinale dans l'entrée virale n'a cependant pas été investigué.

PROJET DOCTORAL

CONTEXTE ET OBJECTIFS GENERAUX

Durant les deux dernières décennies, ZIKV a émergé dans les îles du Pacifique et en Amérique latine. Ces émergences ont focalisé l'intérêt de nombreuses études et fourni de nouvelles découvertes concernant le pouvoir pathogène et les modes de transmission de ZIKV. En effet, si la plupart des infections restaient asymptomatiques ou conduisaient à des symptômes cliniques mineurs (fièvre, éruption cutanée, myalgie, arthralgie…), l'augmentation du nombre de cas infectés au cours des flambées épidémiques a permis de réaliser le potentiel pathogène de ZIKV pour provoquer des manifestations sévères telles que des syndromes de Guillain-Barré chez l'adulte et des syndromes congénitaux liés à Zika chez le fœtus. De plus, un nombre inattendu de transmissions interhumaines a été observé lors de la dernière épidémie en Amérique latine, soit pseudo-verticalement par voie transplacentaire, soit horizontalement à la suite d'un rapport sexuel. Étant donné que ZIKV a été détecté dans de nombreux fluides biologiques de personnes infectées, telles que le sperme, les sécrétions vaginales, les larmes, les prélèvements nasopharyngés, l'urine, la salive ou le lait maternel, d'autres modes de transmission interhumaine de ZIKV devraient, en l'absence d'études, être considérés.

En particulier, d'importantes charges virales de ZIKV ($2{,}9.10^4$ à $2{,}4.10^6$ copies d'ARN viral/mL) ont été détectées dans le lait maternel. Alors que l'excrétion virale dans le lait maternel a été détectée plus de 33 jours après l'apparition des symptômes, la glande mammaire pourrait jouer un rôle de réservoir. En outre, l'infection orale de macaques par ZIKV a été caractérisée et une étude de cas a récemment mis en évidence un cas de transmission de la mère à l'enfant de ZIKV au cours de l'allaitement maternel.

Dans ce travail, nous avons cherché à décrypter les mécanismes de transmission potentielle de ZIKV de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel. Dans un premier axe, nous avons étudié les interactions entre ZIKV et la glande mammaire afin de comprendre l'origine des particules infectieuses dans le lait maternel. Dans un second axe, nous avons examiné les interactions entre ZIKV et la barrière intestinale afin d'investiguer la transmissibilité des particules virales infectieuses au nourrisson via le lait maternel.

MATERIEL ET METHODES

Cette étude a été réalisée en combinant des expériences *in vitro* sur cellules primaires humaines et lignées cellulaires, et *in vivo* en utilisant un modèle murin.

1) Culture cellulaire

Toutes les cultures cellulaires ont été effectuées à 37°C en présence de 5% CO_2.

- Cellules épithéliales mammaires

Des cellules épithéliales primaires de glande mammaire humaine (HMEpiC) ont été prélevées chez une donneuse saine selon les réglementations locales et nationales sur l'obtention et la distribution de tissus humains, et fournies par le laboratoire ScienCell Research Laboratories. Ces cellules ont été cultivées sur des supports traités à la poly-L-lysine (ScienCell Research Laboratories) dans du milieu spécifiquement conçu pour la culture de ces cellules (MEpiCM, ScienCell Research Laboratories) supplémenté de facteurs de croissance (MEpiCG, ScienCell Research Laboratories) et d'un cocktail antibiotique de pénicilline/streptomycine (ScienCell Research Laboratories).

Des cellules luminales de glande mammaire humaine (lignée cellulaire MCF-7 ; ATCC HTB-22) ont été cultivées en milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12 ; Gibco, by Life Technologies) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Gibco, by Life Technologies), 100 U/mL de pénicilline (Gibco), 100 µg/mL de streptomycine (Gibco), 20 ng/mL de facteur de croissance épidermique humain (hEGF ; Peprotech), 0,5 µg/mL d'hydrocortisone (Sigma), et 10 µg/mL d'insuline (Sigma).

Des cellules myoépithéliales de glande mammaire humaine (lignée cellulaire MDA-MB-231 ; ATCC HTB-26) ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté de 10% de SVF, 100 U/mL de pénicilline, et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco).

- Cellules épithéliales intestinales

Deux lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinome du colon humain ont été utilisées : la lignée HT-29 (ATCC HTB-38) et la lignée Caco-2 (clone 4, Sigma ; clone TC7, non répertorié par le Comité International d'Authentification des Lignées Cellulaires et fourni par l'Unité Dynamique des interactions hôte-pathogènes, Institut Pasteur, Paris). Ces cellules ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté de 10% de SVF, 10mM de tampon HEPES (Sigma), 100 U/mL de pénicilline, et 100 µg/mL de streptomycine.

- Autres cellules

Des cellules épithéliales de singe vert africain (lignée cellulaire Vero E6 ; ATCC CRL-1586) ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté de 10% de SVF, 100 U/mL de pénicilline, et 100 µg/mL de streptomycine.

2) Établissement d'un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal

Afin d'étudier le franchissement de la barrière intestinale par ZIKV, un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal a été conçu au laboratoire[244].
Brièvement, $2{,}5.10^4$ cellules entérocytaires Caco-2/TC7 ont été ensemencées à la surface de filtres Transwell® (12 mm de diamètre et 3 µm de porosité, polycarbonate, Costar) et cultivées pendant au moins 21 jours. Après prolifération et différenciation, les cellules Caco-2/TC7 forment une monocouche épithéliale polarisée et imperméable délimitant un compartiment apical (chambre supérieure du dispositif) et un compartiment basolatéral (chambre inférieure du dispositif) (Figure 34). Le milieu des deux compartiments a été remplacé tous les deux jours. La validité du modèle a été confirmée en vérifiant la polarisation et l'étanchéité de la monocouche cellulaire par des observations structurales (présence de microvillosités et de jonctions serrées) et des tests fonctionnels (mesure de la résistance électrique transépithéliale TEER et de la perméabilité paracellulaire), respectivement (Figure 34).

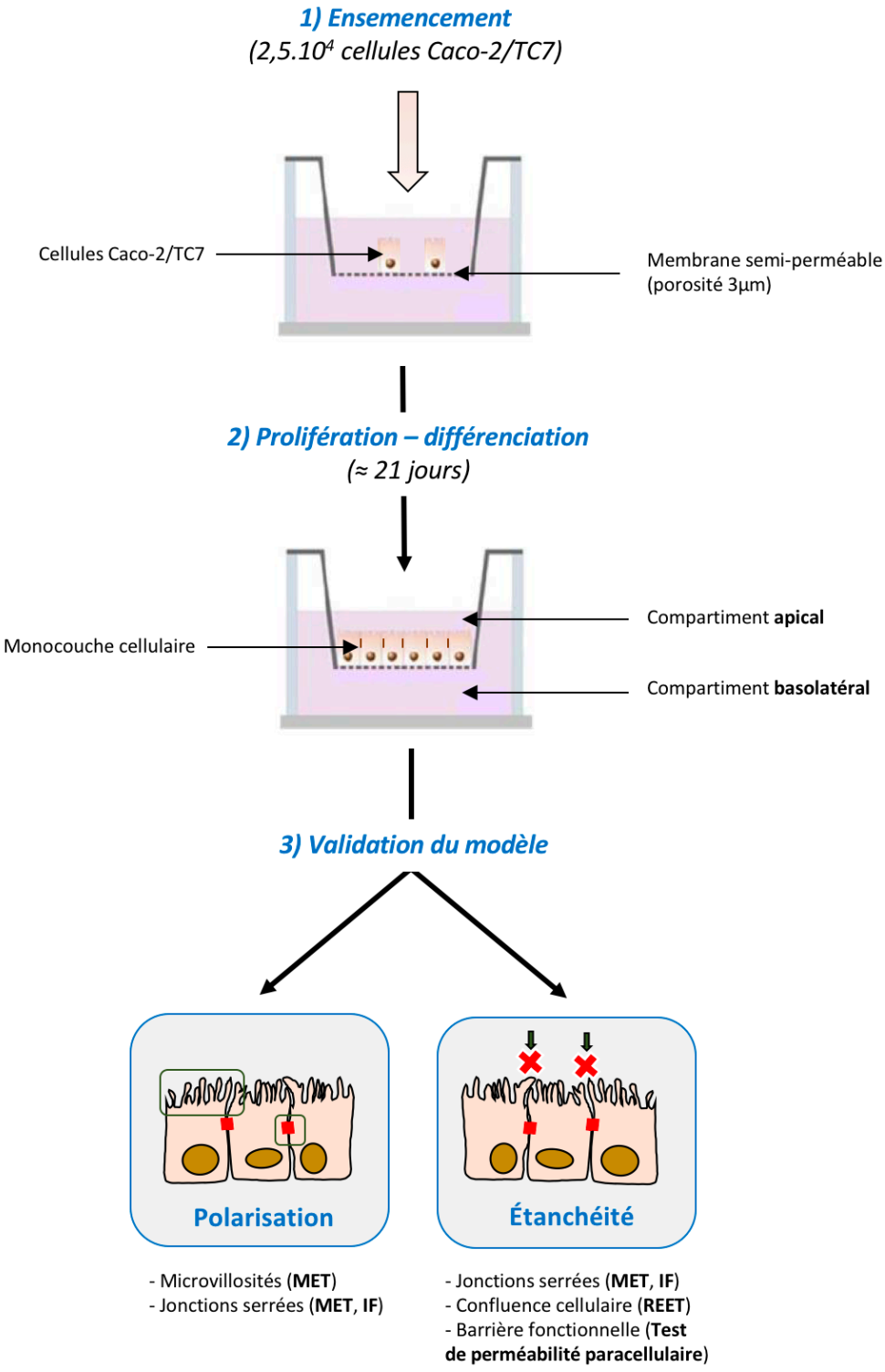


Figure 34. Modèle *in vitro* d'épithélium intestinal

Des cellules Caco-2 (clone TC7) ont été cultivées sur une membrane semi-perméable (3 µm de porosité) au sein d'un dispositif Transwell®. Au bout de 21 jours de culture, la monocouche cellulaire épithéliale délimite un compartiment apical et un compartiment basolatéral. Les vérifications de sa polarisation ainsi que de son étanchéité constituent des étapes requises afin de valider l'utilisation de cette monocouche cellulaire en tant que modèle *in vitro* d'épithélium intestinal.

3) Validation du modèle *in vitro* d'épithélium intestinal

- Observations structurales

La présence de microvillosités a été vérifiée par microscopie électronique à transmission (voir section « Microscopie électronique à transmission »).
La présence de jonctions serrées a été vérifiée par microscopie électronique à transmission (voir section « Microscopie électronique à transmission ») et par microscopie à fluorescence après marquage de la protéine adaptatrice des jonctions serrées *zonula occludens – 1* ZO-1 (voir section «Immunofluorescence »).

- Tests fonctionnels

La prolifération cellulaire et la fermeture des jonctions serrées a été approchée en mesurant régulièrement la résistance électrique transépithéliale (TEER ; EVOM World Precise Instruments) au cours du temps.
Après 21 jours de culture, la perméabilité des monocouches a été évaluée par une méthode fluorimétrique en mesurant le franchissement des monocouches Caco-2/TC7 par une petite molécule fluorescente (polymère de dextran de 4 kDa couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC)). Plus précisément, les cellules ont été lavées en PBS, et le milieu basolatéral a été remplacé par du milieu DMEM sans rouge de phénol (Gibco, by Life Technologies). Une solution de FITC – dextran 4kDa (Sigma) a été ajoutée dans le compartiment apical, et la fluorescence basolatérale causée par la diffusion apico-basolatérale du FITC – Dextran a été mesurée au cours du temps (Wallac Victor² et TECAN Infinite M1000 Pro). La perméabilité P ($cm.min^{-1}$) des monocouches a été évaluée selon la formule suivante :

$$P = \frac{a \times V_{basolatéral}}{Fluo_{inoculum} \times S}$$

avec « a » la pente de la droite (unités arbitraires.min^{-1}), « $V_{basolatéral}$ » le volume du compartiment basolatéral (cm^3), « $Fluo_{inoculum}$ » la fluorescence de l'inoculum (unités arbitraires), et « S » l'aire de la surface du filtre (cm^2).

Dans notre modèle, les monocouches dont la TEER ≥ 250 $\Omega.cm^2$ et P ≤ 10^{-5} $cm.min^{-1}$ ont été considérées comme imperméables.

4) Souris

Des souris immunodéficientes $IFNAR^{-/-}$ (lignée A129) ont été élevées à l'Institut Pasteur, dans des animaleries accréditées par le Ministère de l'Agriculture pour l'élevage et la pratique de l'expérimentation animale. L'expérimentation animale a été effectuée en accord avec les réglementations françaises et européennes sur le bien-être animal et la protection des animaux de laboratoire (Directive CE 2010/63, Loi Française 2013-118, 6 février 2013). Toutes les expériences effectuées ont préalablement été présentées et approuvées par le comité éthique n°89, puis enregistrées par le Ministère français de l'Enseignement Supérieure, de la Recherche, et de l'Innovation sous la référence "APAFIS#9594-2017041412342250v3". L'utilisation d'animaux génétiquement modifiés (souris A129) a été approuvée par les instances institutionnelles et par le Ministère français de l'Enseignement Supérieure, de la Recherche, et de l'Innovation sous le numéro 2194.

5) Virus

Trois isolats humains de ZIKV (fournies par l'Unité de recherche et d'expertise environnement et risques infectieux, Institut Pasteur, Paris) ont été amplifiés sur cellules de mammifère (lignée Vero E6) et utilisés après un nombre réduits de passages sur ces cellules (Tableau 4). Brièvement, une suspension virale a été ajoutée à la surface de monocouches cellulaires Vero E6 à 90% de confluence, selon une multiplicité d'infection de 0,1 pendant 2h à 37°C et en présence de 5% CO_2. Après cette phase d'adsorption, l'inoculum a été éliminé et remplacé par du milieu DMEM – 2% SVF jusqu'à apparition d'effets cytopathogènes (entre 3 et 6 jours). Enfin, le surnageant a été récupéré, et les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 500g pendant 10min. La suspension virale obtenue a été conditionnée en faibles volumes et congelée à -80°C jusqu'à détermination de son titre viral par titrage sur cellules Vero E6 selon la méthode des foyers d'infection.

Souche	Lignage	Origine	Production/amplification
HD78788	Africain	• Isolé chez l'Homme • Sénégal, 1991 • Souche non épidémique	Cellules de mammifère (Vero E6)
H/PF13	Asiatique	• Isolé chez l'Homme • Polynésie Française, 2013 • Souche épidémique	Cellules de mammifère (Vero E6)
Brésil/2016/INMI1	Asiatique	• Isolée chez l'Homme • Italie, 2016 • Souche épidémique	Cellules de mammifère (Vero E6)

Tableau 5. Tableau récapitulatif des souches virales de ZIKV utilisées
Toutes les souches virales ont initialement été isolées chez l'Homme, puis ont été amplifiées sur cellules de mammifère. La souche Brésil/2016/INMI1 a été isolée en Italie à partir d'un voyageur revenant d'un séjour au Brésil durant l'épisode épidémique 2015-2016.

6) Titrage par la méthode des foyers d'infection

La veille du titrage, $2{,}5.10^5$ cellules Vero E6 ont été ensemencées au fond de puits de plaques 24 puits.

Après décongélation, les échantillons à titrer ont été dilués en cascade de raison 10 en milieu DMEM – 2% SVF. Chaque dilution a été ajoutée à la surface de monocouches de cellules Vero E6 à 90% de confluence pendant 2h à 37°C et en présence de 5% CO_2. Après cette phase d'adsorption, l'inoculum a été éliminé et remplacé par du milieu semi-solide DMEM – 2% SVF supplémenté de 0,5% carboxyméthyl-cellulose (CMC ; Fisher Scientific) pendant 3 jours. La viscosité semi-solide de ce milieu permet de limiter la diffusion des particules virales libres et restreindre celle-ci à proximité des cellules adjacentes de la cellule infectée productrice. Après 3 jours, les cellules ont été fixées en PBS – 4% paraformaldéhyde (PFA) pendant 15min à température ambiante (TA), et perméabilisées en PBS – 0,1% Triton (Sigma) pendant 3min à TA. Les sites non spécifiques ont été saturés en PBS – 1% albumine de sérum bovin (ASB ; Sigma) – 0,1% Tween 20 (Sigma) pendant au moins 30min à TA. La protéine d'enveloppe E de ZIKV (E(ZIKV)) a été indirectement marquée à l'aide d'un anticorps murin anti-E (clone 4G2) pendant 2h à TA comme anticorps primaire, et d'un anticorps caprin anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort (Biorad) pendant 1h à TA comme anticorps secondaire. Enfin, le substrat de l'HRP (Vector Vip ; Vector Laboratories), extemporanément préparé, a été ajouté pendant

environ 15min à TA, permettant la révélation des foyers d'infection. Ces derniers ont été comptés manuellement, permettant de déterminer le titre viral des échantillons.

7) Infection des souris

Afin d'étudier la dissémination de ZIKV dans les glandes mammaires, des souris adultes femelles âgées de 8 à 14 semaines ont été infectées par voie intrapéritonéale (infection systémique) ou sous-cutanée (infection locale) par $3{,}2.10^5$ UFF ou $6{,}6.10^5$ UFF de la souche américaine de ZIKV (Brésil/2016/INMI1), respectivement. L'infection a été suivie en mesurant la charge virale par qRT-PCR dans le plasma, la rate, les ganglions lymphatiques inguinaux, et la quatrième glande mammaire après excision du ganglion lymphatique inguinal. Une perfusion intracardiaque a été réalisée en PBS avant chaque prélèvement d'organe afin de limiter la contamination des organes avec le sang. Les souris ont été mises à mort lorsqu'une perte de masse supérieure ou égale à 20% de la masse initiale ou supérieure ou égale à 10% de la masse initiale en association avec un ou plusieurs symptômes de souffrance ont été observés.

Afin d'étudier la sensibilité des souriceaux à l'infection orale par ZIKV, des souris adultes mâles et femelles ont été mis en accouplement. Au bout de 19 à 21 jours de gestation, différentes portées de 4 à 7 souriceaux ont été obtenues. Les souriceaux ont été exposés à deux administrations orales successives par 1.10^5 et 2.10^5 UFF de la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV à l'âge de 2 et 5 jours, respectivement. Trois jours après chaque administration, la charge virale dans le plasma a été déterminée par qRT-PCR et titrage sur cellules Vero E6. La masse des souriceaux a été suivie tous les deux jours et l'intégralité d'une portée a été mise à mort dès l'observation d'une morbidité ou mortalité chez un souriceau de cette même portée. La rate et le cerveau ont été collectés chez les souriceaux mis à mort.

Afin d'étudier la transmissibilité de ZIKV par allaitement maternel, des souris adultes mâles et femelles ont été mis en accouplement. Au bout de 19 à 21 jours de gestation, différentes portées de 4 à 7 souriceaux ont été obtenues. Trois jours post-partum, les souris mères ont été exposées à $2{,}8.10^6$ UFF de la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV par voie intra-péritonéale. Deux et six jours après infection de la mère, la charge virale plasmatique a été

déterminée par qRT-PCR. Les masses des souris mères ainsi que des souriceaux ont été suivies tous les deux jours. Les souris mères ont été mises à mort lorsqu'une perte de masse supérieure ou égale à 20% de la masse initiale ou supérieure ou égale à 10% de la masse initiale en association avec un ou plusieurs symptômes de souffrance ont été observés.

8) Infection des cellules

Différentes lignées cellulaires et cellules primaires ont été infectées avec la souche africaine (HD78788), asiatique (H/PF13), ou américaine (Brésil/2016/INMI1/INMI1) de ZIKV à différentes multiplicités d'infection selon l'expérience. Après 2 à 4h d'adsorption, les cellules ont été lavées en PBS, et le milieu a été remplacé par du milieu DMEM – 2% SVF. A différents temps, l'infection a été suivie par immunofluorescence, puis quantifiée par cytométrie en flux après marquage de E(ZIKV). La production virale dans le surnageant a été mesurée par qRT-PCR et titrage sur cellules Vero E6.

Afin d'étudier le franchissement du modèle *in vitro* d'épithélium intestinal, plusieurs doses (10^4, 10^5, et 10^6 UFF) de la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV ont été ajoutées sur le pôle apical des monocouches Caco-2/TC7 différenciées, polarisées, et imperméables. Après 2h d'adsorption, le milieu a été remplacé par du milieu DMEM – 2% SVF. L'altération des monocouches infectées et non infectées a été évaluée selon les méthodes décrites dans la section « Validation du modèle *in vitro* d'épithélium intestinal », et la production virale dans les surnageant apical et basolatéral a été évaluée à différents temps par qRT-PCR et titrage sur cellules Vero E6.

9) Immunofluorescence (IF)

Afin d'étudier la sensibilité des différents types cellulaires à l'infection ZIKV, la protéine E(ZIKV) a été marquée et observée par microscopie à fluorescence. A différents temps après infection, le surnageant cellulaire a été éliminé et les cellules ont été lavées en PBS. Ensuite, celles-ci ont été fixées en PBS – 4% PFA pendant 15min à TA, puis perméabilisées en PBS – 0,1% Triton pendant 3min à TA. Les sites non spécifiques ont été saturés en PBS – 1% ASB – 0,1% Tween

20 pendant au moins 30min à TA. E(ZIKV) a été marquée de façon indirecte en utilisant l'anticorps primaire murin anti-E (clone 4G2) en PBS – 0,2% ASB – 0,2% Tween 20 pendant toute une nuit à 4°C, et l'anticorps secondaire caprin anti-souris conjugué au fluorochrome Alexa Fluor 488 (Life Technologies) en PBS – 0,2% ASB pendant 30min à TA. Enfin, les préparations ont été montées en milieu de montage contenant du DAPI (Fluoromount G – DAPI ; Southern Biotech) et observées par microscopie à fluorescence (EVOS FL, Life technologies). Les cellules ont été lavées en PBS entre chaque étape.

La présence de jonctions serrées dans les cellules Caco-2/TC7 cultivées sous forme de modèle *in vitro* d'épithélium intestinal a été vérifiée par microscopie à fluorescence en visualisant la distribution subcellulaire de la protéine ZO-1. Les cellules ont été fixées en PBS – 80% méthanol (Sigma) pendant 15min à TA, puis perméabilisées en PBS – 0,2% Triton pendant 5min à TA. Les sites non spécifiques ont été saturés en PBS – 5% ASB pendant 30min à TA. La protéine ZO-1 a été immunodétectée avec un anticorps primaire de lapin anti-ZO-1 (Invitrogen) pendant toute une nuit à 4°C, et un anticorps secondaire d'âne anti-lapin conjugué au fluorochrome Alexa Fluor 546 (Invitrogen) pendant 1h à TA, en utilisant les mêmes tampons que précédemment. Enfin, les préparations ont été montées en milieu de montage contenant du DAPI et observées par microscopie à fluorescence. Les cellules ont été lavées en PBS entre chaque étape.

10) Microscopie électronique à transmission (MET)

Afin d'observer les microvillosités au pôle apical ainsi que les jonctions serrées entre les cellules Caco-2/TC7 cultivées sous forme de modèle *in vitro* d'épithélium intestinal, les monocouches ont été lavées en PBS puis fixées en tampon phosphate 0,1M supplémenté de 4% PFA et 1% glutaraldéhyde (Sigma) pendant plus de 24h à TA.
Les échantillons ont ensuite été sous-traités à la plate-forme IBiSA de microscopie électronique de Tours, selon le protocole décrit par Monel et collègues[321].

11) Cytométrie en flux

48h après infection, les cellules infectées par ZIKV, exprimant E(ZIKV), ont été quantifiées par cytométrie en flux. Le surnageant cellulaire a été éliminé, et les cellules ont été lavées en PBS. Les cellules ont été décollées et dissociées sous l'action de la trypsine (Gibco, by Life Technologies). Le marquage intracellulaire de E(ZIKV) a été réalisé comme précédemment (voir section « Immunofluorescence »), mis à part que les marquages primaire et secondaire ont été réalisés pendant 20 min et 40 min à TA, respectivement. Les données ont été acquises par FACS (« Fluorescence Activating Cell Sorting », en anglais) par un cytomètre de flux cytoFLEX® (Beckman Coulter) et analysées en utilisant le logiciel FlowJo 10.0.8r1.

12) Tri cellulaire

Les glandes mammaires de trois souris ont été regroupées et broyées mécaniquement en milieu CO_2 indépendant (Gibco, by Life Technologies), puis digérées de façon enzymatique en présence de 3 mg/mL de collagénase A (Roche) et 100 U/mL de hyaluronidase (Sigma) pendant 2h à 37°C sous agitation douce. Les cellules ont ensuite été dissociées sous l'action successive de la trypsine à 0,25% pendant 1 min à TA, puis d'une solution contenant 5mg/mL de dispase II (Roche) et 10 mg/mL de DNase I (Sigma) pendant 5 min à 37°C. Les érythrocytes ont été éliminés sous l'action d'un tampon de lyse à base de chlorure d'ammonium (StemCell Technologies) pendant 5min à TA, et la suspension cellulaire filtrée sous 40 µm.
Les différentes populations cellulaires mammaires ont été séparées par MACS (« Magnetic Activating Cell Sorting », en anglais) à l'aide d'anticorps anti-CD45 (Miltenyi Biotec), et anti-CD31 (Miltenyi Biotec) couplés à des billes magnétiques, en suivant les recommandations du fabricant.

13) Coloration des glandes mammaires au rouge carmin

Les glandes mammaires thoraciques (paire n°3) ont été prélevées, étalées sur une lames de verre, puis fixées en Méthacarn (tampon de fixation composé de 60% méthanol, 30% chloroforme, et 10% acide acétique) pendant une nuit à TA. Après rinçage en éthanol (70%) et en eau, les spécimens ont été colorés au rouge carmin pendant une nuit à 4°C, à l'obscurité. Après coloration, les tissus ont été lavés en eau, déshydratés par passages successifs dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (50%, 70%, 95%, 100%, 100%, 45min par bain),

puis transparisés par deux passages successifs de 45min en xylène (Sigma). Enfin, les échantillons ont été observés sous une loupe binoculaire (MZ16 A ; Leica).

14) PCR quantitative (qRT-PCR)

Selon la nature de l'échantillon, l'extraction d'ARN a été adaptée (Tableau 5).

Méthode d'extraction d'ARN	Matériel d'origine
QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) pour échantillons acellulaires	• Surnageants cellulaires (ARN extracellulaires) • Plasmas des souris et souriceaux
RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)	• Cellules *in vitro* (ARN intracellulaires) • Organes de souris adultes (exceptées les glandes mammaires)
Trizol (Invitrogen)	• Glandes mammaires de souris adultes • Organes des souriceaux

Tableau 6. Tableau récapitulatif des méthodes d'extraction d'ARN utilisées
L'ARN provenant d'échantillons acellulaires (surnageants cellulaires et plasmas sanguins) a été extrait en suivant les recommandations du fabricant du kit « QIAmp Viral RNA Mini Kit » (Qiagen). L'ARN provenant d'échantillons cellulaires (cellules, fragments d'organes) a été extrait en suivant les recommandations du fabricant du kit « RNeasy Plus Mini Kit » (Qiagen). L'ARN provenant d'organes entiers de souriceaux ou d'organes riches en tissu adipeux (glandes mammaires) a été extrait par la méthode du Trizol (Invitrogen).

La transcription inverse des ARN totaux en ADN complémentaires (ADNc) a été effectuée à partir de 11 µL d'ARN total en utilisant des hexamères nucléotidiques aléatoires comme amorces non spécifiques et en suivant le protocole et les recommandations du fournisseur (kit Maxima H Minus Reverse-Transcriptase ; Invitrogen).
La quantification du génome viral a été effectuée en amplifiant une région du gène NS5 de ZIKV. La PCR quantitative a été réalisée dans un volume final de 20 µL à partir de 5 µL d'ADNc en présence de 500 nM d'amorce sens (5' – AAR TAC ACA TAC CAR AAC AAA GTG GT – 3'), 500 nM d'amorce anti-sens (5' – TCC RCT CCC YCT YTG GTC TTG – 3'), et 10 µL de Master Mix (iTaq Universal SYBR Green Supermix, Biorad), selon le programme suivant : une dénaturation initiale 95°C/10min suivie de 40 cycles triple-étapes de dénaturation 95°C/15s, d'hybridation 60°C/20s, et d'élongation 72°C/30s (Mastercycler Eppendorf Realplex). La quantification du

nombre de copies d'ARN viral dans les échantillons a été réalisée un utilisant une gamme d'étalonnage de plasmides codant pour le génome viral de ZIKV.

15) Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Prism 7 avec l'aide du Centre de Bioinformatique, de Biostatistiques et de Biologie Intégrative (C3BI ; Institut Pasteur, Paris). Les tests utilisés pour chaque expérience ont été détaillés en légende et le seuil de significativité a été fixé à 0,05 avec * pour $p < 0,05$, ** pour $p < 0,005$, *** pour $p < 0,0005$, et **** pour $p < 0,0001$. Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne ± déviation standard (SD).

RESULTATS

AXE I : ORIGINE DES PARTICULES VIRALES INFECTIEUSES ZIKV DANS LE LAIT MATERNEL

– INTERACTION ZIKV ET GLANDES MAMMAIRES –

Dans cette partie, nous avons exploré les **interactions entre ZIKV et les glandes mammaires** afin de déterminer l'origine des particules virales infectieuses de ZIKV dans le lait maternel. En utilisant un modèle murin d'infection ZIKV, nous avons étudié *in vivo* le processus de dissémination virale dans les glandes mammaires après une infection systémique ou locale, ainsi que les modulations de l'architecture mammaire au cours de l'infection. *In vitro*, nous avons également étudié la permissivité de cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines ainsi que le rôle potentiel des cellules luminales et myoépithéliales dans l'excrétion virale de ZIKV dans le lait maternel.

- ***ZIKV dissémine dans les glandes mammaires de souris infectées***

Dans un premier temps, nous avons exploré le potentiel intrinsèque de dissémination de ZIKV dans les glandes mammaires non lactantes de souris A129 (souris déficientes en récepteurs aux interférons de type I) suite à une infection systémique. Ainsi, nous avons exposé des souris femelles adultes et nullipares (n'ayant jamais été gestantes) à une souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV par voie intrapéritonéale ($3{,}2.10^6$ UFF/souris). D'un point de vue symptomatologique, l'évolution de la masse de ces souris est relativement similaire à celle des souris non infectées (Figure 35, ligne noire). De plus, les souris exposées à ZIKV développent une virémie à 3 jours post-infection qui décline à 6 jours post-infection (Figure 36A, symboles noirs), confirmant l'infection aiguë de ces souris. De façon attendue, le génome viral a également été détecté dans la rate de 3 à 13 jours post-infection (Figure 36B, symboles noirs), y compris en absence de virémie. Riche en cellules cibles, cet organe constitue en effet un réservoir important de l'infection ZIKV. Enfin, nous avons également détecté une charge virale importante ($1{,}2.10^5$ copies d'ARN viral/mg de tissu) dans les glandes mammaires abdominales dès 3 jours post-infection (Figure 36C, symboles noirs), suggérant une expansion rapide de ZIKV dans les glandes mammaires à partir de la circulation sanguine. De façon intéressante, celle-ci décline rapidement sans être totalement éliminée entre 9 et 13 jours post-infection ($1{,}1.10^3$ et $4{,}6.10^2$ copies d'ARN viral/mg, respectivement), suggérant que ZIKV infecte les glandes mammaires nullipares de façon transitoire. Ces résultats démontrent que l'infection systémique ZIKV de souris A129, moins immunocompromises que le modèle AG129, entraîne également une dissémination virale rapide dans les glandes mammaires nullipares.

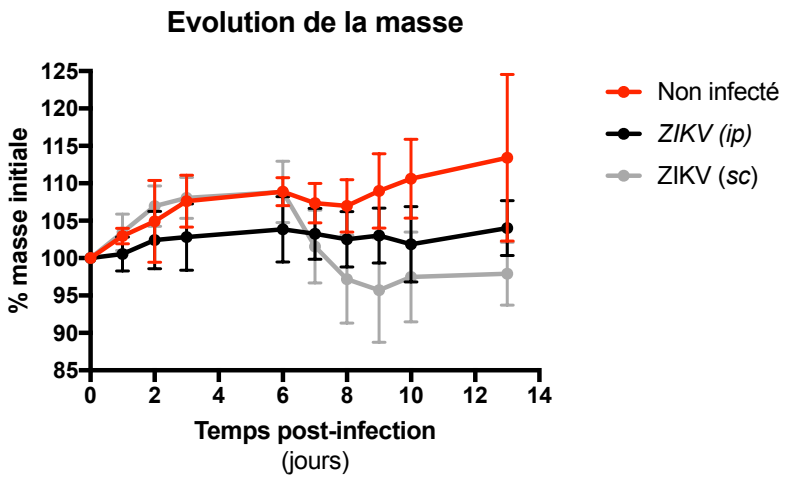


Figure 35. Évolution de la masse des souris non infectées et infectées par ZIKV

Des souris A129 femelles adultes et nullipares âgées de 8 à 14 semaines ont systémiquement (3,2.10^6 UFF/souris, voie intrapéritonéale, courbe noire) ou localement (6,6.10^6 UFF/souris, voie sous-cutanée, courbe grise) été infectées par une souche américaine de ZIKV (Brésil/2016/INMI1). Des souris non infectées (courbe rouge) ont été utilisées comme contrôle négatif. L'évolution de la masse a été suivie au cours du temps et les résultats ont été exprimés en pourcentage de gain ou de perte par rapport à la masse initiale.

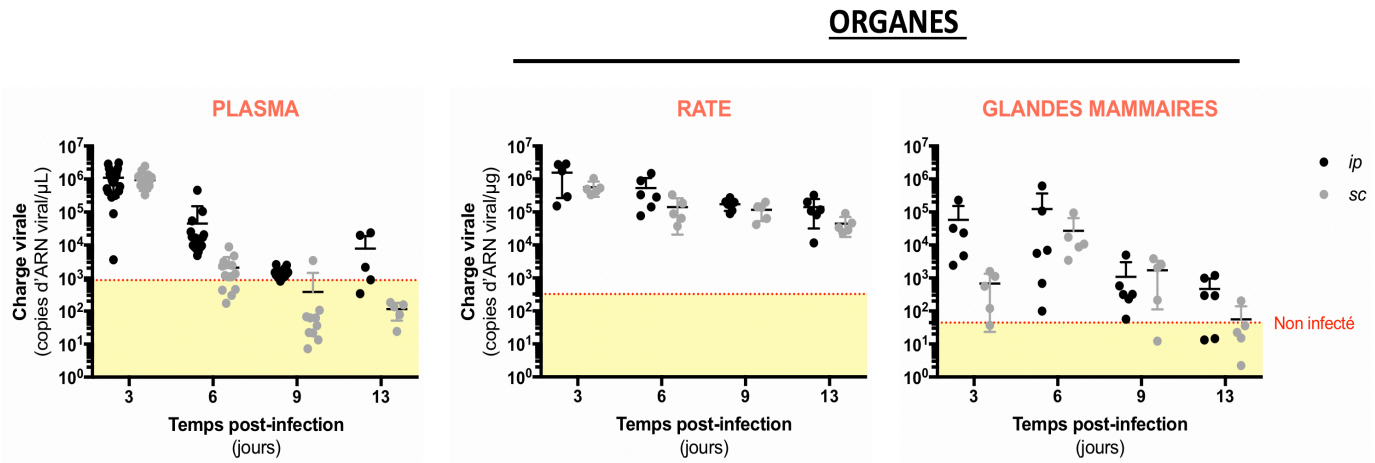


Figure 36. Charges virales dans les organes de souris non infectées et infectées par ZIKV

Des souris A129 femelles adultes et nullipares âgées de 8 à 14 semaines ont systémiquement (3,2.10^6 UFF/souris, voie intrapéritonéale, symboles noirs) ou localement (6,6.10^6 UFF/souris, voie sous-cutanée, symboles gris) été infectées par une souche américaine de ZIKV (Brésil/2016/INMI1). Le plasma, la rate, et les glandes mammaires ont été collectés à 3, 6, 9, et 13 jours post-infection. La charge virale y a été mesurée par qRT-PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène viral NS5. Les résultats ont été exprimés en nombre de copies d'ARN viral/µL de plasma ou /mg de tissu. La ligne rouge pointillée représente la limite de spécificité de la méthode.

- ***La cinétique de dissémination de ZIKV dans les glandes mammaires murines dépend de la voie d'infection***

Étant donné que ZIKV est principalement transmis suite à une piqûre de moustique infecté, nous avons répété l'expérience en infectant des souris femelles adultes et nullipares de façon locale (voie sous-cutanée), et comparé la cinétique du processus de dissémination vers les glandes mammaires selon la voie d'administration. De façon classique, les souris exposées à ZIKV par voie sous-cutanée perdent du poids à partir de 6 jours post-infection (Figure 35, ligne grise) et développent une virémie dont l'intensité et la cinétique sont similaires à celle des souris infectées par voie systémique (Figure 36A, symboles gris). Comme pour ces dernières, ZIKV a également été détecté dans la rate à 3, 6, 9, et 13 jours post-infection (Figure 36B, symboles gris). Alors que le génome viral de ZIKV est également détecté dans les glandes mammaires à partir de 3 jours post-infection, la charge virale dans cet organe continue d'augmenter entre 3 et 6 jours post-infection (Figure 36C, symboles gris) avant de décliner à 9 jours ($1{,}7.10^3$ copies d'ARN viral/mg) et 13 jours ($5{,}6.10^1$ copies d'ARN viral/mg) post-infection (Figure 36C, symboles gris). Comparativement aux glandes mammaires de souris infectées par voie systémique où la charge virale apparaît sous forme de plateau dès 3 jours post-infection (Figure 37, gauche), la dissémination virale de ZIKV dans les glandes mammaires suite à une infection locale se présente plutôt sous l'allure d'un pic dont la charge virale maximale ($2{,}7.10^4$ copies d'ARN viral/mg) est retardée à 6 jours post-infection (Figure 37, droite). Celle-ci, supérieure à la virémie ($2{,}1.10^3$ copies d'ARN viral/µL de plasma), démontre que la charge virale observée cet organe ne peut être expliquée par la détection de virus circulants dans les vaisseaux sanguins mammaires. Enfin, dès 3 jours post-infection et jusqu'à 13 jours post-infection, d'importantes charges virales ont été détectées dans les ganglions lymphatiques drainant les glandes mammaires abdominales (ganglions lymphatiques inguinaux), y compris lorsque la charge virale dans la glande mammaire a décliné entre 9 et 13 jours post-infection (Figure 38, barres noires). Alors que les profils de charges virales dans les glandes mammaires (Figure 38, barres bleues) et les ganglions lymphatiques inguinaux (Figure 38, barres noires) diffèrent, ces résultats suggèrent que la dissémination virale de ZIKV dans les glandes mammaires, retardée au cours d'une infection locale, résulte en une infection du tissu mammaire.

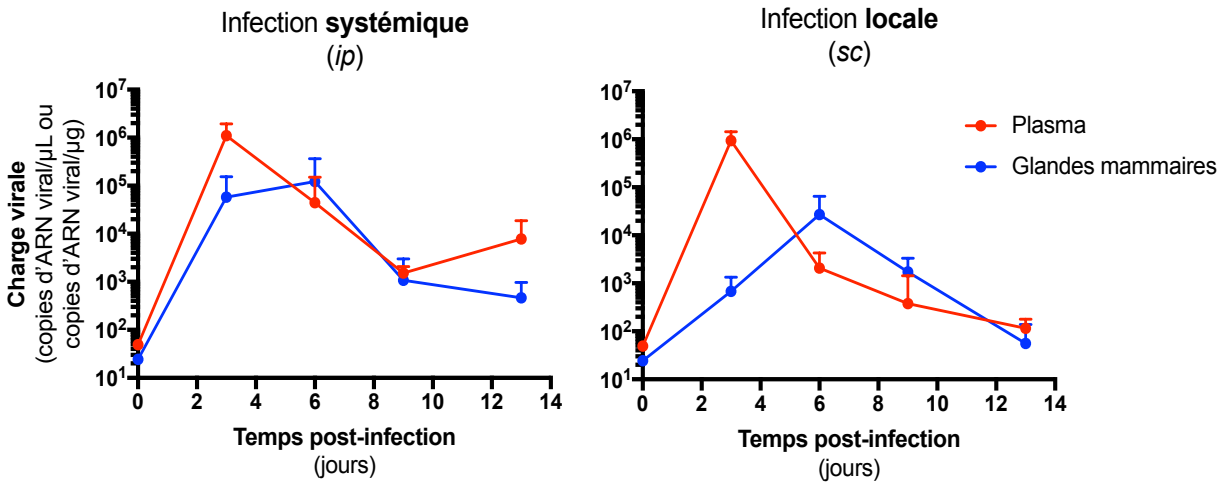


Figure 37. Comparaison de la cinétique de dissémination de ZIKV dans les glandes mammaires murines en fonction de la voie d'administration

Représentation de l'évolution de la charge virale dans la circulation sanguine (courbe rouge) et dans les glandes mammaires (courbe bleue) de souris infectées par voie systémique (voie intrapéritonéale ou *ip* ; graphe de gauche) et locale (voie sous-cutanée ou *sc* ; graphe de droite). La charge virale est exprimée en nombre de copies d'ARN viral/µL de plasma ou /mg de tissu

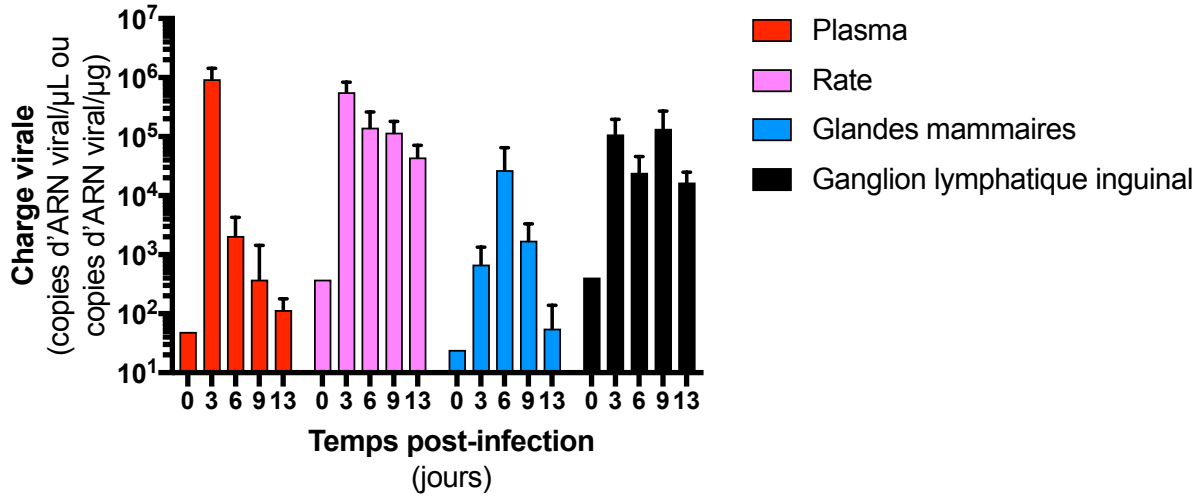


Figure 38. Graphe représentatif de la charge virale dans la circulation sanguine et dans les organes de souris infectées localement

Représentation de l'évolution de la charge virale dans le plasma (barres rouges), la rate (barres roses), les glandes mammaires abdominales (barres bleues), et les ganglions lymphatiques inguinaux (barres noires) de souris A129 femelles exposées à la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV (n=5 par temps).

- ***Différents types cellulaires des glandes mammaires murines, y compris les cellules non immunitaires et non endothéliales, sont infectées in vivo par ZIKV***

Afin de vérifier que les cellules constituant le tissu mammaire sont véritablement infectées par ZIKV au cours de l'infection, nous avons trié les différentes populations cellulaires mammaires de souris exposées à ZIKV. Ainsi, après perfusion intracardiaque en tampon PBS et excision des ganglions lymphatiques, nous avons collecté les glandes mammaires thoraciques, abdominales et inguinales de souris infectées par voie locale (sous-cutanée) lorsque la charge virale détectée dans ce tissu est maximale (6 jours post-infection). L'intégralité des glandes mammaires de trois souris ont été groupées, digérées de façon enzymatique, puis les différentes populations cellulaires ont été triées par deux séparations successives (Figure 39A). Celles-ci ont été réalisées à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques des marqueurs CD45 et CD31, permettant de séparer les populations cellulaires immunitaires ($CD45^+$) et endothéliales ($CD45^-/CD31^+$) des autres types cellulaires mammaires ($CD45^-/CD31^-$).

Dans chaque fraction, la proportion des différentes populations cellulaires mammaires (immunitaires, endothéliales, autres cellules) a été évaluée par cytométrie en flux en fonction de l'expression des marqueurs CD45 et CD31 (Figure 39B). Avant séparation (fraction F0), les cellules dissociées des glandes mammaires sont majoritairement composées de cellules non immunitaires non endothéliales (55,9 $\pm$ 4,4%) (Figure 39C). Suite à la séparation magnétique de ces cellules selon le marqueur CD45, les fractions positive (F1) et négative (F2) comportent respectivement 85,4 $\pm$ 4,9% et 1,4 $\pm$ 0,7% de cellules $CD45^+$, confirmant l'enrichissement et l'appauvrissement en cellules immunitaires dans les fractions F1 et F2 (Figure 39C). Suite à la séparation magnétique des cellules $CD45^-$ selon le marqueur CD31, la fraction positive (F3) comporte 88,3 $\pm$ 2,8 % de cellules $CD31^+$, démontrant un enrichissement en cellules endothéliales dans cette fraction. En revanche, environ 34,5 $\pm$ 13% de cellules $CD31^+$ sont également détectées dans la fraction F4. Néanmoins, celle-ci est enrichie en cellules $CD45^-/CD31^-$ (64 $\pm$ 12,7 %) correspondant aux cellules mammaires non immunitaires et non endothéliales (Figure 39C).

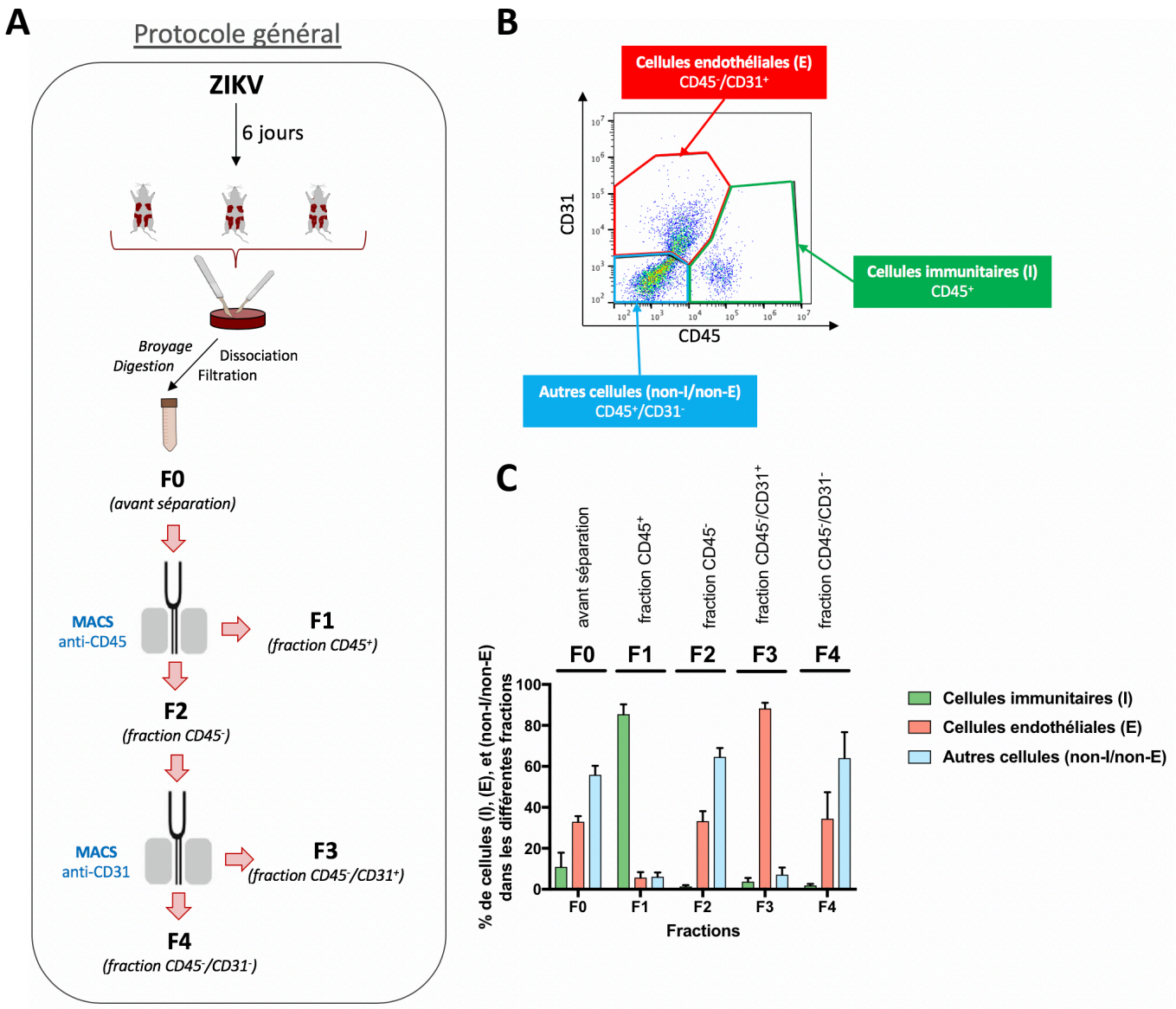


Figure 39. Contrôle de l'efficacité de séparation des types cellulaires mammaires

(A) Protocole général de séparation des différents types cellulaires des glandes mammaires de souris infectées par voie locale. Brièvement, à 6 jours post-infection, les glandes mammaires de trois souris infectées ou non par ZIKV ont été collectées, broyées, et digérées de façon enzymatique. Les cellules ont été dissociées et la suspension cellulaire filtrée pour éliminer les débris et amas cellulaires. La suspension cellulaire initiale, avant séparation des différents types cellulaires, constitue la fraction F0. Celle-ci a été incubée en présence d'anticorps anti-CD45 couplées à des billes magnétiques permettant la séparation des cellules $CD45^+$ (fraction F1) et $CD45^-$ (fraction F2). Cette dernière a ensuite été incubée en présence d'anticorps anti-CD31 couplées à des billes magnétiques permettant la séparation des cellules $CD45^-/CD31^+$ (fraction F3) et $CD45^-/CD31^-$ (fraction F4). **(B)** Distinction des cellules immunitaires ($CD45^+$; vert), endothéliales ($CD45^-/CD31^+$; rouge) et des cellules mammaires non immunitaires et non endothéliales ($CD45^-/CD31^-$; bleu). **(C)** Quantification de la proportion de chaque type cellulaire en utilisant des anticorps anti-CD45 et anti-CD31 au sein des différentes fractions.

La charge virale a ensuite été mesurée dans les fractions F1, F3, et F4 afin de quantifier la réplication virale ayant lieu au sein des cellules immunitaires, des cellules endothéliales, et des cellules non immunitaires ni endothéliales, respectivement (Figure 40). De façon attendue, le génome viral de ZIKV a été détecté dans les fractions F1 et F3, correspondant respectivement aux cellules immunitaires et endothéliales, permissives à l'infection ZIKV. De façon intéressante, des charges virales élevées (2,0.10^7 copies d'ARN viral/µg d'ARN total) ont également été détectées dans la fraction F4, population cellulaire enrichie en cellules non immunitaires et non endothéliales $CD45^-/CD31^-$ (environ 64%) (Figure 40). Alors que seulement 35% des cellules présentes dans la fraction F4 sont endothéliales, la charge virale de celle-ci est équivalente à celle détectée dans la fraction 3 (2,2.10^7 copies d'ARN viral/µg d'ARN total), comportant environ 88% de cellules endothéliales, démontrant que d'autres cellules mammaires sont infectées par ZIKV dans la fraction F4. Ces résultats démontrent que ZIKV est capable d'infecter des cellules non immunitaires et non endothéliales dans les glandes mammaires murines au cours d'une infection locale. En revanche, les expériences d'immunofluorescence permettant de visualiser spécifiquement les différents types cellulaires infectés au sein des glandes mammaires murines n'ont pas encore été réalisées au moment de la rédaction de ce manuscrit.

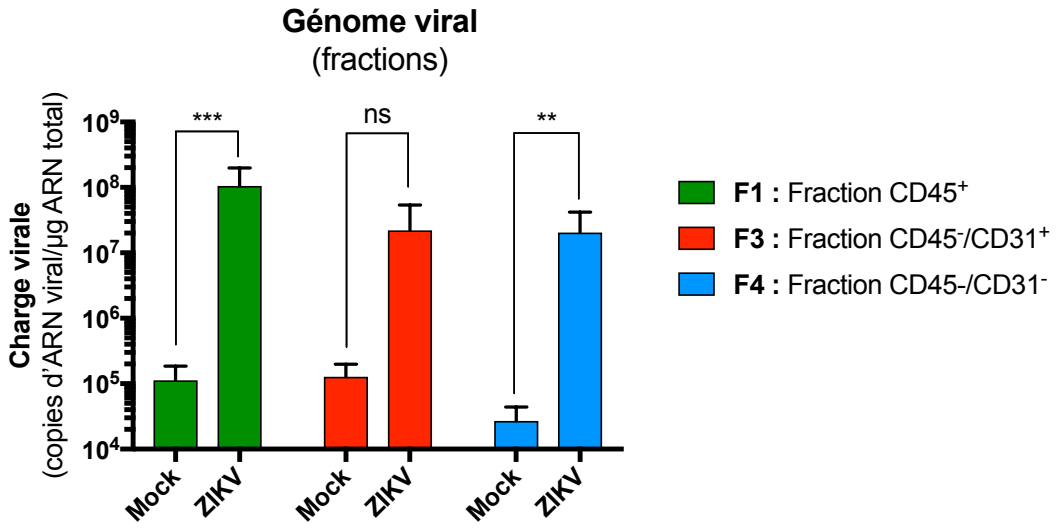


Figure 40. Quantification de la charge virale dans les différentes fractions cellulaires mammaires
La charge virale a été mesurée par qRT-PCR dans les fractions F1, F3 et F4, enrichies en cellules immunitaires, en cellules endothéliales, et en cellules non immunitaires ni endothéliales, respectivement. Graphe représentatif de deux expériences. Test statistique : two-way ANOVA après transformation logarithmique. * $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; *** : $p < 0,0005$; **** : $p < 0,0001$

- ***Le virus Zika (ZIKV) infecte de façon productive des cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines***

Les cellules non immunitaires et non endothéliales constituant le tissu mammaire sont majoritairement de types épithélial et stromal. Comme le suggère la Figure 40, celles-ci pourraient supporter la réplication virale de ZIKV. Directement au contact des compartiments sanguin et lactifère, les cellules épithéliales pourraient notamment jouer un rôle dans l'excrétion virale dans le lait maternel au cours de la lactation. Afin de tester cette hypothèse, nous avons exposé des cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines (hMEpiC) isolées à partir de tissus mammaires sains à trois souches différentes de ZIKV : une souche africaine non épidémique (HD78788), une souche asiatique isolée au cours de l'épidémie en Polynésie Française en 2013-14 (H/PF13), et une souche asiatique isolée au cours de l'épidémie en Amérique Latine en 2015-16 (Brésil/2016/INMI1). Quarante-huit heures après exposition des cellules hMEpiC avec les différentes souches de ZIKV, l'immunodétection de la protéine d'enveloppe– E(ZIKV) – au niveau périnucléaire, typique d'une infection flavivirale, permit de confirmer la sensibilité des cellules hMEpiC à l'infection ZIKV (Figure 41). En revanche, aucun marquage ne fut observé au sein de cellules non exposées, confirmant la spécificité du signal observé dans les cellules infectées.

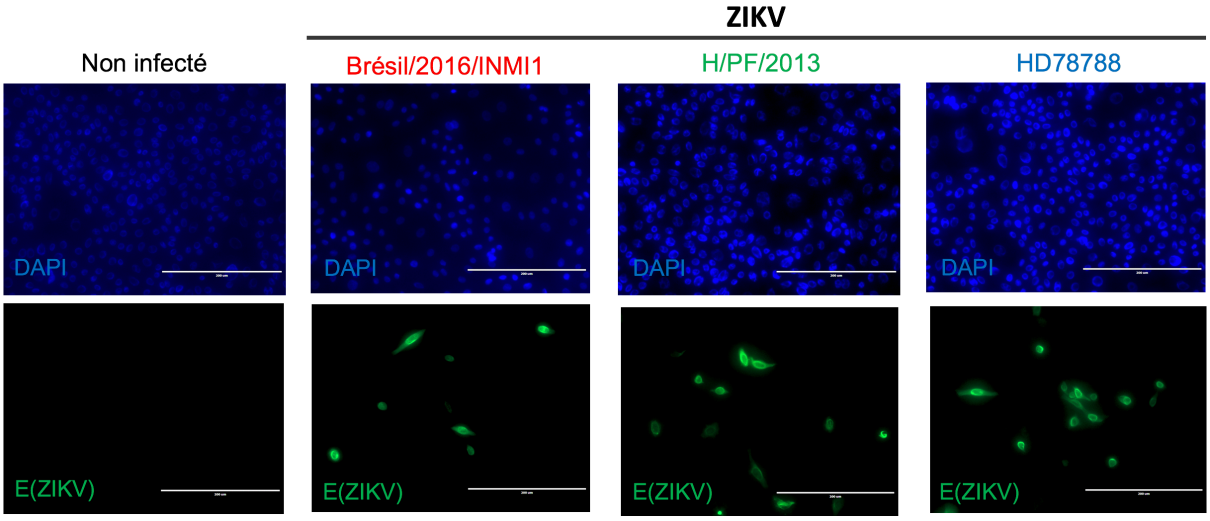


Figure 41. Infection des cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines par ZIKV
Des cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines (hMEpiC) ont été exposées à trois souches (Brésil/2016/INMI1, H/PF13, HD78788) de ZIKV à une multiplicité d'infection de 1 et de 10. 48h post-infection, la protéine d'enveloppe E(ZIKV) a été immunodétectée à l'aide de l'anticorps 4G2 (vert). Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Peu de cellules infectées étant visibles au sein des monocouches cellulaires exposées à une multiplicité d'infection de 1, seules celles exposées à une multiplicité d'infection de 10 sont montrées. Barre d'échelle : 200 µm.

Par cytométrie en flux, nous avons quantifié le nombre de cellules exprimant de façon significative la protéine E(ZIKV) (Figure 42A). Alors que les cellules hMEpiC sont sensibles aux trois souches virales testées, l'efficacité d'infection est cependant variable (Figure 42B). En effet, la souche africaine présente une efficacité d'infection significativement supérieure (taux d'infection de 1,70 ± 0,32%) à celles des souches asiatiques isolées lors des épidémies polynésienne (taux d'infection de 1,07 ± 0,23%) et américaine (taux d'infection de 0,23 ± 0,06%) (Figure 42B).

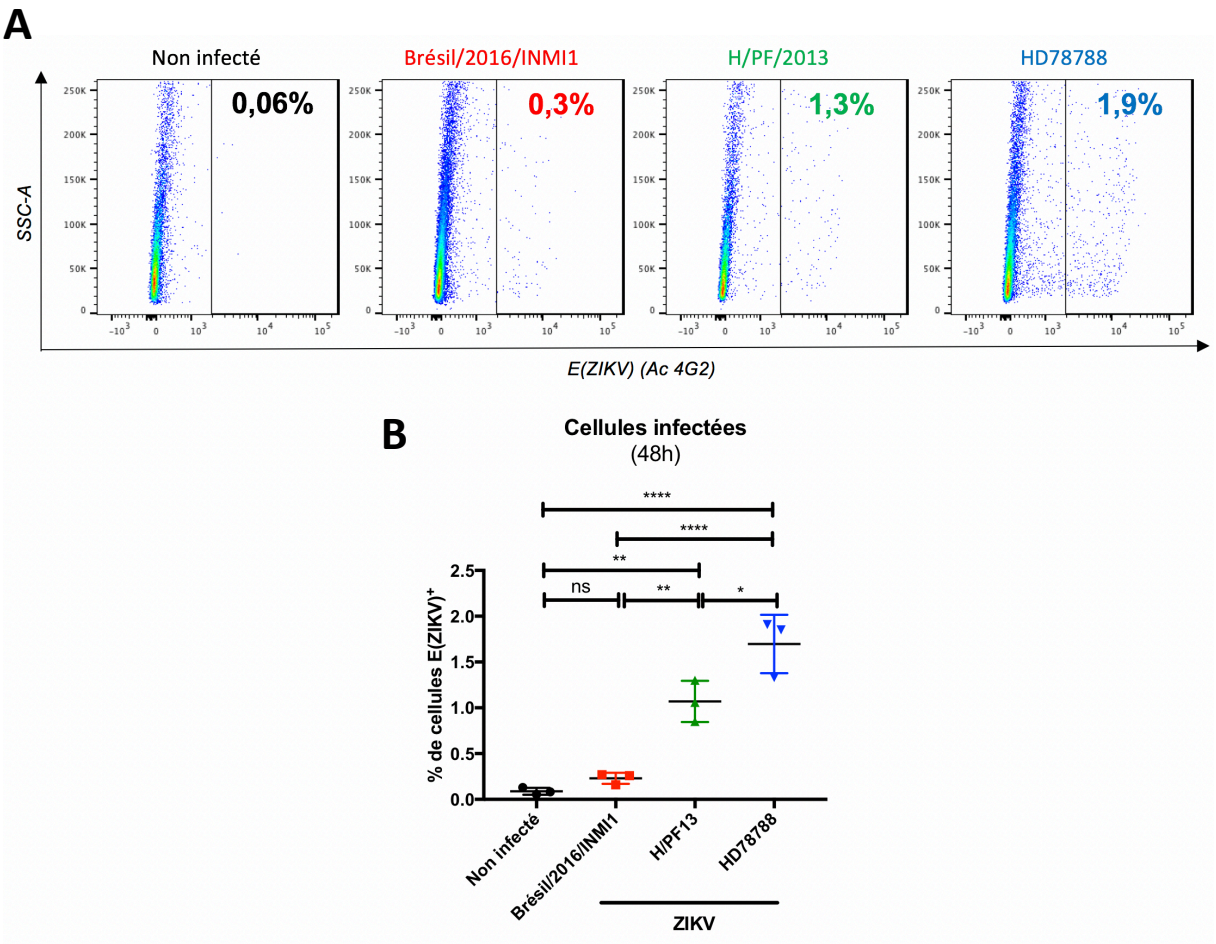


Figure 42. Quantification du nombre de cellules hMEpiC infectées par ZIKV

(A) 48h post-infection, le nombre de cellules hMEpiC infectées (multiplicité d'infection de 1) et exprimant fortement E(ZIKV) a été quantifié par cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps 4G2. **(B)** Représentation graphique des résultats exprimés en moyenne ± SD. Test statistique : one-way ANOVA. * p < 0,05 ; ** : p < 0,005 ; *** : p < 0,0005 ; **** : p < 0,0001

De même, d'importantes charges virales intracellulaires ont été détectées à 90h post-infection au sein des cellules hMEpiC exposées aux différentes souches de ZIKV, démontrant une réplication virale active (Figure 43A). Enfin, nous nous sommes demandés si l'infection limitée des cellules hMEpiC (<2% de cellules infectées) était suffisante pour produire des particules virales infectieuses dans le surnageant. Comme le montre la Figure 43B, le nombre de particules infectieuses sécrétées dans le surnageant des cellules hMEpiC exposées aux trois souches virales augmente au cours du temps (courbes rouge, verte, et bleue) par rapport aux cellules hMEpiC non infectées (courbe noire), démontrant la permissivité des cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines à ZIKV. De façon intéressante, la production virale de particules infectieuses est plus importante pour les souches virales H/PF13 et HD78788, semblant ainsi corréler avec les résultats précédents concernant le nombre de cellules infectées et de copies d'ARN viral intracellulaire. Enfin, la production virale de particules infectieuses par les cellules hMEpiC est également dose-dépendante (Figure 43C).

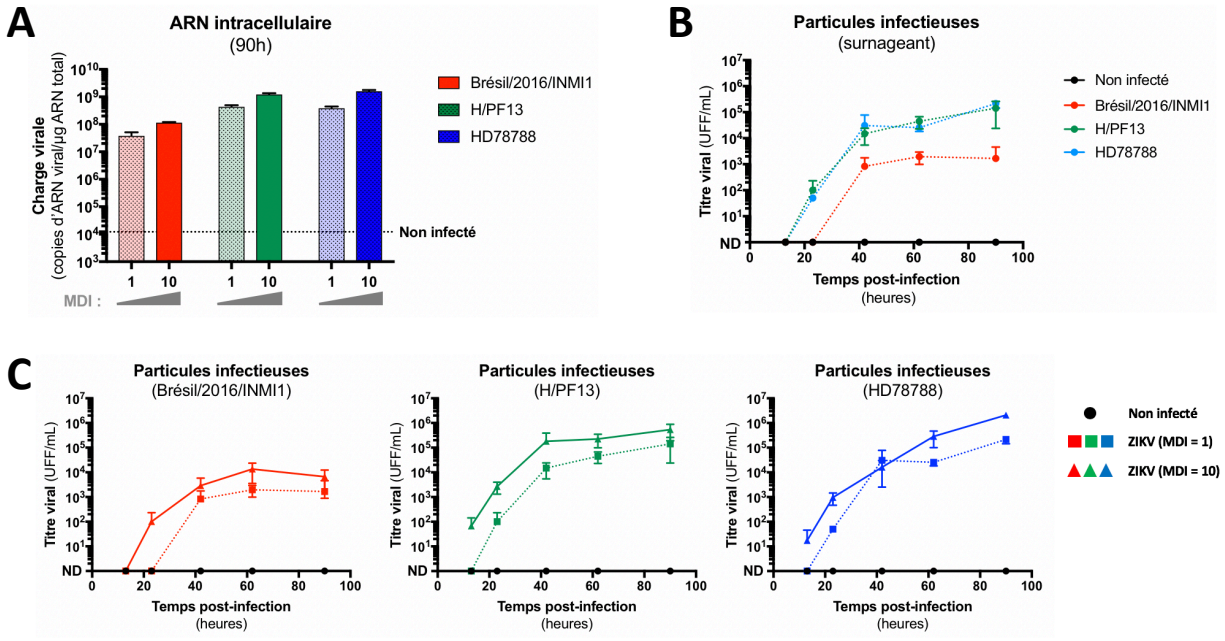


Figure 43. Réplication et production virales de ZIKV par les cellules hMEpiC

(A) A 90h post-infection, l'ARN intracellulaire des cellules HMEpiC exposées ou non aux différentes souches virales de ZIKV aux multiplicités d'infection (MDI) de 1 et 10 a été extrait, et le nombre de copies d'ARN viral a été mesuré par qRT-PCR. Ligne pointillée : limite de spécificité estimée par rapport aux HMEpiC non infectées. **(B)** La production de particules virales infectieuses dans le surnageant a été mesurée au cours du temps par titrage sur cellules Vero. **(C)** Effet dose-dépendant de la production virale par les cellules hMEpiC exposées aux différentes souches de ZIKV (trait pointillé et carrés : MDI = 1; trait plein et triangles : MDI = 10). ND : non détectable.

- ***Des lignées cellulaires humaines luminales et myoépithéliales de l'épithélium mammaire sont permissives à l'infection ZIKV***

L'épithélium mammaire est bistratifié et est composé de deux couches cellulaires : une couche interne de cellules luminales et une couche externe de cellules myoépithéliales. Étant donné que des cellules épithéliales primaires de glandes mammaires humaines (hMEpiC) peuvent être, *in vitro*, infectées par ZIKV de façon productive, nous avons étudié la permissivité des deux types cellulaires constituant l'épithélium mammaire en exposant deux lignées cellulaires humaines de phénotype luminal (lignée MCF-7) et myoépithélial (MDA-MB-231) à ZIKV. Étant donné que la majorité des études de cas de détection de ZIKV dans le lait maternel et/ou de transmission de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel eurent lieu au cours de l'épidémie de 2015-2016 en Amérique Latine [88–90,108,109], nous avons utilisé la souche américaine de ZIKV (Brésil/2016/INMI1) pour toutes les expériences suivantes. Quarante-huit heures post-infection, alors qu'aucune immunodétection spécifique de la protéine d'enveloppe de ZIKV n'a été observée dans les monocouches cellulaires non exposées, nous avons observé un marquage périnucléaire de E(ZIKV) caractéristique d'une infection flavivirale dans les monocouches de cellules MCF-7 et MDA-MB-231 exposées (Figure 44A), démontrant la sensibilité des deux types cellulaires de l'épithélium mammaire humain à l'infection ZIKV.

La quantification des cellules exprimant fortement E(ZIKV) a été réalisée par cytométrie en flux. Comparativement au taux d'infection d'environ 70% des cellules Vero, hautement permissives à l'infection ZIKV, seules 7% et 35% de cellules MDA-MB-231 et MCF-7, respectivement, sont infectées par ZIKV au bout de 48h (Figure 44B). Malgré ces différences significatives de sensibilité à l'infection, le nombre de particules infectieuses dans le surnageant des cellules MDA-MB-231 et MCF-7 augmente de façon significative entre 2h et 48h post-infection, jusqu'à atteindre un titre viral proche de celui détecté dans le surnageant des cellules Vero (Figure 45), démontrant que les deux types cellulaires de l'épithélium mammaire humain constituent un système efficace de production virale de ZIKV.
Ainsi, les cellules luminales et myoépithéliales, permissives à l'infection ZIKV, pourraient contribuer aux fortes charges virales détectées dans le lait maternel de femmes infectées.

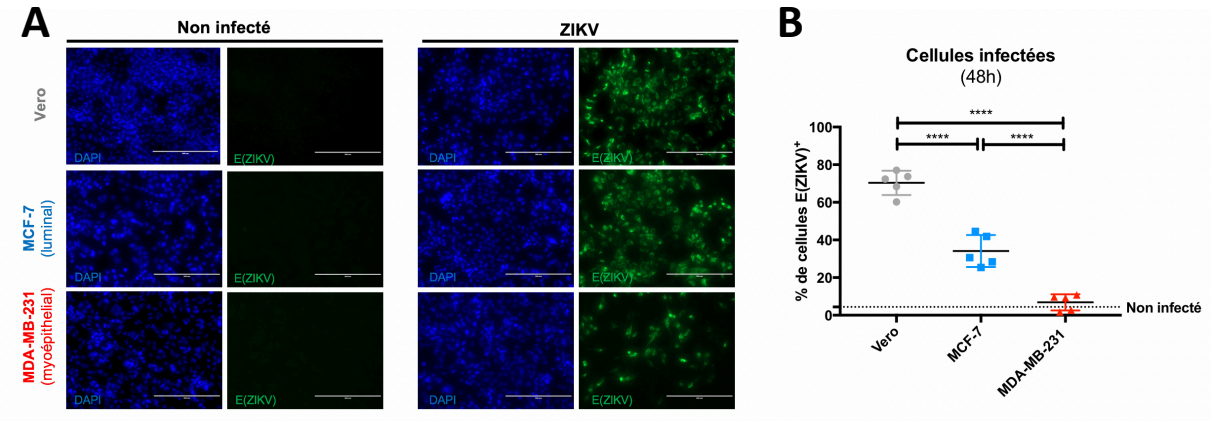


Figure 44. Sensibilité des cellules épithéliales mammaires luminales et myoépithéliales à l'infection ZIKV

(A) Des cellules épithéliales mammaires luminales (MCF-7) et myoépithéliales (MDA-MB-231) ont été exposées à la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV à une multiplicité d'infection de 1. Les cellules Vero, permissives à l'infections ZIKV, ont été utilisées comme contrôle positif. 48h post-infection, la protéine d'enveloppe E(ZIKV) a été immunodétectée à l'aide de l'anticorps 4G2 (vert). Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Barre d'échelle : 200 µm. **(B)** Quantification de l'infection des cellules infectées (multiplicité d'infection de 1) par cytométrie en flux. Résultats exprimés en moyenne ± SD. Test statistique : one-way ANOVA. * p < 0,05 ; ** : p < 0,005 ; *** : p < 0,0005 ; **** : p < 0,0001

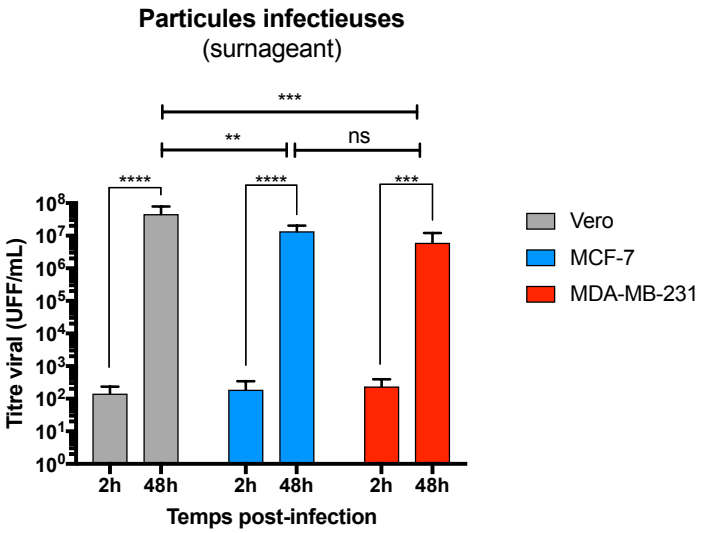


Figure 45. Production virale par les cellules épithéliales mammaires luminales et myoépithéliales infectées

La production de particules virales infectieuses a été mesurée par titrages des surnageants sur cellules Vero à 2h et 48h post-infection. Résultats exprimés en moyenne ± SD. Test statistique : one-way ANOVA couplé au ratio paired t-test. * p < 0,05 ; ** : p < 0,005 ; *** : p < 0,0005 ; **** : p < 0,0001

- ***L'infection ZIKV des glandes mammaires murines n'entraîne pas d'altération de l'architecture mammaire macroscopique***

Enfin, alors que les cellules de l'épithélium mammaire pourraient être impliquées dans l'excrétion virale de ZIKV dans le lait maternel ,nous nous sommes demandé si l'infection des glandes mammaires murines adultes pouvait également être accompagnée d'une altération architecturale. Six jours après une infection locale (voie sous-cutanée), les glandes mammaires thoraciques murines ont été collectées puis observées à la loupe binoculaire après coloration de la structure épithéliale mammaire au rouge de carmin. De façon attendue, les glandes mammaires des souris non infectées présentent une structure épithéliale canalaire qui remplit le stroma mammaire (Figure 46). Les glandes mammaires étant non lactantes, aucune alvéole mammaire n'est observée. A l'échelle macroscopique, aucune altération visible de l'architecture n'est visible dans les glandes mammaires de souris exposées à ZIKV (Figure 46).

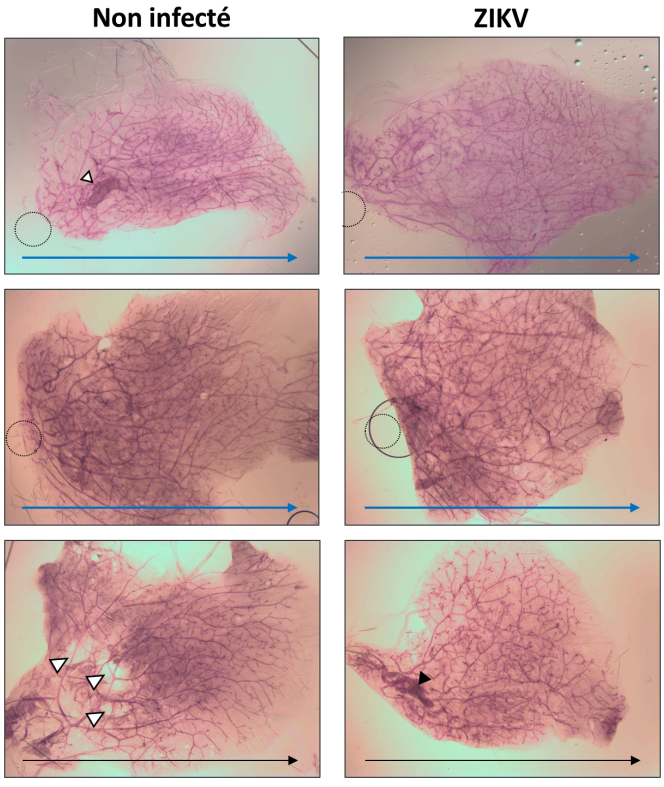


Figure 46. Effet de l'infection ZIKV sur l'architecture des glandes mammaires murines

Des souris A129 femelles adultes et nullipares ont été exposées à $6{,}6.10^6$ UFF de la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV par voie sous-cutanée. Six jours post-infection, les glandes mammaires thoraciques (paire n°3) ont été prélevées et colorées au rouge de carmin. La flèche bleue indique le sens d'élongation des canaux à partir du mamelon, dont la position théorique est représentée par un cercle pointillé vide. Tête de flèche blanche : morceau de tissu musculaire (muscle pectoral).

AXE II : TRANSMISSIBILITE DES PARTICULES INFECTIEUSES ZIKV AU NOURRISSON PAR VOIE ORALE

– INTERACTION ZIKV ET BARRIERE INTESTINALE –

Dans cette partie, nous avons exploré les **interactions entre ZIKV et la barrière intestinale** afin de considérer ou non celle-ci comme potentielle porte d'entrée de ZIKV dans l'organisme suite à une exposition orale. Nous avons ainsi étudié la transmissibilité orale de ZIKV chez le souriceau ainsi que la capacité de celui-ci à être transmis de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel. *In vitro*, nous avons étudié la sensibilité et la permissivité de différents clones entérocytaires humains à l'infection ZIKV. Enfin, en utilisant un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal humain, nous avons recherché une éventuelle production de particules infectieuses via le pôle basolatéral et analysé les effets de l'infection sur l'intégrité de la barrière intestinale.

- ***Le virus Zika (ZIKV) est capable d'infecter des souriceaux par voie orale***

Afin de mimer l'absorption progressive de particules virales ayant lieu au cours de l'allaitement maternel, nous avons exposé trois portées de 4 à 5 souriceaux chacune à deux doses successives de la souche américaine du virus Zika (1.10^5 UFF à l'âge de 2 jours et 2.10^5 UFF à l'âge de 5 jours). Chaque portée est issue d'un couple reproducteur différent, la consanguinité de ce modèle animal assurant une conservation du fond génétique. La virémie a été mesurée 3 jours après chaque exposition orale (Figure 47).

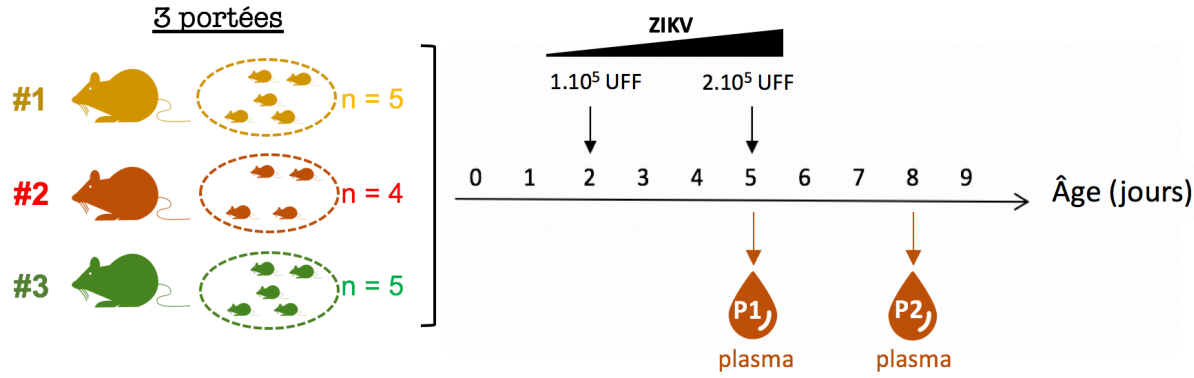


Figure 47. Expériences d'infection orale de souriceaux par ZIKV
Trois portées de 4 à 5 souriceaux A129 (portée n°1 : orange; portée n°2 : rouge ; portée n°3 : vert) ont été exposés à la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV. Deux doses successives, 1.10^5 et 2.10^5 UFF, ont été administrées par voie orale à 2 et 5 jours après la naissance, respectivement. Des prélèvements sanguins ont été effectués 3 jours après chaque administration (P1 et P2).

De façon notable, les souriceaux infectés par voie orale développent une charge virale plasmatique détectable dès 3 jours après la première exposition ($6,7.10^3$ copies d'ARN viral/µL de plasma) et qui augmente au cours du temps (Figure 48A). Six jours après la première exposition, celle-ci s'élève en effet à $9,7.10^6$ copies d'ARN viral/µL de plasma. En termes de particules infectieuses, la virémie moyenne augmente de $3,8.10^2$ à $5,5.10^6$ UFF/mL de plasma entre 3 et 6 jours après la première exposition, respectivement (Figure 48B).

Alors que l'efficacité d'infection des souriceaux d'une même portée semble être constante (la plupart des souriceaux des portées n°1 et 2 sont sensibles, la plupart des souriceaux de la portée n°3 sont résistants), celle-ci varie selon les portées : 5/5 souriceaux sont infectés dans la portée n°1 (Figure 49A), 4/4 souriceaux dans la portée n°2 (Figure 49B), et 1/5 souriceau dans la portée n°3 (Figure 49C). Ces observations suggèrent un potentiel rôle de facteurs

extrinsèques sur la sensibilité des souriceaux à l'infection orale, telle que l'alimentation de la mère, la composition du lait maternel, l'état du développement des souriceaux au jour de la parturition, etc. Globalement, nous montrons que l'infection orale par ZIKV constitue un mode de transmission efficace résultant en un taux d'infection, bien que variable, d'environ 64% (9/14 souriceaux).

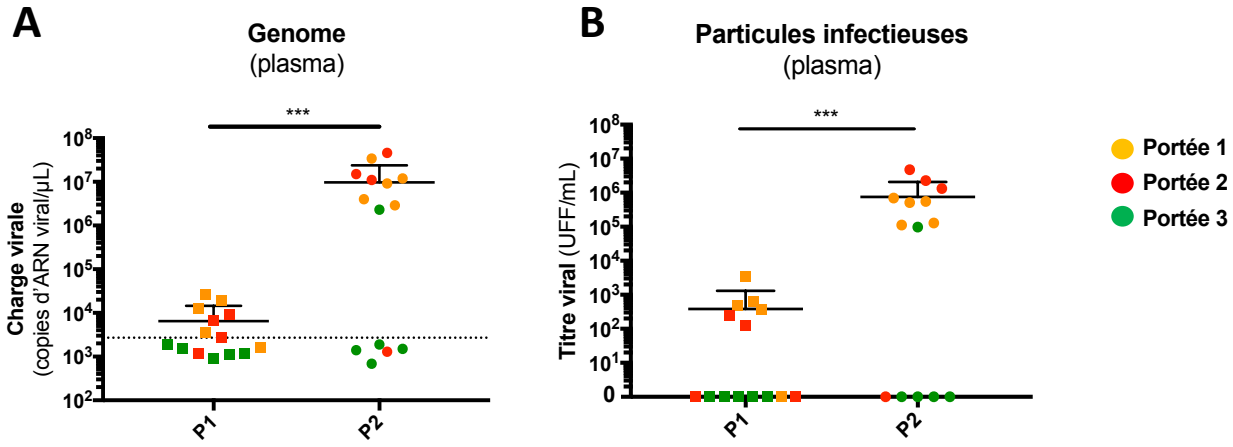


Figure 48. Sensibilité des souriceaux à l'infection orale par ZIKV
La charge virale plasmatique, ou virémie, a été mesurée 3 jours (P1) et 6 jours (P2) après la première exposition par qRT-PCR **(A)** et par titrage sur cellules Vero **(B)**. La ligne noire pointillée représente la limite de spécificité de la méthode. Tests statistiques : test apparié one-way ANOVA après transformation logarithmique. * $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; *** : $p < 0,0005$; **** : $p < 0,0001$

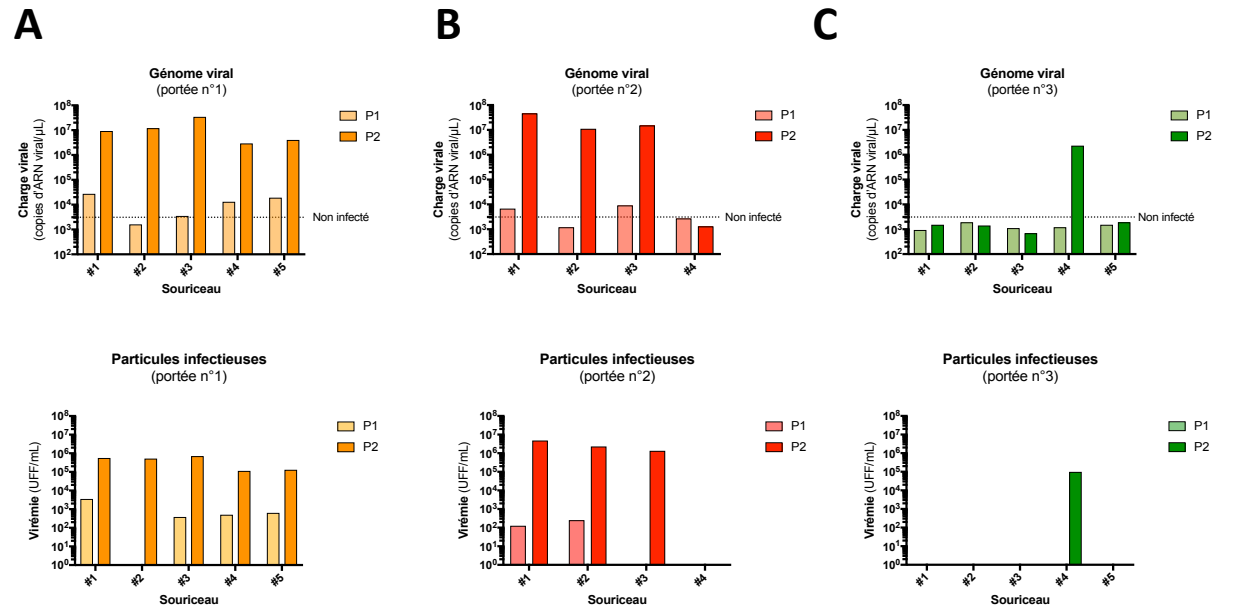


Figure 49. Différences de sensibilité des souriceaux par voie orale selon la portée
Détails des charges virales individuelles de chaque souriceau appartenant à la portée n°1 **(A)**, la portée n°2 **(B)**, et la portée n°3 **(C)**.

- ***L'infection orale des souriceaux par ZIKV est associée à une mortalité significative***

Comparativement aux souriceaux non infectés, aucun retard de croissance significatif n'est observé chez les souriceaux infectés par ZIKV (Figure 50A). En revanche, l'infection orale est mortelle chez 7/9 souriceaux infectés, reflétant un taux de mortalité d'environ 72% au dixième jour après la première exposition (Figure 50B).

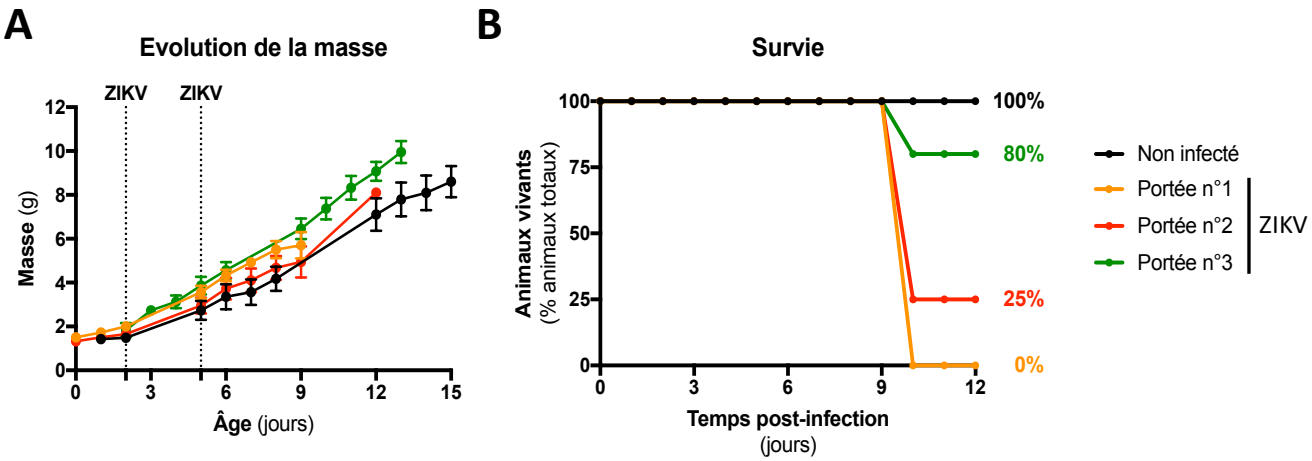


Figure 50. Symptomatologie et mortalité des souriceaux infectés par ZIKV par voie orale
(A) La masse des souriceaux exposés ou non à ZIKV par voie orale a été suivie régulièremenr au cours du temps, permettant la représentation et la comparaison des courbes de croissances. **(B)** Le taux de survie est exprimé en pourcentage de souriceaux vivants par groupe.

Ce taux élevé de mortalité associé à l'infection orale par ZIKV nous a conduits à explorer la dissémination du virus Zika dans l'organisme après une infection orale. Dans une expérience indépendante, sept souriceaux ont été exposés à la souche américaine de ZIKV en suivant le même protocole que précédemment. L'infection ZIKV fut confirmée dans l'intégralité de la portée (7/7 souriceaux). De plus, celle-ci fut mortelle chez 3/7 souriceaux au bout du 5ème jour après la première exposition, confirmant la pathogénicité sévère de l'infection ZIKV par voie orale. Le même jour, la rate et le cerveau ont été collectés chez les 4/7 souriceaux survivants. De façon intéressante, alors que le génome viral est détecté dans la rate, confirmant l'infection ZIKV des souriceaux survivants, une importante charge virale est également détectée dans le cerveau de l'intégralité des souriceaux survivants (1,5.10^{9} copies d'ARN viral/µg d'ARN total) (Figure 51).

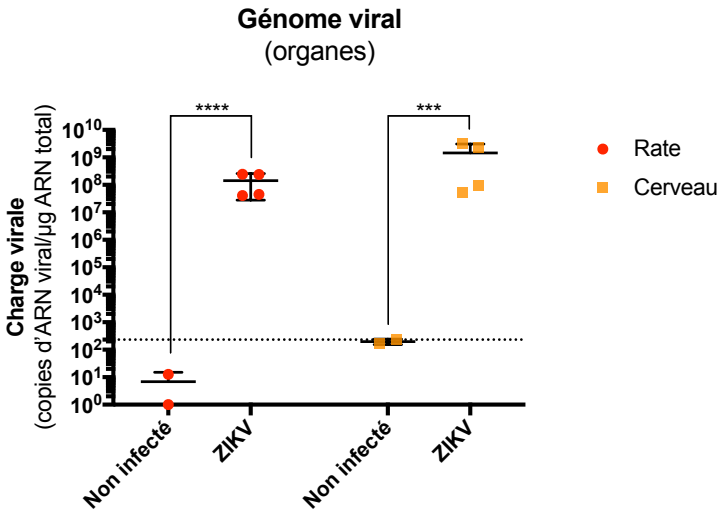


Figure 51. Neuroinvasion virale

Sept souriceaux ont été infectés par voie orale selon le même protocole que précédemment. Cinq jours après la première administration, 3/7 souriceaux sont morts. Le même jour, les 4/7 souriceaux survivants ont été mis à mort afin de collecter la rate et le cerveau. La charge virale dans ces organes a été mesurée par qRT-PCR et exprimée en nombre de copies d'ARN viral/µg d'ARN total.

Test statistique : Test t non apparié après transformation logarithmique. * $p < 0,05$; ** : $p < 0,005$; *** : $p < 0,0005$; **** : $p < 0,0001$

Bien que non suffisante, cette expérience démontre que l'infection orale par ZIKV s'accompagne d'une neuroinvasion virale. Des expériences supplémentaires sont aujourd'hui requises, telles que l'isolement de particules virales infectieuses et l'immunodétection de protéines virales dans le cerveau, afin de confirmer et d'approfondir ces résultats.

- ***Le virus Zika peut être transmis de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel***

Alors que nous avons démontré que les souriceaux étaient sensibles à l'infection orale par ZIKV, nous avons alors cherché à savoir si cette transmission orale pouvait avoir lieu dans le cadre de l'allaitement maternel. Trois jours après la naissance, trois mères lactantes ont été exposées à la souche américaine de ZIKV par voie intra-péritonéale. Pour chaque portée, le sang a été prélevé chez la souris mère et les souriceaux 2 jours et 6 jours après infection de la mère (Figure 52). Étant donné qu'une souris mère fut retrouvée morte dès 3 jours post-infection et que les deux souris restantes ont perdu 20% de leur masse initiale à 6 jours post-infection, l'expérience a été stoppée au 6ème jour.

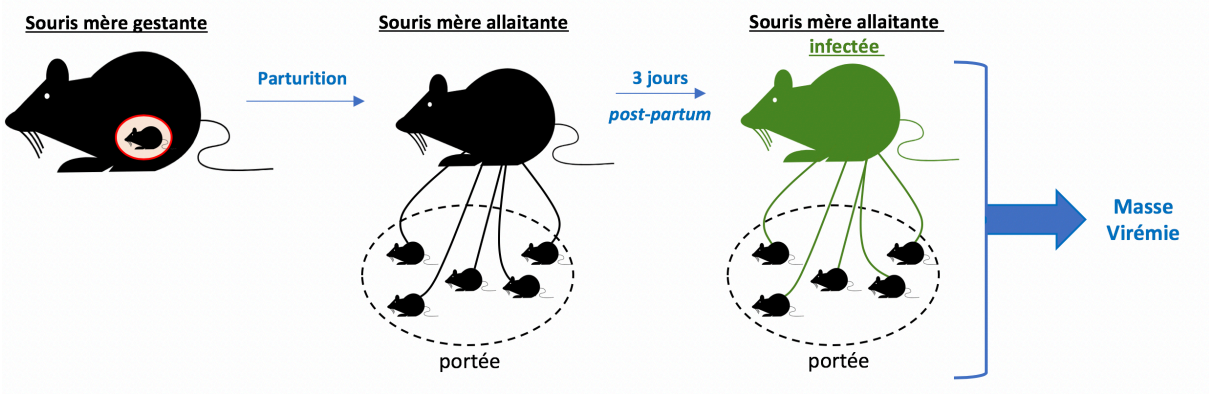


Figure 52. Transmission du virus Zika de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel

Trois jours post-partum, des souris A129 femelles ont été exposées à $2{,}8.10^6$ UFF de la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV par voie intra-péritonéale. L'évolution de la masse a été suivie régulièrement. Des prélèvements sanguins ont été effectués à 2 jours et 6 jours post-infection chez les souris mères et les souriceaux afin de mesurer la virémie pr qRT-PCR.

De façon intéressante, nous observons un arrêt de la croissance des souriceaux allaités par des souris mères infectées (Figure 53, courbes vertes) par rapport aux souriceaux allaités par des souris mères non infectées (Figure 53, courbe noire).

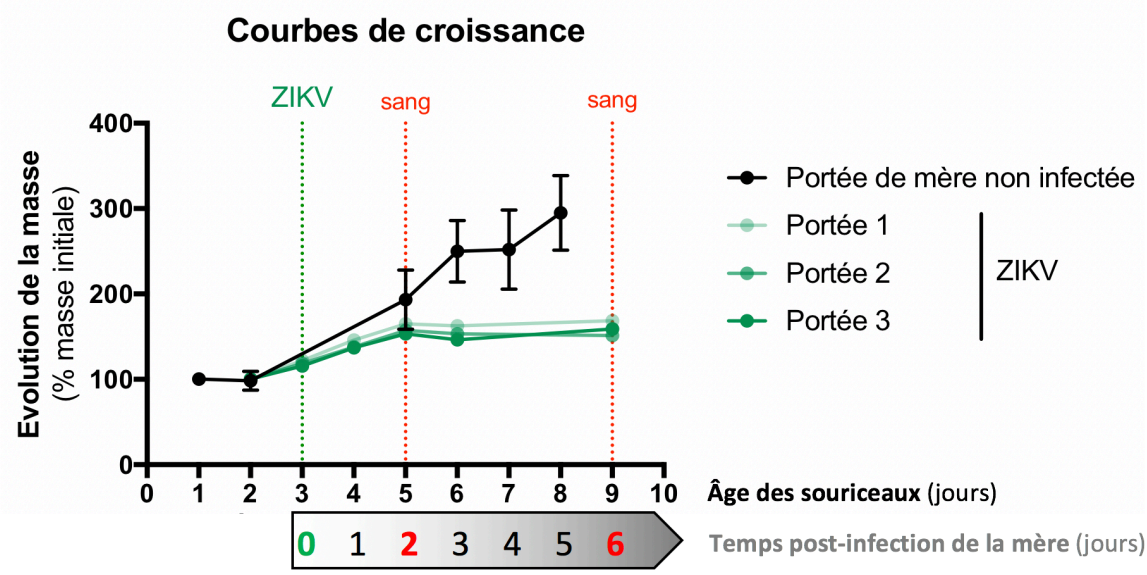


Figure 53. Évolution de la masse des souriceaux allaités par une mère infectée par ZIKV

La masse des souriceaux allaités par une mère infectée par ZIKV (courbes vertes) ou non (courbe noire) a été suivie régulièrement au cours du temps. Le jour de l'infection est indiqué par une barre verticale pointillée verte. Les jours de prélèvements sanguins sont indiqués par des barres verticales pointillées rouges. La flèche grise sous le graphe indique le temps après infection.

Concernant le statut infectieux des mères et des souriceaux, toutes les souris mères exposées à ZIKV développent une virémie à 2 jours post-infection, qui décline à 6 jours post-infection, confirmant ainsi l'infection des mères allaitantes (Figure 54, symboles roses). De plus, alors que la charge virale des souriceaux non infectés est nulle, nous constatons que certains souriceaux des différentes portées développent une faible virémie dès le deuxième jour après infection de la mère (Figure 54, symboles verts). En effet, 3/6 souriceaux de la portée n°1, et 1/7 souriceau de la portée n°2 développent une virémie évoluant de $2{,}1.10^3$ à $1{,}8.10^4$ copies d'ARN viral/µL au 2ème jour post-infection. De façon intéressante, nous notons également que la charge virale d'un souriceau appartenant à la portée n°1 augmente au cours du temps ($1{,}8.10^4$ à $2{,}5.10^5$ copies d'ARN viral/µL entre 2 jours et 6 jours post-infection de la mère, respectivement).

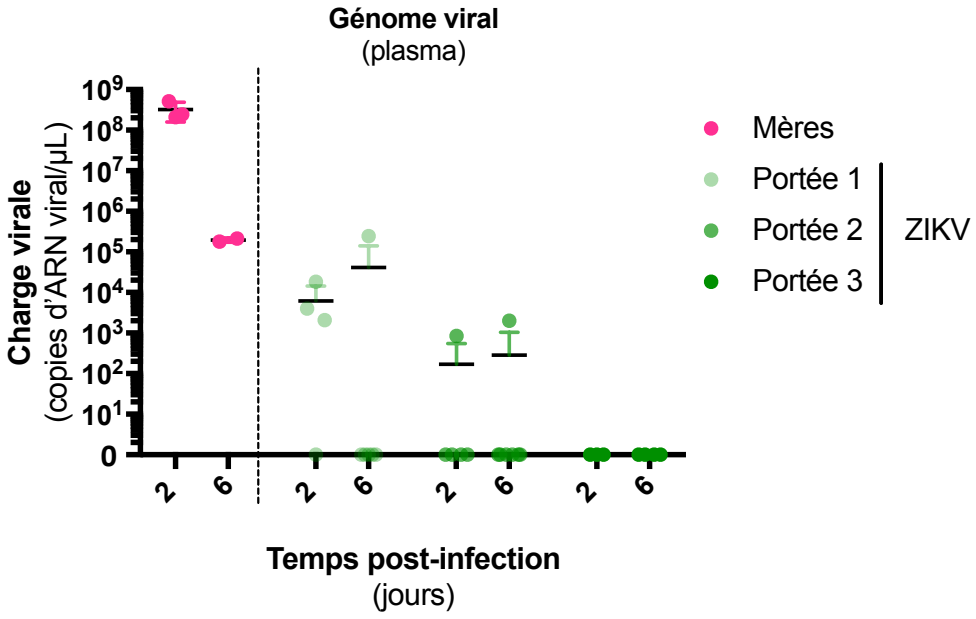


Figure 54. Infection des souriceaux par ZIKV au cours de l'allaitement maternel
La virémie a été mesurée à 2 et 6 jours après infection de la mère chez les mères allaitantes (symboles roses) et chez les souriceaux allaités (symboles verts).

Ces résultats sont les premiers à mettre en évidence une transmission de la mère à l'enfant de ZIKV au cours de l'allaitement maternel chez le modèle murin. Il est à noter qu'à l'heure où ce manuscrit est rédigé, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et nécessite d'être répétée.

- ***Le virus Zika infecte des cellules entérocytaires humaines***

Lors de la transmission orale de ZIKV au cours de l'allaitement, le virus doit franchir un épithélium afin d'infecter son hôte. Étant donné que l'inoculation intra-gastrique (gavage oral) de particules virales donne lieu à une infection des souriceaux, nous avons considéré l'épithélium intestinal, plutôt que les épithélia respiratoire et amygdalien, comme une potentielle porte d'entrée virale.

Ainsi, nous avons dans un premier temps étudié la sensibilité et la permissivité des entérocytes à l'infection ZIKV. Pour cela, nous avons exposé différents clones cellulaires de la lignée Caco-2 (clone 4 et clone TC7) ainsi que la lignée HT-29 à la souche américaine de ZIKV. De façon attendue, la glycoprotéine d'enveloppe E n'est pas détectée par immunofluorescence au sein des cellules non exposées à ZIKV (Figure 55). En revanche, une immunodétection de celle-ci est observée au niveau périnucléaire au sein des trois lignées entérocytaires exposées à la souche américaine de ZIKV (Figure 55). L'intégrité des tapis cellulaires ne semble pas être affectée.

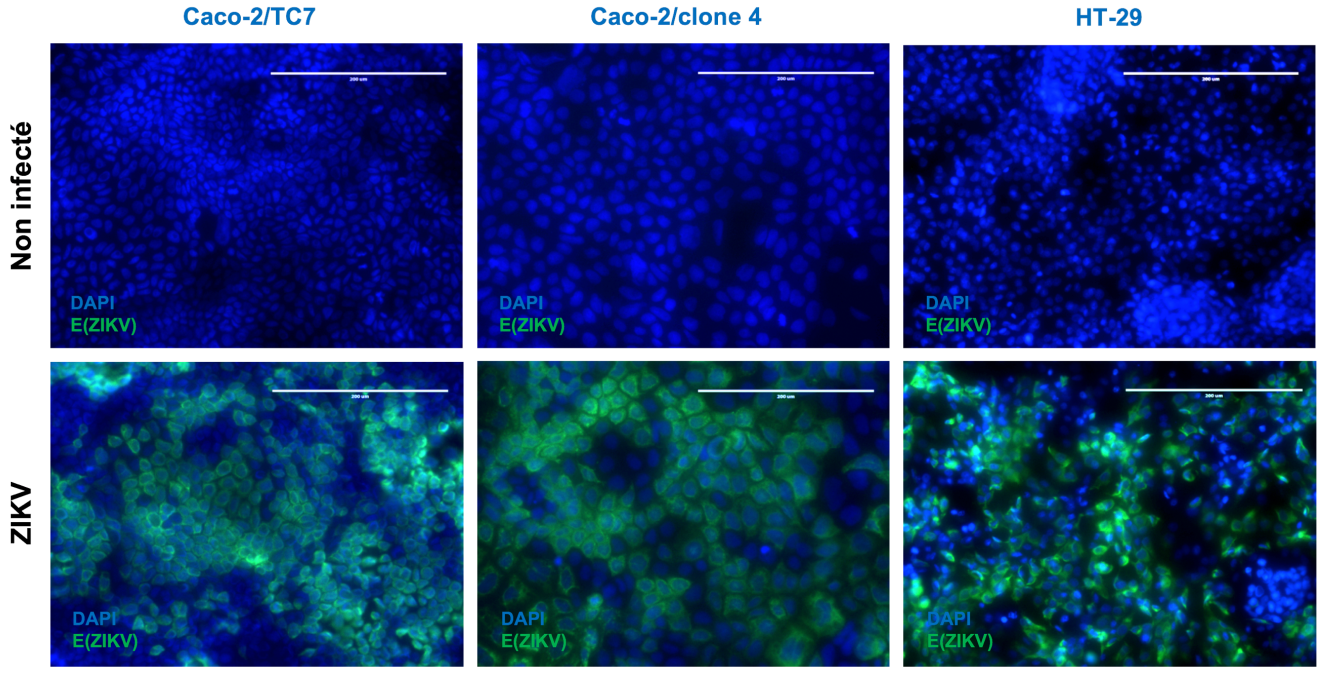


Figure 55. Infection des lignées cellulaires « enterocyte-like » par ZIKV
Des cellules des lignées entérocytaires Caco-2 (clone TC7, clone 4) et HT-29 ont été exposées à la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV à une multiplicité d'infection de 1. 48h post-infection, la protéine d'enveloppe E(ZIKV) a été immunodétectée à l'aide de l'anticorps 4G2 (vert). Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (bleu). Barre d'échelle : 200 µm.

Nous avons confirmé ces résultats avec une seconde souche virale (H/PF13) (Figure 56A). De façon intéressante, nous observons que l'infection des cellules Caco-2/TC7 à une multiplicité d'infection moindre se caractérise par la présence de foyers d'infection plutôt que de cellules infectées isolées, permettant d'émettre l'hypothèse de l'existence d'une propagation virale directe d'une cellule infectée aux cellules adjacentes (Figure 56A). Au bout de 48h, la quantification du nombre de cellules Caco-2/TC7 infectées à une multiplicité d'infection de 1 révèle un taux d'infection d'environ 30%, confirmant ainsi l'importante sensibilité des entérocytes à l'infection ZIKV (Figure 56B et 56C).

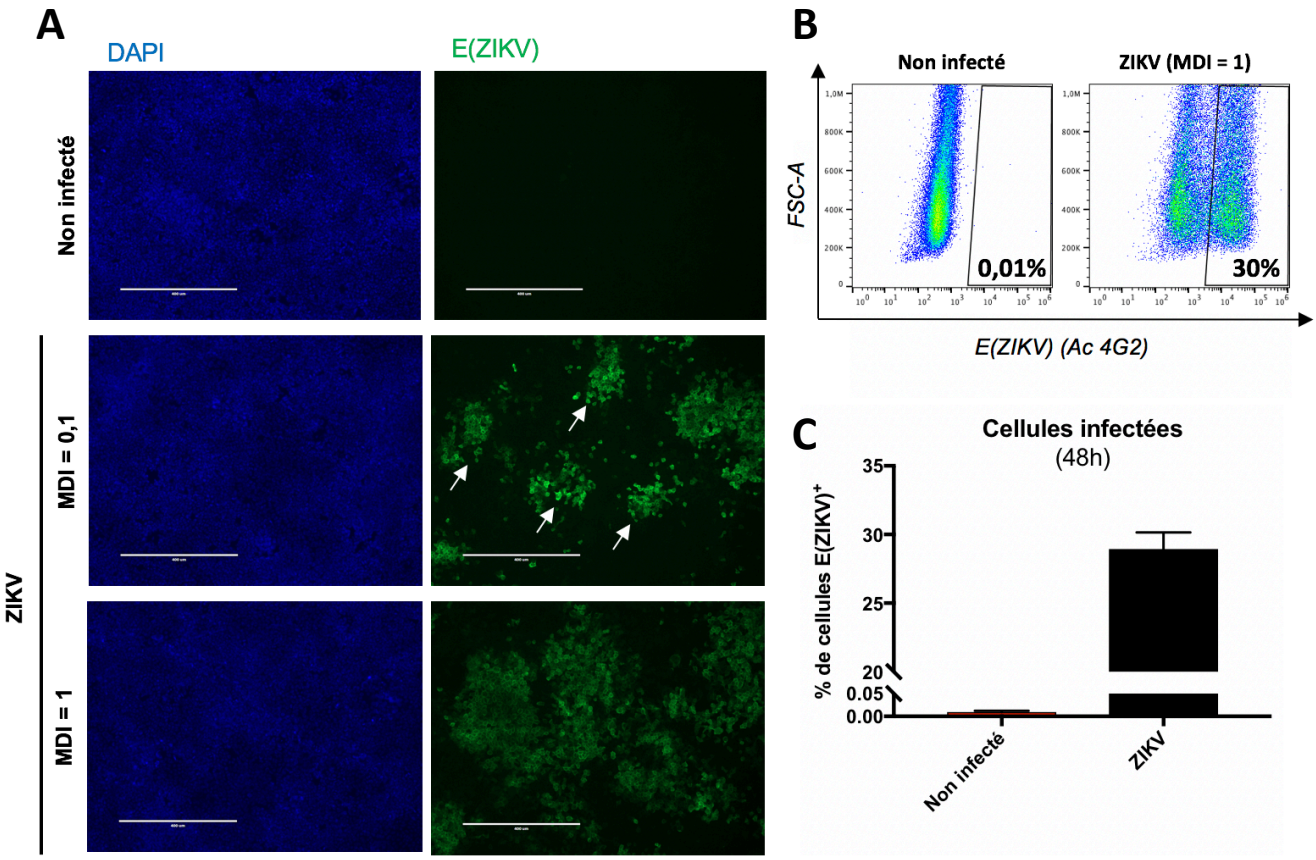


Figure 56. Quantification du nombre de cellules Caco-2/TC7 infectées par ZIKV
Des cellules de la lignée entérocytaire humaine Caco-2/TC7 ont été exposées à une souche asiatique (H/PF13) de ZIKV à des multiplicités d'infection (MDI) de 0,1 et de 1 pendant 48h. **(A)** L'infection des cellules a été visualisée par immunofluorescence comme précédemment; Flèches blanches : foyers d'infection. Barre d'échelle : 400 µm. **(B)** Le nombre de cellules Caco-2/TC7 exprimant fortement E(ZIKV) a été quantifié par cytométrie en flux à l'aide de l'anticorps 4G2. **(C)** Représentation graphique des résultats d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

Enfin, le titre viral dans le surnageant des trois lignées infectées par ZIKV a été déterminé par titrage sur cellules Vero au cours du temps. Celui-ci augmente de façon significative dans le surnageant de toutes les lignées enterocytaires. Entre 2h et 48h post-infection, celui-ci augmente en effet de $1{,}3.10^2$ UFF/mL à $3{,}3.10^5$ UFF/mL dans le surnageant des cellules Caco-2/TC7, de $1{,}5.10^2$ UFF/mL à $3{,}2.10^6$ UFF/mL dans le surnageant des cellules Caco-2/clone 4, et de $1{,}1.10^2$ UFF/mL à $6{,}3.10^5$ UFF/mL dans le surnageant des cellules HT-29 (Figure 57), démontrant que l'infection de cellules enterocyte-like par ZIKV conduit à une production importante de particules virales infectieuses.

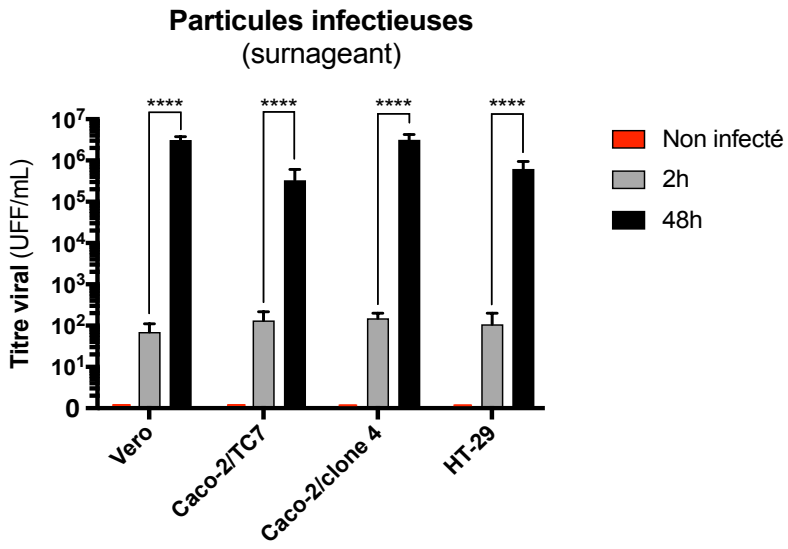


Figure 57 Production virale par les cellules « enterocyte-like » infectées par ZIKV
La production de particules virales infectieuses a été mesurée par titrages des surnageants sur cellules Vero à 2h et 48h post-infection. Résultats exprimés en moyenne ± SD. Test statistique : two-way ANOVA. * $p < 0{,}05$; ** : $p < 0{,}005$; *** : $p < 0{,}0005$; **** : $p < 0{,}0001$

- ***Le virus Zika infecte et franchit un modèle in vitro d'épithélium intestinal sans altérer sa fonction de barrière***

Étant donné que les cellules de la lignée entérocytaire humaine Caco-2 semblent sensibles à l'infection ZIKV et que cette dernière est accompagnée d'une production virale, nous nous sommes demandés si celle-ci pouvait avoir lieu par le pôle basolatéral, contribuant ainsi à un franchissement de la barrière intestinale par ZIKV. Afin de répondre à cette question, nous avons conçu un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal en ensemençant des cellules Caco-2/TC7 sur des membranes semi-perméables (porosité de 3um) disposées au sein de filtres Transwell®.

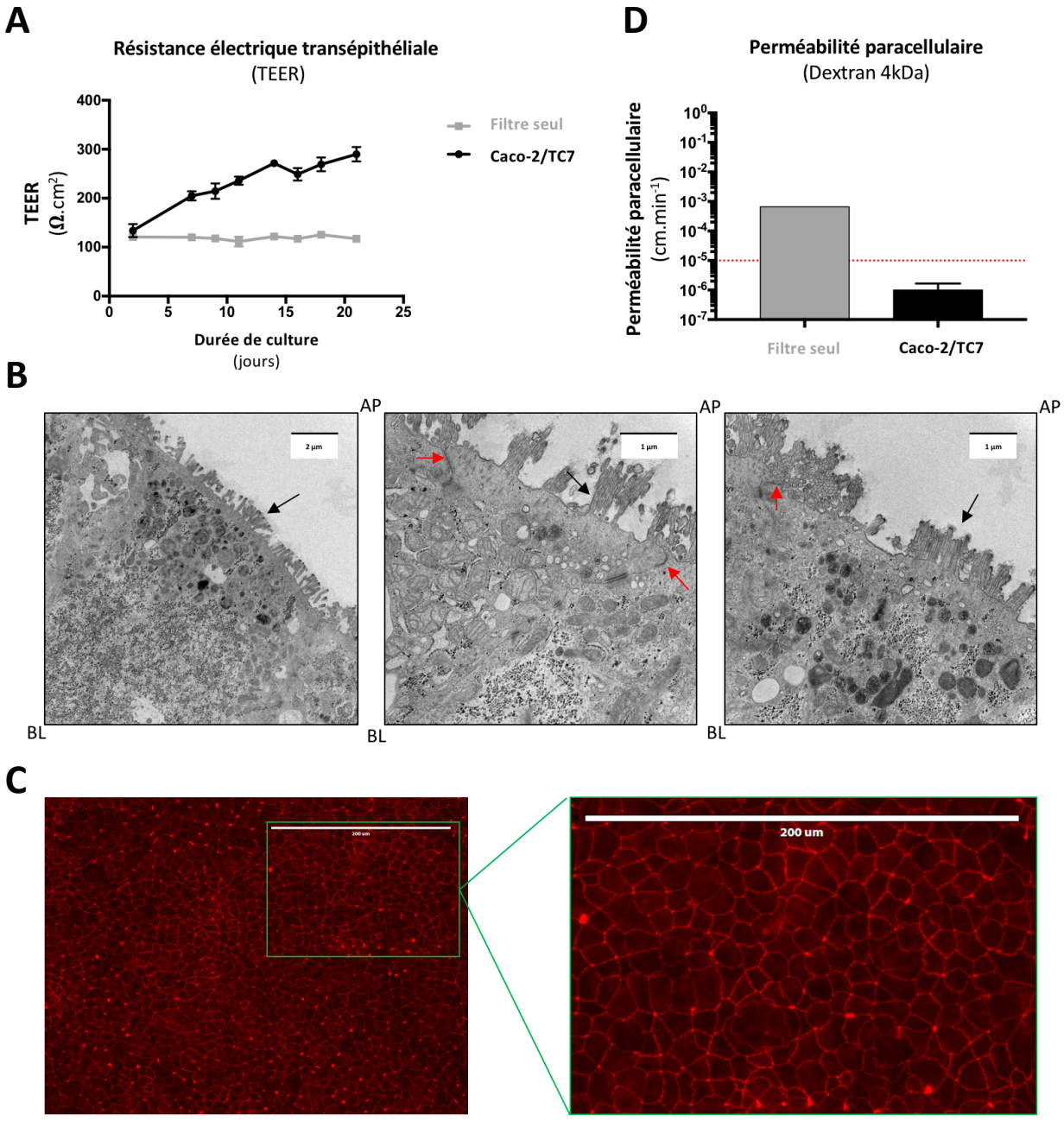


Figure 58. Caractérisation structurale et fonctionnelle du modèle *in vitro* d'épithélium intestinal

(A) La résistance électrique transépithéliale (TEER) des monocouches de cellules Caco-2/TC7 a été mesurée au cours du temps et exprimée en Ω.cm². **(B)** L'architecture des monocouches cellulaires Caco-2/TC7 différenciées et polarisées a été observée par microscopie électronique à transmission. Les microvillosités et les jonctions serrées sont indiquées par des flèches noires et rouges, respectivement. AP : pôle apical; BL : pôle basolatéral. **(C)** Les jonctions serrées ont également été visualisées par immunodétection de la protéine adaptatrice *zonula occludens – 1* (ZO-1, rouge). Barre d'échelle : 200 µm. **(D)** La fonction de barrière du modèle a été vérifiée en mesurant la perméabilité paracellulaire au dextran (4 kDa). Après ajout d'une solution de dextran (4 kDa) couplé au FITC dans le compartiment apical, la fluorescence basolatérale est mesurée au cours du temps. La perméabilité P est directement proportionnelle à la pente de la droite modélisant cette augmentation de fluorescence, et exprimée en $cm.min^{-1}$. La perméabilité du filtre seul (gris) est utilisée comme contrôle de perméabilité.

Au bout de 14 à 21 jours de culture, celles-ci prolifèrent, se différencient, et se polarisent, afin de former une monocouche cellulaire confluente et imperméable, délimitant un compartiment apical (correspondant au lumen intestinal) d'un compartiment basolatéral (correspondant à la *lamina propria*) (Figure 34).Dans ce modèle, la prolifération cellulaire est observée en mesurant la résistance électrique transépithéliale (TEER) de la monocouche tous les 2 à 3 jours. Alors que la TEER des membranes semi-perméables seules est d'environ 100 Ω.cm², celle-ci augmente au cours du temps en présence de cellules Caco-2/TC7, mettant en évidence la prolifération cellulaire (Figure 58A). La TEER des monocouches Caco-2/TC7 atteint, dès le 14ème jour, un plateau à 250-300 Ω.cm². A ce stade, les cellules Caco-2/TC7 sont différenciées en cellules enterocyte-like, comme l'atteste la présence de microvillosités et de jonctions serrées au pôle apical (Figure 58B et 58C).

D'un point de vue fonctionnel, l'imperméabilité de ces monocouches est confirmée en incubant celles-ci avec une solution de dextran (4kDa) couplé à un fluorochrome (FITC). En mesurant l'intensité de fluorescence dans le compartiment basolatéral au cours du temps, l'augmentation de celle-ci est associée à une perméabilité paracellulaire (Figure 58D). Des valeurs de perméabilité inférieures à 10^{-5} cm.min^{-1} signifient que la monocouche de cellules Caco-2/TC7 est imperméable.

Afin d'étudier les interactions entre ZIKV et la barrière intestinale, nous avons exposé plusieurs monocouches différenciées, polarisées et imperméables de cellules Caco-2/TC7 à différentes doses de la souche américaine de ZIKV. En contrôle positif d'altération de la perméabilité épithéliale, un groupe de monocouches a également été traité à l'EDTA, chélateur de cations et déstabilisateur des jonctions serrées. L'état de celles-ci a été suivi pendant 4 jours, correspondant à la durée de vie moyenne d'un entérocyte au sein de l'épithélium intestinal.

Mesure de la TEER. Comparativement aux monocouches non exposées (Figure 59A, ligne noire), la TEER des monocouches exposées à ZIKV évoluent d'une façon similaire, et de façon indépendante de la dose inoculée (Figure 59A, lignes jaune, orange, rouge), suggérant que l'exposition de monocouches épithéliales intestinales à ZIKV n'entraîne pas d'altération majeure. En contrôle positif d'altération de la monocouche, le traitement EDTA, qui entraîne une déstabilisation des jonctions serrées, provoque une chute drastique de la TEER dès les premières heures de traitement (Figure 59A, ligne verte), démontrant le lien entre la TEER et l'intégrité des jonctions serrées.

Mesure de la perméabilité paracellulaire. Le maintien de la fonction de barrière des monocouches exposées ou non à ZIKV a également été évalué. De façon intéressante, aucun effet significatif de variation de la perméabilité paracellulaire au dextran (4 kDa) n'a lieu dans les monocouches exposées ou non à ZIKV, quelle que soit la quantité de particules virales ajoutée au pôle apical (Figure 59B). En revanche, et de façon cohérente avec la chute de la TEER, la perméabilité paracellulaire des monocouches de cellules Caco-2/TC7 traitées à l'EDTA est accrue d'un facteur 1000 (Figure 59B). Ainsi, l'infection ZIKV d'un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal n'entraîne pas d'altération de sa fonction de barrière.

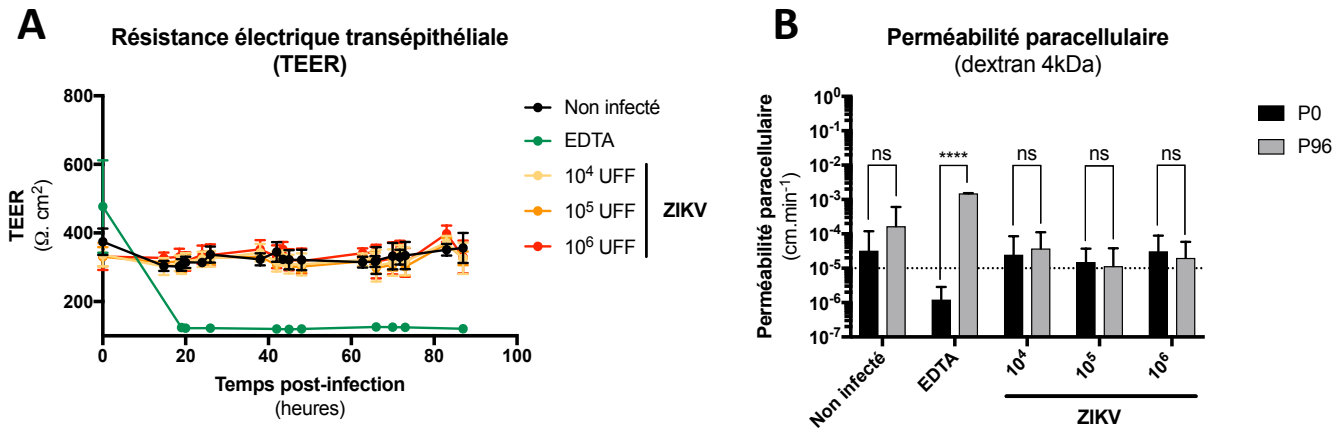


Figure 59. Effet de l'infection ZIKV sur la perméabilité du modèle *in vitro* d'épithélium intestinal
Au bout de 21 à 28 jours de culture, des monocouches de cellules Caco-2/TC7 ont été exposées ou non à différentes doses (10^4, 10^5, 10^6 UFF) de la souche américaine (Brésil/2016/INMI1) de ZIKV. En contrôle positif d'altération de la barrière intestinale, des monocouches ont été traitées avec 12,5mM d'EDTA. L'altération de la barrière intestinale a été évaluée pendant 90 heures en mesurant **(A)** la résistance électrique transépithéliale (TEER) et **(B)** la perméabilité paracellulaire au dextran (4 kDa).

Intégrité des jonctions serrées. Enfin, l'intégrité des jonctions serrées au sein des monocouches cellulaires exposées ou non aux différentes doses de ZIKV a également été vérifiée par immunodétection de la protéine adaptatrice des jonctions serrées ZO-1. Dans les monocouches de cellules Caco-2/TC7 non infectées, la protéine ZO-1 est localisée au niveau de la membrane cytoplasmique et délimite le pourtour des cellules. L'aspect en « nid d'abeille » du marquage ZO-1 caractérise ainsi un tapis cellulaire confluent aux jonctions serrées intactes (Figure 60). Lorsque celles-ci sont déstabilisées, suite à un traitement par l'EDTA, la protéine ZO-1 est délocalisée et diffuse dans le cytoplasme (Figure 60). De façon cohérente avec le maintien de la TEER et de la perméabilité paracellulaire, l'exposition des monocouches à différentes doses de ZIKV n'entraîne pas de diffusion cytosolique de ZO-1, dont la localisation subcellulaire est restreinte au pourtour cellulaire (Figure 60). Ainsi, l'immunodétection de celle-ci en « nid d'abeille » confirme que l'infection ZIKV des cellules enterocyte-like n'altère pas l'intégrité des jonctions serrées de l'épithélium intestinal.

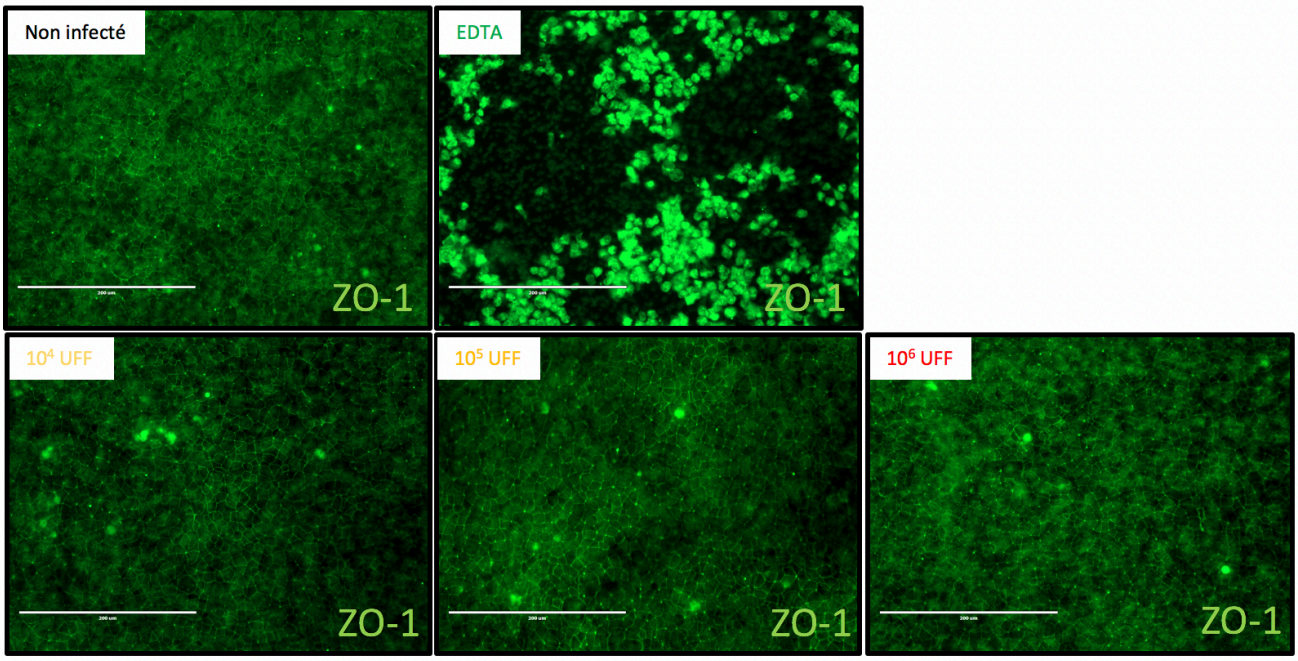


Figure 60. Effet de l'infection ZIKV sur le maintien des jonctions serrées
L'intégrité des jonctions serrées au sein des monocouches non exposées, exposées à différentes doses de ZIKV, ou traitées à l'EDTA a été vérifiée par immunomarquage de la protéine adaptatrice des jonctions serrées ZO-1 (vert). Barre d'échelle : 200 µm.

Franchissement de l'épithélium. Étant donné que l'infection ZIKV des monocouches de cellules Caco-2/TC7 n'entraîne pas d'altération de leur fonction de barrière et que celles-ci sont permissives à l'infection ZIKV, nous nous sommes demandés si la production virale pouvait avoir lieu via le pôle basolatéral. Par qRT-PCR, la charge virale dans chaque compartiment (apical et basolatéral) des monocouches infectées imperméables a été mesurée au cours du temps (48h et 90h post-infection) (Figure 61A). Dans les deux compartiments, celle-ci augmente de 1 à 2 log entre 48h et 90h post-infection, démontrant une production virale par les deux pôles cellulaires. En comparant les charges virales des surnageants des monocouches exposées à différentes doses de ZIKV, nous observons également un effet dose-dépendant de cette production virale (Figure 61A). De façon intéressante, nous observons également, bien que non systématique, une production de particules infectieuses dans le surnageant basolatéral entre 48h et 90h post-infection. Alors que celle-ci est comprise entre 0 et 5,2.10^3 UFF/mL à 48h post-infection, celle-ci s'élève ensuite à environ 2,3.10^6 UFF/mL à 90h post-infection (Figure 61B).

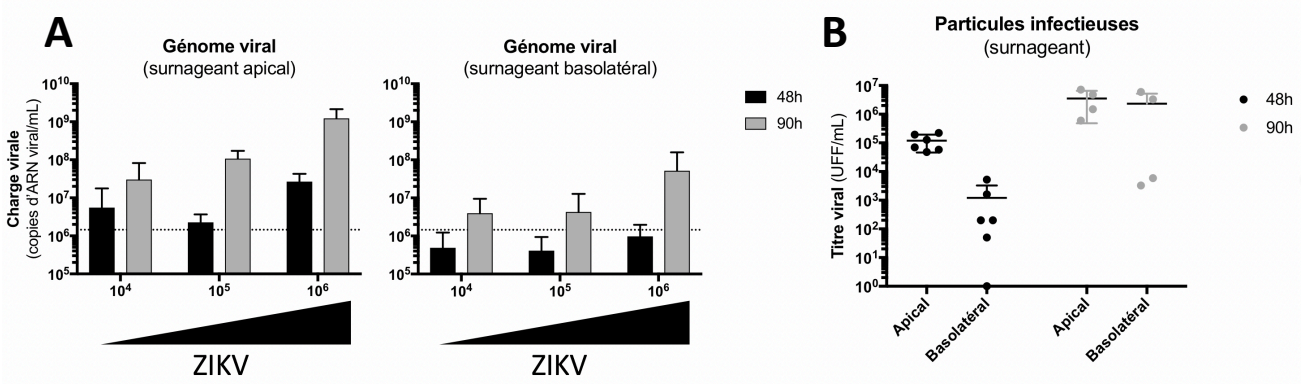


Figure 61. Franchissement d'un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal par ZIKV
Les surnageants des compartiments apicaux et basolatéraux des monocouches Caco-2/TC7 imperméables et exposées ou non à différentes doses de ZIKV ont été prélevés à 48h et 90h post-infection. La charge virale a été mesurée par qRT-PCR **(A)** et par titrage sur cellules Vero **(B)**. Ligne pointillée noire : limite de spécificité de la méthode, estimée à partir des surnageants des monocouches non infectées.

Pour conclure, ces résultats démontrent que ZIKV est capable d'infecter un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal humain de façon productive sans altérer sa fonction de barrière. La production virale, bien que majoritairement assurée par le pôle apical, résulte également en un relarguage de particules infectieuses par le pôle basolatéral, pouvant contribuer à un potentiel franchissement de la barrière intestinale lors d'une infection par voie orale.

DISCUSSION

- **AXE I : ORIGINE DES PARTICULES INFECTIEUSES DANS LE LAIT MATERNEL**

Durant l'épidémie en Amérique Latine en 2015-2016, la présence de ZIKV a été rapportée dans le lait maternel de femmes infectées. De fortes charges virales (génome viral) ont été détectées dans le lait maternel et associées à la présence de particules infectieuses. En revanche, l'origine de ces particules infectieuses dans le lait maternel reste, à ce jour, inconnue. De façon intéressante, la détection de ZIKV dans le lait maternel plus de 33 jours après l'apparition des symptômes lorsque la virémie était nulle, suggère un potentiel rôle de réservoir viral de la glande mammaire.

Dans le contexte d'une infection *in vivo* (modèles simien et murin), la dissémination de ZIKV dans de nombreux organes a bien été décrite (rate, foie, reins, testicules, cerveau, moelle épinière, placenta,…)[115,322]. En revanche, la dissémination virale au sein du tissu mammaire est restée longtemps inexplorée. Récemment, une étude a démontré la dissémination et la réplication de ZIKV dans les glandes mammaires en lactation de souris AG129 suite à une infection systémique[126]. Dans notre étude, nous avons confirmé que ZIKV était également capable de se propager, dès 3 jours post-infection, dans les glandes mammaires non lactantes de souris montrant une immunodépression moindre (modèle A129). Cependant, la charge virale détectée dans les glandes mammaires non lactantes de ces souris est inférieure à la charge virale moyenne détectée dans les glandes mammaires lactantes de souris AG129 (environ 1 log de différence)[126]. De façon importante, la perfusion intracardiaque des souris avec un tampon PBS avant la collecte d'organes a permis d'éliminer toute potentielle contamination des échantillons de tissus mammaires avec des particules virales circulantes, et la séparation des glandes mammaires et des ganglions lymphatiques inguinaux, riches en cellules cibles de ZIKV, a permis, dans notre travail, de confirmer l'infection du tissu mammaire par ZIKV au cours de l'infection aiguë.

Alors que ZIKV est principalement transmis par voie vectorielle, nous avons ensuite étudié le processus de dissémination virale dans les glandes mammaires suite à une infection locale (voie sous-cutanée). Comparativement aux souris infectées par voie systémique, nous avons montré que la dissémination de ZIKV dans les glandes mammaires suite à une infection locale était retardée à 6 jours post-infection et ressemblait davantage à un pic. La cinétique de dissémination de ZIKV dans les glandes mammaires pourrait ainsi être liée à la voie

d'exposition. La transmission sexuelle de ZIKV ayant été bien documentée, il serait intéressant d'étudier le processus de dissémination virale dans les glandes mammaires murines suite à une administration intra-vaginale ou à un rapport sexuel avec des mâles infectés. L'infection ZIKV des glandes mammaires adultes et non lactantes n'est associée à aucune altération morphologique détectable selon nos critères d'analyse. Une étude supplémentaire devrait être entreprise afin d'explorer d'éventuels effets de l'infection ZIKV lorsque celle-ci a lieu au cours du développement (puberté) ou de la différenciation lobulo-alvéolaire (gestation, lactation) des glandes mammaires. De plus, alors que le lien entre l'infection ZIKV et l'apparition de microcéphalies a été confirmé *in vitro* en infectant des organoïdes de cerveau[155], la culture tridimensionnelle de cellules épithéliales mammaires sous forme de mammosphères[323] pourrait apporter des éléments de réponse complémentaires concernant les effets de l'infection ZIKV sur l'organisation de la structure épithéliale mammaire. Enfin, d'un point de vue fonctionnel, l'étude *in vivo* du métabolisme (transcriptomique des voies de signalisation et des gènes impliqués dans la biosynthèse et la sécrétion du lait) ainsi que du fonctionnement (analyses quantitatives et qualitatives du lait maternel, test d'éjection par l'ocytocine) des glandes mammaires lactantes suite à l'infection ZIKV serait également intéressante.

Les glandes mammaires sont des organes dynamiques subissant d'importants remodelages architecturaux et métaboliques en fonction de leur statut (puberté, gestation, lactation, involution) . Par conséquent, la dissémination, la réplication et la clairance de ZIKV dans les glandes mammaires peuvent également varier en fonction du statut de cet organe.

Alors que la charge virale de ZIKV est temporaire dans les glandes mammaires non lactantes, Regla-Nava et ses collègues ont détecté d'importantes charges virales de ZIKV dans les glandes mammaires murines en lactation dès 5 jours post-infection et jusqu'à au moins 11 jours post-infection , suggérant un potentiel effet de la lactation sur l'excrétion virale de ZIKV dans le lait maternel. En effet, l'abondance et la prolifération des cellules épithéliales mammaires au cours de la lactation pourraient contribuer au rôle de réservoir actif et permanent des glandes mammaires lactantes[173]. De plus, des modifications phénotypiques induites par la différenciation cellulaire survenant pendant la phase de lactation pourraient permettre aux cellules épithéliales luminales alvéolaires d'être plus sensibles à l'infection par ZIKV. Alors que nous avons relevé une charge virale importante dans les cellules non immunitaires et non

endothéliales des glandes mammaires de souris A129 infectées, l'hypothèse de l'infection des cellules épithéliales par ZIKV et leur contribution dans l'excrétion virale dans le lait maternel est ainsi renforcée. Cependant, la vérification de l'enrichissement en cellules épithéliales mammaires $CD24^+$ dans la fraction de cellules non immunitaires et non endothéliales n'avait pas pu être réalisée dans notre étude. Néanmoins, nous avons pour la première fois montré que des cellules épithéliales mammaires humaines primaires pouvaient être infectées par ZIKV *in vitro*, résultant en une production virale importante au cours du temps. Délimitant les compartiments sanguin et lactifère, l'épithélium mammaire est constitué de deux couches cellulaires : une couche interne composée de cellules luminales qui produisent et sécrètent le lait maternel dans le lumen alvéolaire, et une couche externe composée de cellules myoépithéliales qui se contractent afin d'éjecter le lait maternel néosynthétisé vers le mamelon. En utilisant des lignées humaines de cellules épithéliales mammaires luminales (MCF-7) et myoépithéliales (MDA-MB-231), nous avons également constaté que ces deux types cellulaires étaient sensibles et permissifs à l'infection ZIKV, avec des efficacités d'infection différentes (35% de cellules luminales et 7% de cellules myoépithéliales). Néanmoins, le nombre limité de cellules luminales et myoépithéliales infectées était suffisant pour produire et sécréter, de façon non significativement différente, d'importantes quantités de particules infectieuses à des titres viraux comparables à ceux des cellules Vero, hautement permissives à l'infection ZIKV. Ces résultats démontrent ainsi la capacité élevée des cellules épithéliales mammaires à assurer une production virale efficace. Alors que la différenciation et l'activation sécrétoires ayant lieu au cours de la gestation et de la lactation entraînent la différenciation des cellules luminales en cellules alvéolaires productrices et sécrétrices de lait maternel, l'effet du contexte hormonal (oestrogènes, progestérone, prolactine) sur la permissivité *in vitro* des cellules luminales MCF-7 devrait également être explorée.

Les cellules luminales alvéolaires sont spécialisées dans la sécrétion de différentes molécules (protéines, lipides, lactose,…), ce qui contribue à la richesse et à la diversité des différents constituants du lait maternel. L'exploitation des divers mécanismes de sécrétion (exocytose, sécrétion apocrine, transcytose) activées au sein des cellules luminales alvéolaires pourrait être optimale pour l'excrétion de nombreuses particules virales dans le lait maternel. Plusieurs modèles hypothétiques peuvent être proposés quant aux mécanismes d'excrétion de ZIKV dans le lait maternel.

D’une part, le fait que les cellules myoépithéliales basales soient également permissives à l'infection par ZIKV laisse supposer une excrétion virale dans le lait maternel suite à l’infection successive des cellules myoépithéliales puis luminales. *In vivo*, Regla-Nava et collègues ont observé que les cellules myoépithéliales étaient infectées par ZIKV suite à une infection systémique de souris AG129[126]. En revanche, leur capacité à produire des particules virales infectieuses n’a pas été testée. D’autre part, nous ne pouvons pas exclure que des cellules immunitaires circulantes et infectées par ZIKV puissent, lors de leur transmigration de la circulation sanguine au lait maternel, contribuer à l’entrée de ZIKV dans le compartiment lactifère (mécanisme de « cheval de Troie »). Néanmoins, le génome viral de ZIKV a été détecté dans le lait maternel d'une femme allaitante 33 jours après l'apparition des symptômes et en l'absence de virémie[90], suggérant l'existence d'un réservoir au sein de la glande mammaire. Par conséquent, nous proposons une troisième hypothèse dans laquelle la transmigration de cellules immunitaires infectées à travers l’épithélium mammaire participerait à l’entrée de ZIKV dans le compartiment lactifère au moment où le patient est virémique, suivie d’une infection *de novo* des cellules épithéliales luminales dans le compartiment alvéolaire, servant de réservoir dans la glande mammaire tant que l'état de lactation est maintenu. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de transmigration de monocytes infectés ou non par ZIKV à travers un modèle *in vitro* d’épithélium mammaire cultivé sur filtre Transwell® pourraient permettre d’apporter des éléments de réponse quant à l’existence potentielle de ce mécanisme de franchissement. De plus, l’étude de l’infiltration de cellules immunitaires (infectées ou non par ZIKV) au sein de glandes mammaires couplée à des expériences d’immunomarquage (immunofluorescence, immunohistochimie) permettant de visualiser *in situ* le tropisme cellulaire de ZIKV au sein des glandes mammaires murines semblent nécessaires pour confirmer le potentiel rôle des cellules immunitaires, myoépithéliales et luminales dans l’excrétion de ZIKV dans le lait maternel.

A ce jour, la nature de l’entité infectieuse de ZIKV dans le lait maternel reste indéterminée. Alors que des particules infectieuses pourraient être produites par les cellules épithéliales mammaires, celles-ci pourraient également être sécrétées au sein de vésicules extracellulaires, permettant leur stabilisation et leur transport le long du tractus gastro-intestinal du nourrisson. Enfin, des cellules infectées par ZIKV pourraient constituer un troisième type d’entité infectieuse de ZIKV dans le lait maternel.

- **AXE II : TRANSMISSIBILITE DES PARTICULES INFECTIEUSES AU NOUVEAU-NE PAR VOIE ORALE**

La présence de particules virales dans le lait maternel nous a amené à nous demander si celles-ci pouvaient être transmises de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel. La transmission orale de ZIKV a déjà été démontrée chez un modèle simien[112,113]. En 2017, Newman CM et ses collègues ont en effet démontré que des macaques rhésus étaient sensibles à l'infection ZIKV suite à une inoculation virale directe au contact des amygdales[112]. Au cours de la même année, la transmissibilité de ZIKV par voie intragastrique a été confirmée chez des macaques cynomolgus[113]. A l'heure actuelle, l'infection orale d'un modèle animal au stade nouveau-né n'a jamais été recherchée. Ainsi, dans la deuxième partie de notre étude, nous avons utilisé un modèle murin bien établi (modèle A129) pour étudier la sensibilité des souriceaux à l'infection ZIKV par voie orale. Ce modèle, bien que déficient pour les récepteurs aux interférons de type I, constitue un modèle animal relevant pour l'étude de l'infection ZIKV et récapitule la physiopathologie de l'infection ZIKV observée chez l'Homme (dissémination multi-viscérale, persistance virale dans le cerveau et les testicules, excrétion virale dans de nombreux fluides biologiques, transmissions sexuelle et transplacentaire, microcéphalies, recherche en vaccinologie…). Pour la première fois, nous avons constaté que ZIKV était capable d'infecter des souriceaux A129 âgés de 2 jours (64% des souriceaux) par voie orale avec une mortalité associée élevée (72% des souriceaux infectés). Bien que les causes de mortalité restent inconnues, un désordre neurologique peut être avancé, en conjonction avec d'autres désordres viro-induits. En effet, le génome viral a été détecté dans le cerveau de souriceaux infectés par ZIKV, suggérant une réplication virale dans cet organe. D'après la littérature, ZIKV est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique de souriceaux, résultant en une neuroinvasion et une neurovirulence virales[324]. Ici, nous démontrons que l'infection orale par ZIKV conduit également à une neuroinvasion virale. Alors que jusqu'à $4{,}8.10^6$ UFF/mL ont été détectées dans le plasma de souriceaux infectés par voie orale, la neuroinvasion ayant lieu suite à une infection orale pourrait impliquer le franchissement de la barrière hémato-encéphalique, mais des études supplémentaires sont à ce jour nécessaires pour caractériser la neuroinvasion, le neurotropisme, et la neurovirulence potentielle de ZIKV suite à une infection par voie orale. Pour la première fois, nous avons reconstitué la transmission mère-enfant de ZIKV au cours de l'allaitement maternel chez le modèle murin

(modèle A129). En infectant des souris mères lactantes 3 jours après la parturition, nous avons constaté que 24% des souriceaux (4/17 souriceaux allaités par une mère infectée par ZIKV), développaient une infection dès le 2ème jour. Alors que ZIKV est excrété dans le lait maternel de souris infectées[126] et que le lait maternel humain n'exerce pas, sur le court terme, d'effet inhibiteur de l'infectiosité de ZIKV[110,111], la transmission de ZIKV de la mère au souriceau aurait pu être effectuée par ingestion de lait contaminé. Néanmoins, cette expérience doit être répétée plusieurs fois avant de conclure sur la transmissibilité de ZIKV par allaitement maternel.

Suite à une ingestion de particules infectieuses ZIKV, plusieurs sites du tractus gastro-intestinal pourraient jouer un rôle de porte d'entrée virale. Les amygdales, premiers sites lymphoïdes au contact du contenu buccal (ex : lait maternel), ont pour fonction de capturer divers antigènes provenant de l'environnement extérieur et peuvent, dans certains cas, constituer une porte d'entrée virale. Comme démontré par Newman CM et ses collègues, celles-ci pourraient constituer une porte d'entrée de ZIKV chez son hôte au cours d'une exposition orale[112]. La démonstration de la susceptibilité de macaques cynomolgus à l'infection ZIKV suite à une inoculation intra-gastrique suggère que d'autres sites, telles que la barrière intestinale, pourraient également jouer un rôle de porte d'entrée virale de ZIKV[113]. En effet, bien que ZIKV se soit récemment révélé transmissible par voie intra-anale à travers la muqueuse ano-rectale[122], aucune étude n'a exploré le rôle de l'intestin grêle dans le contexte d'une exposition par voie orale. En particulier, il est bien connu que plusieurs virus transmis par voie orale pénètrent dans l'hôte en traversant l'épithélium intestinal, soit par infection des entérocytes (Rotavirus[325]) ou par transcytose via les entérocytes ou les cellules M (HTLV-1[244], VIH[239,310], Poliovirus[308], Norovirus[320]). Dans le cadre de la transmission orale de ZIKV, nous nous sommes ainsi demandé si ZIKV pouvait utiliser l'une de ces stratégies pour infecter l'hôte. Comme démontré par Chan et collègues[153], nous avons confirmé que plusieurs lignées cellulaires entérocytaires humaines étaient permissives à l'infection par ZIKV. La sensibilité et la permissivité d'autres cellules épithéliales intestinales n'a, à ce jour, pas été documentée.

Avant ce travail, les interactions entre ZIKV et la barrière intestinale n'avaient jamais été étudiées. De façon intéressante, nous avons montré que l'addition de différentes charges infectieuses sur le pôle apical de monocouches de cellules Caco-2/TC7 différenciées entraînait

une production de particules virales infectieuses par les pôles apical et basolatéral dès 48h post-infection. De plus, cette infection n'est accompagnée d'aucune altération notable de l'intégrité des jonctions serrées et de la perméabilité des monocouches, démontrant que ZIKV est capable d'infecter et de franchir un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal sans altérer sa fonction de barrière. Alors que l'étude de la production cytokinique n'a pas été entreprise dans ce travail, il serait également intéressant d'étudier l'effet de la présence de cellules infectées par ZIKV sur l'intégrité de l'épithélium intestinal. En effet, alors que ZIKV est capable de franchir un modèle *in vitro* de barrière hémato-testiculaire sans altérer sa fonction de barrière, la présence de surnageant de macrophages infectés, contenant divers médiateurs cytokiniques inflammatoires, entraîne une disruption de celle-ci. Ainsi, la présence de cellules infectées et de médiateurs inflammatoires au niveau des pôles apical et basolatéral de l'épithélium intestinal pourrait induire une augmentation de la perméabilité paracellulaire, facilitant le franchissement de l'épithélium par de nombreux virions.

D'un point de vue mécanistique, la transcytose de particules virales infectieuses à travers la l'épithélium intestinal a déjà été mise en évidence pour certains virus (HTLV-1[244], VIH[239,310], Poliovirus[308], Norovirus[320]), et celle-ci pourrait également faciliter le franchissement de la barrière intestinale par ZIKV. Néanmoins, la quantité importante de particules virales détectées et quantifiées dans le compartiment basolatéral de monocouches de cellules Caco-2/TC7 infectées semble renforcer l'hypothèse d'un relargage basolatéral par production virale. Des expériences d'inhibition physico-chimique du processus de transcytose (diminution de la température à 4°C, drogues et autres inhibiteurs spécifiques…) ainsi que l'observation de particules virales au sein des monocouches cellulaires infectées (microscopie électronique à transmission) devraient permettre de conclure sur le mécanisme exact de franchissement. De plus, alors que la transmission intercellulaire de ZIKV n'a, pour l'heure, jamais été observée, celle-ci pourrait également avoir lieu au niveau des contacts intercellulaires entre d'éventuelles cellules infectées présentes dans le lait maternel et les cellules épithéliales intestinales. Enfin, l'efficacité du franchissement de l'épithélium intestinal par ZIKV pourrait également être modulée par de nombreux facteurs, tels que les IgA sécrétoires, le mucus, les peptides antimicrobiens, ou encore le microbiote intestinal. Une étude plus approfondie portant sur les interactions entre ZIKV et les différents acteurs de la barrière intestinale ainsi que les mécanismes de franchissement de l'épithélium s'avère ainsi nécessaire.

Suite au franchissement de l'épithélium intestinal, nous supposons que l'infection subséquente des cellules immunitaires résidentes de la *lamina propria* (cellules cibles naturelles de l'infection ZIKV) pourrait permettre à ZIKV de se propager dans l'organisme de l'hôte. De façon intéressante, il a été démontré chez le modèle murin que suite à une administration intra-anale, le virus rabique était capable de gagner les fibres nerveuses de la muqueuse intestinale via l'infection des cellules entéroendocrines[269], liées au système nerveux entérique par des neuropodes. Ainsi, l'infection des cellules entéroendocrines de l'épithélium intestinal par ZIKV au cours de l'infection orale pourrait également jouer un rôle dans l'entrée virale de ZIKV chez l'hôte, et plus particulièrement dans les systèmes nerveux entérique et central.

Enfin, il a été démontré que l'exposition de souris A129, de cochons d'Inde Hartley et de macaques cynomolgus à ZIKV par voie intra-nasale conduisait à une infection systémique[113]. De plus, Vielle et collègues ont démontré que ZIKV était capable, bien que modestement, de franchir un modèle *in vitro* d'épithélium pulmonaire[168]. Ainsi, l'entrée virale de ZIKV chez le nourrisson au cours de l'allaitement maternel pourrait également impliquer un franchissement de l'épithélium respiratoire, celui-ci étant également en contact avec le lait maternel au cours de l'allaitement maternel (« fausses routes »).

À l'heure actuelle, la recommandation officielle de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) affirme que «les avantages de l'allaitement pour le nourrisson et la mère l'emportent sur les risques potentiels de transmission de ZIKV par le lait maternel»[326]. En effet, seules quelques études ont rapporté la présence de particules infectieuses et/ou de génome viral de ZIKV dans le lait maternel. Cependant, en raison du profil clinique asymptomatique ou non spécifique de la plupart des infections à ZIKV, les sous-diagnostics peuvent conduire à une sous-estimation de la prévalence réelle de ZIKV dans les populations humaines. *A fortiori*, l'excrétion virale de ZIKV dans les fluides biologiques humains n'a pas été systématiquement recherchée. Réunies, ces conditions ne permettent pas, à l'heure actuelle, de reconnaître l'allaitement maternel comme voie de transmission potentielle de ZIKV. Plusieurs approches épidémiologiques et expérimentales sont ainsi nécessaires pour apporter les éléments de preuve nécessaires à l'affirmation de son existence. D'un point de vue épidémiologique, la recherche systématique du génome viral et/ou de particules infectieuses dans le lait maternel de femmes allaitantes infectées devrait être effectuée, ainsi que le diagnostic des nourrissons

allaités par une femme infectée. L'infection de ces nouveau-nés par le lait maternel est cependant difficile à prouver formellement étant donné l'abondance du vecteur en zones et situations endémique et épidémique. Ainsi, une preuve de concept expérimentale de la transmission de la mère à l'enfant de ZIKV au cours de l'allaitement maternel s'avère indispensable et être effectué chez plusieurs modèles animaux sensibles à l'infection ZIKV (souris, cochons d'Inde, singes). Enfin, la démonstration de l'apparition de syndromes neurologiques liés à Zika suite à une exposition orale (clinique ou expérimentale) permettrait également de sensibiliser les populations à l'allaitement maternel dans le contexte d'infection par ZIKV. Cette thèse défend l'existence de la transmission mère-enfant de ZIKV au cours de l'allaitement maternel grâce à plusieurs approches expérimentales. A l'heure ou ce manuscrit de thèse est rédigé, les travaux présentés dans celui-ci ont été soumis à publication.

Enfin, et quoi qu'il en soit, ZIKV est un virus à ARN. Par conséquent, celui-ci évolue rapidement et est, de façon perpétuelle, soumis à adaptation. À titre d'exemple, une mutation de substitution au sein de la protéine non structurale NS1, survenue au début des années 2010, a favorisé la subversion de la réponse interféron par ZIKV ainsi que l'augmentation de sa transmissibilité par les moustiques, ce qui a potentiellement favorisé la mise en place de nouveaux foyers épidémiques[72]. En 2017, Yuan et ses collègues décrivirent qu'une mutation unique au sein de la protéine PrM, la mutation S139N, renforça la neurovirulence du virus Zika et contribua à l'induction des microcéphalies liées à l'infection par ZIKV[151]. Aujourd'hui, nous ne pouvons ignorer que de futures mutations au sein du génome viral pourraient renforcer le potentiel de transmission de ZIKV de la mère à l'enfant via l'allaitement maternel, comme des mutations impactant la dissémination virale au sein des glandes mammaires, la permissivité des cellules mammaires épithéliales à l'infection par ZIKV, la stabilité virale dans le lait maternel ou le franchissement de la barrière intestinale par ZIKV.

CONCLUSION GENERALE

Pour conclure cette thèse, dénommée « Tropisme et dissémination du virus Zika de la mère à l'enfant au cours de l'allaitement maternel », nous avons tout d'abord montré que la glande mammaire de souris infectées par voies locale et systémique constituait un site de réplication cible, et que les cellules épithéliales mammaires étaient permissives à l'infection par ZIKV, suggérant une implication de l'épithélium mammaire dans l'excrétion de ZIKV dans le lait maternel. Deuxièmement, nous avons démontré que des souriceaux étaient sensibles à l'infection orale par ZIKV, corroborant les rapports antérieurs de transmission orale de ZIKV chez les modèles simiens et renforçant l'intérêt d'explorer ce mode de transmission. Troisièmement, nous avons démontré que ZIKV était capable d'infecter et de franchir un modèle *in vitro* d'épithélium intestinal sans altérer sa fonction de barrière, nous permettant ainsi de considérer la muqueuse intestinale comme potentiel site d'entrée de ZIKV après ingestion de particules virales infectieuses. Enfin, une expérience préliminaire a démontré que l'infection de souris A129 allaitantes par ZIKV résultait en une transmission virale chez quelques souriceaux au cours de l'allaitement.

Pris ensemble, ce travail constitue la première approche synergique visant à caractériser chronologiquement les différentes étapes ayant lieu au cours d'une transmission virale de la mère à l'enfant par le lait maternel, et offrent de nouvelles perspectives à explorer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Flaviviridae - Flaviviridae - Positive-sense RNA Viruses. *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae. (Accessed: 17th April 2019)

2. Moureau, G. *et al.* New Insights into Flavivirus Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences. *PLoS One* **10**, (2015).

3. Haddow, A. D. *et al.* Genetic Characterization of Spondweni and Zika Viruses and Susceptibility of Geographically Distinct Strains of Aedes aegypti, Aedes albopictus and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) to Spondweni Virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **10**, e0005083 (2016).

4. Gong, Z., Gao, Y. & Han, G.-Z. Zika Virus: Two or Three Lineages? *Trends in Microbiology* **24**, 521–522 (2016).

5. Haddow, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1477 (2012).

6. Faria, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**, 345–349 (2016).

7. Boigard, H. *et al.* Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005608 (2017).

8. Lin, H.-H., Yip, B.-S., Huang, L.-M. & Wu, S.-C. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology Advances* **36**, 47–53 (2018).

9. Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X. & Amara, A. Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses* **6**, 69–88 (2014).

10. Yun, S.-I. *et al.* Complete Genome Sequences of Three Historically Important, Spatiotemporally Distinct, and Genetically Divergent Strains of Zika Virus: MR-766, P6-740, and PRVABC-59. *Genome Announc* **4**, (2016).

11. Chiu, W.-W., Kinney, R. M. & Dreher, T. W. Control of Translation by the 5'- and 3'-Terminal Regions of the Dengue Virus Genome. *J Virol* **79**, 8303–8315 (2005).

12. Villordo, S. M. & Gamarnik, A. V. Genome Cyclization as Strategy for Flavivirus RNA Replication. *Virus Res* **139**, 230–239 (2009).

13. Kim, S. Y. *et al.* Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans.

Biochemistry **56**, 1151–1162 (2017).

14. Chen, Y. *et al.* Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine* **3**, 866 (1997).

15. Hamel, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology* **89**, 8880–8896 (2015).

16. Tabata, T. *et al.* Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host & Microbe* **20**, 155–166 (2016).

17. Meertens, L. *et al.* Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports* **18**, 324–333 (2017).

18. Richard, A. S. *et al.* AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 2024–2029 (2017).

19. Schaar, H. M. van der *et al.* Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells. *PLOS Pathogens* **4**, e1000244 (2008).

20. Persaud, M., Martinez-Lopez, A., Buffone, C., Porcelli, S. A. & Diaz-Griffero, F. Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Virology* **518**, 301–312 (2018).

21. Stiasny, K. & Heinz, F. X. Flavivirus membrane fusion. *J. Gen. Virol.* **87**, 2755–2766 (2006).

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

23. Apte-Sengupta, S., Sirohi, D. & Kuhn, R. J. Coupling of Replication and Assembly in Flaviviruses. *Curr Opin Virol* **0**, 134–142 (2014).

24. Welsch, S. *et al.* Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host & Microbe* **5**, 365–375 (2009).

25. Saeedi, B. J. & Geiss, B. J. Regulation of flavivirus RNA synthesis and capping. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **4**, 723–735 (2013).

26. Liu, L. *et al.* Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. *Front Biol (Beijing)* **5**, 286–303 (2010).

27. Lindenbach, B. D., Thiel, H.-J. & Rice, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. 52 (2006).

28. Sirohi, D. & Kuhn, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis*

216, S935–S944 (2017).

29. Prasad, V. M. *et al.* Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 184–186 (2017).

30. Heinz, F. X. & Stiasny, K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **81**, (2017).

31. Rodenhuis-Zybert, I. A. *et al.* Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathog.* **6**, e1000718 (2010).

32. Silva, S. R. da, Cheng, F. & Gao, S.-J. *Zika Virus and Diseases: From Molecular Biology to Epidemiology*. (John Wiley & Sons, 2018).

33. Slonchak, A. & Khromykh, A. A. Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research. *Antiviral Research* **159**, 13–25 (2018).

34. Clarke, B. D., Roby, J. A., Slonchak, A. & Khromykh, A. A. Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Research* **206**, 53–61 (2015).

35. Desingu, P. A. Comparative analysis of sfRNA in the genome of pre-epidemic and epidemic Zika viruses for host interacting proteins potentially related to the recent epidemic. *bioRxiv* 529370 (2019). doi:10.1101/529370

36. Gubler, D. J., Vasilakis, N. & Musso, D. History and Emergence of Zika Virus. *J. Infect. Dis.* **216**, S860–S867 (2017).

37. Dick, G. W. A., Kitchen, S. F. & Haddow, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).

38. Marchette, N. J., Garcia, R. & Rudnick, A. Isolation of Zika virus from Aedes aegypti mosquitoes in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **18**, 411–415 (1969).

39. Olson, J. G., Ksiazek, T. G., Suhandiman, null & Triwibowo, null. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**, 389–393 (1981).

40. Musso, D. & Gubler, D. J. Zika Virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 487–524 (2016).

41. Duffy, M. R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine* **360**, 2536–2543 (2009).

42. Musso, D. *et al.* Zika virus in French Polynesia 2013-14: anatomy of a completed outbreak. *Lancet Infect Dis* **18**, e172–e182 (2018).

43. Cao-Lormeau, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* **387**, 1531–1539 (2016).

44. Heukelbach, J., Alencar, C. H., Kelvin, A. A., Oliveira, W. K. de & Cavalcanti, L. P. de G. Zika virus outbreak in Brazil. *1* **10**, 116–120 (2016).

45. Campos, G. S., Bandeira, A. C. & Sardi, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* **21**, 1885–1886 (2015).

46. Hills, S. L., Fischer, M. & Petersen, L. R. Epidemiology of Zika Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **216**, S868–S874 (2017).

47. Singh, R. K. *et al.* Zika virus - emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives - a comprehensive review. *Vet Q* **36**, 150–175 (2016).

48. CDC. Congenital Zika Syndrome & Other Birth Defects | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention* (2019). Available at: https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html. (Accessed: 13th September 2019)

49. Cauchemez, S. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *The Lancet* **387**, 2125–2132 (2016).

50. Lourenço, J. *et al.* Epidemiology of the Zika Virus Outbreak in the Cabo Verde Islands, West Africa. *PLoS Curr* (2018). doi:10.1371/currents.outbreaks.19433b1e4d007451c691f138e1e67e8c

51. Ciota, A. T., Bialosuknia, S. M., Ehrbar, D. J. & Kramer, L. D. Vertical Transmission of Zika Virus by Aedes aegypti and Ae. albopictus Mosquitoes. *Emerging Infect. Dis.* **23**, 880–882 (2017).

52. Pereira-Silva, J. W. *et al.* First evidence of Zika virus venereal transmission in Aedes aegypti mosquitoes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **113**, 56–61 (2018).

53. Campos, S. S. *et al.* Zika virus can be venereally transmitted between Aedes aegypti mosquitoes. *Parasit Vectors* **10**, 605 (2017).

54. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. Available at: https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005548. (Accessed: 9th May 2019)

55. Mavale, M. *et al.* Venereal Transmission of Chikungunya Virus by Aedes aegypti Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* **83**, 1242–1244 (2010).

56. Gray, S. M. & Banerjee, N. Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 128–148 (1999).

57. Gutiérrez-Bugallo, G. *et al.* Vector-borne transmission and evolution of Zika virus.

Nature Ecology & Evolution 1 (2019). doi:10.1038/s41559-019-0836-z

58. Boyer, S., Calvez, E., Chouin-Carneiro, T., Diallo, D. & Failloux, A.-B. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes Infect.* **20**, 646–660 (2018).

59. Favoretto, S. *et al.* First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir. *bioRxiv* 049395 (2016). doi:10.1101/049395

60. Terzian, A. C. B. *et al.* Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. *Sci Rep* **8**, 16034 (2018).

61. Experimental Zika Virus Inoculation in a New World Monkey Model Reproduces Key Features of the Human Infection. Available at: http://www.readcube.com/articles/10.1038/s41598-017-17067-w. (Accessed: 3rd June 2019)

62. Chouin-Carneiro, T. & Santos, F. B. dos. Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of Aedes aegypti and Aedes albopictus Vectors. *Biological Control of Pest and Vector Insects* (2017). doi:10.5772/66946

63. Du, S. *et al.* Aedes mosquitoes acquire and transmit Zika virus by breeding in contaminated aquatic environments. *Nature Communications* **10**, 1324 (2019).

64. Tesla, B. *et al.* Temperature drives Zika virus transmission: evidence from empirical and mathematical models. *Proc Biol Sci* **285**, (2018).

65. Ledermann, J. P. *et al.* Aedes hensilli as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **8**, e3188 (2014).

66. Richard, V., Paoaafaite, T. & Cao-Lormeau, V.-M. Vector Competence of French Polynesian Aedes aegypti and Aedes polynesiensis for Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, (2016).

67. Garcia-Luna, S. M. *et al.* Variation in competence for ZIKV transmission by Aedes aegypti and Aedes albopictus in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* **12**, e0006599 (2018).

68. Al, Z. L. et. Competence of Aedes aegypti, Ae. albopictus, and Culex quinquefasciatus Mosquitoes as Zika Virus Vectors, China - Volume 23, Number 7—July 2017 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. doi:10.3201/eid2307.161528

69. Brault, A. C. *et al.* Venezuelan equine encephalitis emergence: Enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11344–11349 (2004).

70. Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E. & Higgs, S. A single mutation in

chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* **3**, e201 (2007).

71. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in Aedes aegypti mosquitoes | Nature. Available at: https://www.nature.com/articles/nature22365. (Accessed: 13th May 2019)

72. Xia, H. *et al.* An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat Commun* **9**, 414 (2018).

73. Calvet, G. A. *et al.* Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil. *BMC Infect. Dis.* **18**, 49 (2018).

74. Grischott, F., Puhan, M., Hatz, C. & Schlagenhauf, P. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. *Travel Med Infect Dis* **14**, 313–330 (2016).

75. Barzon, L. *et al.* Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Euro Surveill.* **21**, 30159 (2016).

76. Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. & Musso, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* **19**, (2014).

77. Tan, J. J. L. *et al.* Persistence of Zika virus in conjunctival fluid of convalescence patients. *Sci Rep* **7**, 11194 (2017).

78. Leung, G. H. Y., Baird, R. W., Druce, J. & Anstey, N. M. ZIKA VIRUS INFECTION IN AUSTRALIA FOLLOWING A MONKEY BITE IN INDONESIA. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **46**, 460–464 (2015).

79. Campos, R. de M. *et al.* Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *J. Clin. Virol.* **77**, 69–70 (2016).

80. Kutsuna, S. *et al.* Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014 [corrected]. *Euro Surveill.* **19**, (2014).

81. Fonseca, K. *et al.* First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **91**, 1035–1038 (2014).

82. Detection of Zika Virus in Urine - Volume 21, Number 1—January 2015 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. Available at: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-0894_article. (Accessed: 20th June 2018)

83. Mansuy, J. M. *et al.* Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually

transmitted pathogen? *Lancet Infect Dis* **16**, 405 (2016).

84. Mansuy, J. M. *et al.* Zika virus in semen and spermatozoa. *The Lancet Infectious Diseases* **16**, 1106–1107 (2016).

85. Detection of Zika Virus in Semen - Volume 22, Number 5—May 2016 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. Available at: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/5/16-0107_article. (Accessed: 20th June 2018)

86. Penot, P. *et al.* Infectious Zika virus in vaginal secretions from an HIV-infected woman, France, August 2016. *Euro Surveill* **22**, (2017).

87. Al, K. O. M. et. Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood - Volume 23, Number 1—January 2017 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. doi:10.3201/eid2301.161394

88. Dupont-Rouzeyrol, M., Biron, A., O'Connor, O., Huguon, E. & Descloux, E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet* **387**, 1051 (2016).

89. Cavalcanti, M. G. *et al.* Zika virus shedding in human milk during lactation: an unlikely source of infection? *Int. J. Infect. Dis.* **57**, 70–72 (2017).

90. Sotelo, J. R. *et al.* Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy. *Emerging Infect. Dis.* **23**, 856–857 (2017).

91. Motta, I. J. F. *et al.* Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. (2016). doi:10.1056/NEJMc1607262

92. Musso, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance* **19**, 20761 (2014).

93. Petersen, L. R. & Busch, M. P. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sang.* **98**, 495–503 (2010).

94. Hoad, V. C. *et al.* First reported case of transfusion-transmitted Ross River virus infection. *The Medical Journal of Australia* **202**, 267–269 (2015).

95. Aubry, M., Richard, V., Green, J., Broult, J. & Musso, D. Inactivation of Zika virus in plasma with amotosalen and ultraviolet A illumination. *Transfusion* **56**, 33–40 (2016).

96. Foy, B. D. *et al.* Probable Non–Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* **17**, 880–882 (2011).

97. Kurscheidt, F. A. *et al.* Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. *Nature Reviews Urology* **16**, 211 (2019).

98. Counotte, M. J. *et al.* Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. *PLOS Medicine* **15**, e1002611 (2018).

99. Davidson, A. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**, (2016).

100. Deckard, D. T. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**, (2016).

101. Paz-Bailey, G. *et al.* Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. *New England Journal of Medicine* (2017). doi:10.1056/NEJMoa1613108

102. Mead, P. S., Hills, S. L. & Brooks, J. T. Zika virus as a sexually transmitted pathogen. *Current Opinion in Infectious Diseases* **31**, 39 (2018).

103. Haddow, A. D. *et al.* High Infection Rates for Adult Macaques after Intravaginal or Intrarectal Inoculation with Zika Virus. *Emerging Infect. Dis.* **23**, 1274–1281 (2017).

104. Tang, W. W. *et al.* A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. *Cell Reports* **17**, 3091–3098 (2016).

105. Calvet, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases* **16**, 653–660 (2016).

106. Miner, J. J. *et al.* Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell* **165**, 1081–1091 (2016).

107. Mann, T. Z. *et al.* Breast milk transmission of flaviviruses in the context of Zika virus: A systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol* (2018). doi:10.1111/ppe.12478

108. Blohm, G. M. *et al.* Complete Genome Sequences of Identical Zika virus Isolates in a Nursing Mother and Her Infant. *Genome Announc* **5**, (2017).

109. Blohm, G. M. *et al.* Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. *Clin. Infect. Dis.* **66**, 1120–1121 (2018).

110. Pfaender, S. *et al.* Inactivation of Zika virus in human breast milk by prolonged storage or pasteurization. *Virus Res.* **228**, 58–60 (2017).

111. Conzelmann, C. *et al.* Storage-Dependent Generation of Potent Anti-ZIKV Activity in Human Breast Milk. *Viruses* **11**, (2019).

112. Newman, C. M. *et al.* Oropharyngeal mucosal transmission of Zika virus in rhesus macaques. *Nat Commun* **8**, 169 (2017).

113. Deng, Y.-Q. *et al.* Intranasal infection and contact transmission of Zika virus in guinea pigs. *Nat Commun* **8**, 1648 (2017).

114. Jurado, K. A. & Iwasaki, A. Zika virus targets blood monocytes. *Nature Microbiology* **2**, 1460 (2017).

115. Li, X.-F. *et al.* Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. *EBioMedicine* **12**, 170–177 (2016).

116. Aliota, M. T. *et al.* Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, (2016).

117. Kuo, Y.-P. *et al.* Establishment of a mouse model for the complete mosquito-mediated transmission cycle of Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis* **12**, (2018).

118. Zare Mehrjardi, M. & Shobeirian, F. The role of the placenta in prenatally acquired Zika virus infection. *Virusdisease* **28**, 247–249 (2017).

119. Khandia, R. *et al.* Modulation of Dengue/Zika Virus Pathogenicity by Antibody-Dependent Enhancement and Strategies to Protect Against Enhancement in Zika Virus Infection. *Front Immunol* **9**, (2018).

120. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antiflavivirus immunity. - PubMed - NCBI. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28360135. (Accessed: 3rd June 2019)

121. Wen, J. & Shresta, S. ADE-ing and Abetting Zika. *Cell Host Microbe* **21**, 557–558 (2017).

122. Li, C. *et al.* Zika virus shedding in the stool and infection through the anorectal mucosa in mice. *Emerging Microbes & Infections* **7**, 169 (2018).

123. Bonaldo, M. C. *et al.* Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, (2016).

124. Miner, J. J. *et al.* Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. *Cell Rep* **16**, 3208–3218 (2016).

125. Ganor, Y. *et al.* HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy. *Nat Microbiol* **4**, 633–644 (2019).

126. Regla-Nava, J. A. *et al.* Detection of Zika virus in mouse mammary gland and breast milk. *PLoS Negl Trop Dis* **13**, e0007080 (2019).

127. Kostyuchenko, V. A. *et al.* Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* **533**, 425–428 (2016).

128. Tan, S. K., Sahoo, M. K., Milligan, S. B., Taylor, N. & Pinsky, B. A. Stability of Zika virus in urine: Specimen processing considerations and implications for the detection of RNA

targets in urine. *Journal of Virological Methods* **248**, 66–70 (2017).

129. Khurshid, Z., Zafar, M., Khan, E., Mali, M. & Latif, M. Human saliva can be a diagnostic tool for Zika virus detection. *Journal of Infection and Public Health* (2019). doi:10.1016/j.jiph.2019.05.004

130. Lamb, L. E. *et al.* Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Sci Rep* **8**, 3803 (2018).

131. Krow-Lucal, E. R., Biggerstaff, B. J. & Staples, J. E. Estimated Incubation Period for Zika Virus Disease. *Emerg Infect Dis* **23**, 841–844 (2017).

132. Carteaux, G. *et al.* Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *New England Journal of Medicine* **374**, 1595–1596 (2016).

133. Acute myelitis due to Zika virus infection. - PubMed - NCBI. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26946926. (Accessed: 3rd June 2019)

134. Oehler, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* **19**, (2014).

135. Monsalve, D. M. *et al.* Zika virus and autoimmunity. One-step forward. *Autoimmun Rev* **16**, 1237–1245 (2017).

136. Dhiman, G. Characterizing the Cytopathogenicity of Zika Virus in Human Schwann Cells. (Johns Hopkins University, 2018).

137. Volpi, V. G. *et al.* Zika Virus Replication in Dorsal Root Ganglia Explants from Interferon Receptor1 Knockout Mice Causes Myelin Degeneration. *Sci Rep* **8**, 10166 (2018).

138. Dhiman, G., Abraham, R. & Griffin, D. E. Human Schwann cells are susceptible to infection with Zika and yellow fever viruses, but not dengue virus. *Sci Rep* **9**, 1–11 (2019).

139. Lucchese, G. & Kanduc, D. Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. *Autoimmunity Reviews* **15**, 801–808 (2016).

140. Valdespino-Vázquez, M. Y. *et al.* Congenital Zika Syndrome and Extra-Central Nervous System Detection of Zika Virus in a Pre-term Newborn in Mexico. *Clin. Infect. Dis.* **68**, 903–912 (2019).

141. Paul, A. M. *et al.* Congenital Zika Virus Infection in Immunocompetent Mice Causes Postnatal Growth Impediment and Neurobehavioral Deficits. *Front Microbiol* **9**, 2028 (2018).

142. Mehrjardi, M. Z. Is Zika Virus an Emerging TORCH Agent? An Invited Commentary. *Virology (Auckl)* **8**, 1178122X17708993 (2017).

143. de Paula Freitas, B. *et al.* Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol* **134**, 529–535 (2016).

144. Hoen, B. *et al.* Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. *New England Journal of Medicine* **378**, 985–994 (2018).

145. Siqueira Mello, A. *et al.* Development of Secondary Microcephaly After Delivery: Possible Consequence of Mother-Baby Transmission of Zika Virus in Breast Milk. *Am J Case Rep* **20**, 723–725 (2019).

146. Snyder-Keller, A., Kramer, L. D., Zink, S. & Bolivar, V. J. Mouse Strain and Sex-Dependent Differences in Long-term Behavioral Abnormalities and Neuropathologies after Developmental Zika Infection. *J. Neurosci.* **39**, 5393–5403 (2019).

147. Wheeler, A. C. Development of Infants With Congenital Zika Syndrome: What Do We Know and What Can We Expect? *Pediatrics* **141**, S154–S160 (2018).

148. Gladwyn-Ng, I. *et al.* Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. *Nat. Neurosci.* **21**, 63–71 (2018).

149. Tang, H. *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* **18**, 587–590 (2016).

150. Oh, Y. *et al.* Zika virus directly infects peripheral neurons and induces cell death. *Nat. Neurosci.* **20**, 1209–1212 (2017).

151. Yuan, L. *et al.* A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* **358**, 933–936 (2017).

152. Coyne, C. B. & Lazear, H. M. Zika virus - reigniting the TORCH. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 707–715 (2016).

153. Chan, J. F.-W. *et al.* Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerging Microbes & Infections* **5**, e93 (2016).

154. Himmelsbach, K. & Hildt, E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. *World J Virol* **7**, 10–20 (2018).

155. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids | Science. Available at: https://science.sciencemag.org/content/352/6287/816. (Accessed: 3rd June 2019)

156. Mladinich, M. C., Schwedes, J. & Mackow, E. R. Zika Virus Persistently Infects and Is

Basolaterally Released from Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *mBio* **8**, e00952-17 (2017).

157. Papa, M. P. *et al.* Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Front Microbiol* **8**, 2557 (2017).

158. Alimonti, J. B. *et al.* Zika virus crosses an in vitro human blood brain barrier model. *Fluids Barriers CNS* **15**, 15 (2018).

159. Cumberworth, S. L. *et al.* Zika virus tropism and interactions in myelinating neural cell cultures: CNS cells and myelin are preferentially affected. *Acta Neuropathologica Communications* **5**, 50 (2017).

160. Siemann, D. N., Strange, D. P., Maharaj, P. N., Shi, P.-Y. & Verma, S. Zika Virus Infects Human Sertoli Cells and Modulates the Integrity of the In Vitro Blood-Testis Barrier Model. *Journal of Virology* **91**, e00623-17 (2017).

161. Stassen, L., Armitage, C. W., van der Heide, D. J., Beagley, K. W. & Frentiu, F. D. Zika Virus in the Male Reproductive Tract. *Viruses* **10**, (2018).

162. Salinas, S. *et al.* Zika Virus Efficiently Replicates in Human Retinal Epithelium and Disturbs Its Permeability. *Journal of Virology* **91**, e02144-16 (2017).

163. Simonin, Y. *et al.* Zika virus induces strong inflammatory responses and impairs homeostasis and function of the human retinal pigment epithelium. *EBioMedicine* **39**, 315–331 (2019).

164. Simoni, M. K., Jurado, K. A., Abrahams, V. M., Fikrig, E. & Guller, S. Zika virus infection of Hofbauer cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **77**, (2017).

165. Hermanns, K. *et al.* Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. *Emerg Microbes Infect* **7**, 198 (2018).

166. Zimmerman, M. G. *et al.* Cross-Reactive Dengue Virus Antibodies Augment Zika Virus Infection of Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* **24**, 731-742.e6 (2018).

167. Rathore, A. P. S., Saron, W. A. A., Lim, T., Jahan, N. & St. John, A. L. Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus–induced microcephaly in fetuses. *Sci Adv* **5**, (2019).

168. Vielle, N. J. *et al.* The Human Upper Respiratory Tract Epithelium Is Susceptible to Flaviviruses. *Front Microbiol* **10**, (2019).

169. Grant, A. *et al.* Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling.

Cell Host & Microbe **19**, 882–890 (2016).

170. Bradley, M. P. & Nagamine, C. M. Animal Models of Zika Virus. *Comp Med* **67**, 242–252 (2017).

171. Bolander, F. F. Differential characteristics of the thoracic and abdominal mammary glands from mice. *Exp. Cell Res.* **189**, 142–144 (1990).

172. Moumen, M. *et al.* The mammary myoepithelial cell. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 763–771 (2011).

173. Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D. & Bissell, M. J. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* **142**, 1028–1042 (2015).

174. Muschler, J. & Streuli, C. H. Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003202 (2010).

175. Visvader, J. E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* **23**, 2563–2577 (2009).

176. Shackleton, M. *et al.* Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* **439**, 84–88 (2006).

177. Taddei, I. *et al.* Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* **10**, 716–722 (2008).

178. Maller, O., Martinson, H. & Schedin, P. Extracellular matrix composition reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 301–318 (2010).

179. Pepper, M. S. *et al.* Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Developmental Dynamics* **218**, 507–524 (2000).

180. Andres, A.-C. & Djonov, V. The mammary gland vasculature revisited. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 319–328 (2010).

181. Djonov, V., Andres, A. C. & Ziemiecki, A. Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc. Res. Tech.* **52**, 182–189 (2001).

182. Reed, J. R. & Schwertfeger, K. L. Immune cell location and function during post-natal mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**, 329–339 (2010).

183. Sarhadi, N. S., Shaw Dunn, J., Lee, F. D. & Soutar, D. S. An anatomical study of the nerve supply of the breast, including the nipple and areola. *Br J Plast Surg* **49**, 156–164

(1996).

184. Macias, H. & Hinck, L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**, 533–557 (2012).

185. Lydon, J. P. *et al.* Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* **9**, 2266–2278 (1995).

186. Brisken, C. *et al.* A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5076–5081 (1998).

187. Mulac-Jericevic, B., Lydon, J. P., DeMayo, F. J. & Conneely, O. M. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9744–9749 (2003).

188. Anderson, S. M., Rudolph, M. C., McManaman, J. L. & Neville, M. C. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Res* **9**, 204 (2007).

189. Oliver, C. H. & Watson, C. J. Making milk. *JAKSTAT* **2**, (2013).

190. Pang, W. W. & Hartmann, P. E. Initiation of Human Lactation: Secretory Differentiation and Secretory Activation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**, 211–221 (2007).

191. Stelwagen, K. & Singh, K. The Role of Tight Junctions in Mammary Gland Function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **19**, 131–138 (2014).

192. Allen, J. C., Keller, R. P., Archer, P. & Neville, M. C. Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 69–80 (1991).

193. McManaman, J. L. Formation of milk lipids: a molecular perspective. *Clin Lipidol* **4**, 391–401 (2009).

194. Langer, P. Differences in the Composition of Colostrum and Milk in Eutherians Reflect Differences in Immunoglobulin Transfer. *J Mammal* **90**, 332–339 (2009).

195. McManaman, J. L., Reyland, M. E. & Thrower, E. C. Secretion and fluid transport mechanisms in the mammary gland: comparisons with the exocrine pancreas and the salivary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **11**, 249–268 (2006).

196. Metka, K. & Nada, P. The role of exocytosis in the apocrine secretion of milk lipid globules in mouse mammary gland during lactogenesis. *Biology of the Cell* **75**, 211–216 (1992).

197. McManaman, J. L. Milk lipid secretion: recent biomolecular aspects. *Biomol Concepts* **3**, 581–591 (2012).

198. Ollivier-Bousquet, M. Milk lipid and protein traffic in mammary epithelial cells: joint and independent pathways. *Reprod. Nutr. Dev.* **42**, 149–162 (2002).

199. Van de Perre, P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine* **21**, 3374–3376 (2003).

200. Gimpl, G. & Fahrenholz, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* **81**, 629–683 (2001).

201. Multiscale activity imaging in the mammary gland reveals how oxytocin enables lactation | bioRxiv. Available at: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/657510v1. (Accessed: 9th July 2019)

202. Lessen, R. & Kavanagh, K. Position of the academy of nutrition and dietetics: promoting and supporting breastfeeding. *J Acad Nutr Diet* **115**, 444–449 (2015).

203. Ballard, O. & Morrow, A. L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am* **60**, 49–74 (2013).

204. Khailova, L. *et al.* Changes in Hepatic Cell Junctions Structure during Experimental Necrotizing Enterocolitis: Effect of EGF Treatment. *Pediatr Res* **66**, 140 (2009).

205. Shiou, S.-R. *et al.* Erythropoietin Protects Intestinal Epithelial Barrier Function and Lowers the Incidence of Experimental Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *J Biol Chem* **286**, 12123–12132 (2011).

206. Gersting, J. A., Christensen, R. D. & Calhoun, D. A. Effects of enterally administering granulocyte colony-stimulating factor to suckling mice. *Pediatr. Res.* **55**, 802–806 (2004).

207. Rodrigues, D. M., Li, A. Y., Nair, D. G. & Blennerhassett, M. G. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* **23**, e44-56 (2011).

208. Boesmans, W., Gomes, P., Janssens, J., Tack, J. & Vanden Berghe, P. Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system. *Gut* **57**, 314–322 (2008).

209. Garofalo, R. Cytokines in human milk. *J. Pediatr.* **156**, S36-40 (2010).

210. Kollmann, T. R. & Marchant, A. Immunity and immunopathology in early human life. *Semin Immunopathol* **39**, 575–576 (2017).

211. van der Strate, B. W., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M. C. & Meijer, D. K.

Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* **52**, 225–239 (2001).

212. Newburg, D. S. & Walker, W. A. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatr. Res.* **61**, 2–8 (2007).

213. Wheeler, T. T., Hodgkinson, A. J., Prosser, C. G. & Davis, S. R. Immune components of colostrum and milk--a historical perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**, 237–247 (2007).

214. Jakaitis, B. M. & Denning, P. W. Human Breast Milk and the Gastrointestinal Innate Immune System. *Clin Perinatol* **41**, 423–435 (2014).

215. Nishimura, T., Suzue, J. & Kaji, H. Breastfeeding reduces the severity of respiratory syncytial virus infection among young infants: a multi-center prospective study. *Pediatr Int* **51**, 812–816 (2009).

216. Wang, J. *et al.* Breastfeeding and respiratory tract infections during the first 2 years of life. *ERJ Open Res* **3**, (2017).

217. Tromp, I. *et al.* Breastfeeding and the risk of respiratory tract infections after infancy: The Generation R Study. *PLoS One* **12**, (2017).

218. Lepage, P. & Van de Perre, P. The immune system of breast milk: antimicrobial and anti-inflammatory properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* **743**, 121–137 (2012).

219. Trend, S. *et al.* Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PLoS One* **10**, (2015).

220. Ichikawa, M. *et al.* Breast milk macrophages spontaneously produce granulocyte–macrophage colony-stimulating factor and differentiate into dendritic cells in the presence of exogenous interleukin-4 alone. *Immunology* **108**, 189–195 (2003).

221. Molès, J.-P. *et al.* Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatric Allergy and Immunology* **29**, 133–143 (2018).

222. Witkowska-Zimny, M. & Kaminska-El-Hassan, E. Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett* **22**, (2017).

223. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4232055/. (Accessed: 10th July 2019)

224. Jelliffe, D. B. & Jelliffe, E. F. Breast milk and infection. *Lancet* **2**, 419 (1981).

225. Hunt, K. M. *et al.* Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial

Communities in Human Milk. *PLOS ONE* **6**, e21313 (2011).

226. Rodríguez, J. M. The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation?1234. *Adv Nutr* **5**, 779–784 (2014).

227. Pannaraj, P. S. *et al.* Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr* **171**, 647–654 (2017).

228. Antona, D. *et al.* Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010. *Epidemiol. Infect.* **145**, 1471–1478 (2017).

229. Lawrence, R. M. Cytomegalovirus in human breast milk: risk to the premature infant. *Breastfeed Med* **1**, 99–107 (2006).

230. Wu, C. A. *et al.* Transmission of Murine Cytomegalovirus in Breast Milk: a Model of Natural Infection in Neonates ▿ . *J Virol* **85**, 5115–5124 (2011).

231. Prendergast, A. J. *et al.* Transmission of CMV, HTLV-1, and HIV through breastmilk. *The Lancet Child & Adolescent Health* **3**, 264–273 (2019).

232. Hamprecht, K. *et al.* Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* **357**, 513–518 (2001).

233. Bryant, P., Morley, C., Garland, S. & Curtis, N. Cytomegalovirus transmission from breast milk in premature babies: does it matter? *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* **87**, F75–F77 (2002).

234. Twite, N. *et al.* Sequestration of human cytomegalovirus by human renal and mammary epithelial cells. *Virology* **460–461**, 55–65 (2014).

235. 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.* **13**, e1006202 (2017).

236. Fowler, M. G., Kourtis, A. P., Aizire, J., Onyango-Makumbi, C. & Bulterys, M. Breastfeeding and transmission of HIV-1: epidemiology and global magnitude. *Adv. Exp. Med. Biol.* **743**, 3–25 (2012).

237. Rousseau, C. M. *et al.* Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 RNA in breast milk and of its relationship to infant infection and maternal disease. *J. Infect. Dis.* **187**, 741–747 (2003).

238. Association of levels of HIV-1 infected breast milk cellsand risk of mother-to-child transmission - Recherche Google. Available at:

https://www.google.com/search?q=Association+of+levels+of+HIV-1+infected+breast+milk+cellsand+risk+of+mother-to-child+transmission&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-e. (Accessed: 10th July 2019)

239. Bomsel, M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nature Medicine* **3**, 42–47 (1997).

240. Kourtis, A. P., de Vincenzi, I., Jamieson, D. J. & Bulterys, M. Antiretroviral drugs during breastfeeding for the prevention of postnatal transmission of HIV-1. *Adv. Exp. Med. Biol.* **743**, 173–183 (2012).

241. Percher, F. *et al.* Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. *Viruses* **8**, (2016).

242. Gessain, A. & Cassar, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* **3**, 388 (2012).

243. 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.* **87**, 152–166 (2011).

244. Martin-Latil, S. *et al.* Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood* **120**, 572–580 (2012).

245. Campos, G. S. *et al.* First Detection of Chikungunya Virus in Breast Milk. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **36**, 1015–1017 (2017).

246. Arragain, L. *et al.* Vertical Transmission of Dengue Virus in the Peripartum Period and Viral Kinetics in Newborns and Breast Milk: New Data. *J Pediatric Infect Dis Soc* **6**, 324–331 (2017).

247. Barthel, A. *et al.* Breast milk as a possible route of vertical transmission of dengue virus? *Clin. Infect. Dis.* **57**, 415–417 (2013).

248. 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.* **51**, 877–878 (2002).

249. Hinckley, A. F., O'Leary, D. R. & Hayes, E. B. Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics* **119**, e666-671 (2007).

250. Transmission of Yellow Fever Vaccine Virus Through Breast-Feeding --- Brazil, 2009. Available at: https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5905a2.htm. (Accessed: 10th July 2019)

251. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* **474**, 1823–1836 (2017).

252. Johansson, M. E. V., Sjövall, H. & Hansson, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**, 352–361 (2013).

253. Barker, N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 19–33 (2014).

254. Crawley, S. W., Mooseker, M. S. & Tyska, M. J. Shaping the intestinal brush border. *J. Cell Biol.* **207**, 441–451 (2014).

255. Kong, S., Zhang, Y. H. & Zhang, W. Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *BioMed Research International* (2018). doi:10.1155/2018/2819154

256. Ting, H.-A. & Moltke, J. von. The Immune Function of Tuft Cells at Gut Mucosal Surfaces and Beyond. *The Journal of Immunology* **202**, 1321–1329 (2019).

257. The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. - PubMed - NCBI. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22527717. (Accessed: 22nd July 2019)

258. Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. - PubMed - NCBI. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27554294. (Accessed: 30th July 2019)

259. Hoover, B. *et al.* The intestinal tuft cell nanostructure in 3D. *Scientific Reports* **7**, 1652 (2017).

260. Dillon, A. & Lo, D. D. M Cells: Intelligent Engineering of Mucosal Immune Surveillance. *Front Immunol* **10**, (2019).

261. Birchenough, G. M. H., Johansson, M. E. V., Gustafsson, J. K., Bergström, J. H. & Hansson, G. C. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol* **8**, 712–719 (2015).

262. Kulkarni, D. H. *et al.* Novel role of intestinal Goblet cells and Goblet Cell Associated Antigen Passages in induction of tolerance to dietary antigens and promoting intestinal homeostasis. *The Journal of Immunology* **200**, 118.11-118.11 (2018).

263. Bevins, C. L. & Salzman, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 356–368 (2011).

264. Holly, M. K. & Smith, J. G. Paneth Cells during Viral Infection and Pathogenesis. *Viruses* **10**, (2018).

265. Elphick, D. A. & Mahida, Y. R. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* **54**, 1802–1809 (2005).

266. Meyer-Hoffert, U. *et al.* Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* **57**, 764–771 (2008).

267. Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R. & Greenwood-Van Meerveld, B. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol. Motil.* **28**, 620–630 (2016).

268. Bohórquez, D. V. *et al.* An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy. *PLoS ONE* **9**, e89881 (2014).

269. Bohórquez, D. V. *et al.* Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *J. Clin. Invest.* **125**, 782–786 (2015).

270. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 | Nature. Available at: https://www.nature.com/articles/nature06196. (Accessed: 30th July 2019)

271. Santos, A. J. M., Lo, Y.-H., Mah, A. T. & Kuo, C. J. The Intestinal Stem Cell Niche: Homeostasis and Adaptations. *Trends in Cell Biology* **28**, 1062–1078 (2018).

272. van der Flier, L. G. & Clevers, H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology* **71**, 241–260 (2009).

273. Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R. & Mahajan, A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol* **6**, 666–677 (2013).

274. Groschwitz, K. R. & Hogan, S. P. Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 3–22 (2009).

275. Reisinger, K. W. *et al.* Breast-feeding improves gut maturation compared with formula feeding in preterm babies. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **59**, 720–724 (2014).

276. Catassi, C., Bonucci, A., Coppa, G. V., Carlucci, A. & Giorgi, P. L. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **21**, 383–386 (1995).

277. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14**, e1002533 (2016).

278. Costea, P. I. *et al.* Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol* **3**, 8–16 (2018).

279. Rodríguez, J. M. *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an

emphasis on early life. *Microb. Ecol. Health Dis.* **26**, 26050 (2015).

280. Bäumler, A. J. & Sperandio, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* **535**, 85–93 (2016).

281. Gillor, O., Etzion, A. & Riley, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 591–606 (2008).

282. Antimicrobial Peptides. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873676/. (Accessed: 30th July 2019)

283. Vaishnava, S. *et al.* The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* **334**, 255–258 (2011).

284. Mayassi, T. & Jabri, B. Human intraepithelial lymphocytes. *Mucosal Immunol* **11**, 1281–1289 (2018).

285. Knoop, K. A. *et al.* RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol* **183**, 5738–5747 (2009).

286. Rios, D. *et al.* Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. *Mucosal Immunol* **9**, 907–916 (2016).

287. Perry, M. & Whyte, A. Immunology of the tonsils. *Immunology Today* **19**, 414–421 (1998).

288. Karchev, T. & Kabakchiev, P. M-cells in the epithelium of the nasopharyngeal tonsil. *Rhinology* **22**, 201–210 (1984).

289. Fujimura, Y. Evidence of M cells as portals of entry for antigens in the nasopharyngeal lymphoid tissue of humans. *Virchows Arch.* **436**, 560–566 (2000).

290. Frankel, S. S. *et al.* Replication of HIV-1 in Dendritic Cell-Derived Syncytia at the Mucosal Surface of the Adenoid. *Science* **272**, 115–117 (1996).

291. Frankel, S. S. *et al.* Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am. J. Pathol.* **151**, 89–96 (1997).

292. van Keulen, L. J. *et al.* Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1228–1231 (1996).

293. Brown, H. R., Goller, N. L., Rudelli, R. D., Dymecki, J. & Wisniewski, H. M. Postmortem detection of measles virus in non-neural tissues in subacute sclerosing panencephalitis. *Ann. Neurol.* **26**, 263–268 (1989).

294. Ikeda, T. *et al.* Detection of lymphocytes productively infected with Epstein-Barr virus

in non-neoplastic tonsils. *J. Gen. Virol.* **81**, 1211–1216 (2000).

295. Tugizov, S. M., Herrera, R. & Palefsky, J. M. Epstein-Barr Virus Transcytosis through Polarized Oral Epithelial Cells. *J Virol* **87**, 8179–8194 (2013).

296. Ribet, D. & Cossart, P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* **17**, 173–183 (2015).

297. Basmaciyan, L., Bon, F., Paradis, T., Lapaquette, P. & Dalle, F. "Candida Albicans Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier". *Tissue Barriers* **7**, (2019).

298. Donaldson, D. S. *et al.* M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol* **5**, 216–225 (2012).

299. Heppner, F. L. *et al.* Transepithelial prion transport by M cells. *Nature Medicine* **7**, 976 (2001).

300. Chaïbi, C. *et al.* Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology* **332**, 480–490 (2005).

301. Dickman, K. G. *et al.* Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **279**, G757–G766 (2000).

302. Martin-Latil, S., Mousson, L., Autret, A., Colbère-Garapin, F. & Blondel, B. Bax Is Activated during Rotavirus-Induced Apoptosis through the Mitochondrial Pathway. *J Virol* **81**, 4457–4464 (2007).

303. Bhowmick, R. *et al.* Rotaviral Enterotoxin Nonstructural Protein 4 Targets Mitochondria for Activation of Apoptosis during Infection. *J Biol Chem* **287**, 35004–35020 (2012).

304. Bugarčić, A. & Taylor, J. A. Rotavirus Nonstructural Glycoprotein NSP4 Is Secreted from the Apical Surfaces of Polarized Epithelial Cells. *J Virol* **80**, 12343–12349 (2006).

305. Tafazoli, F., Zeng, C. Q., Estes, M. K., Magnusson, K.-E. & Svensson, L. NSP4 Enterotoxin of Rotavirus Induces Paracellular Leakage in Polarized Epithelial Cells. *Journal of Virology* **75**, 1540–1546 (2001).

306. Santiana, M. *et al.* Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission. *Cell Host & Microbe* **24**, 208-220.e8 (2018).

307. Siciński, P. *et al.* Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology* **98**, 56–58 (1990).

308. Ouzilou, L. *et al.* Poliovirus transcytosis through M-like cells. *J. Gen. Virol.* **83**, 2177–2182 (2002).

309. Robinson, C. M., Jesudhasan, P. R. & Pfeiffer, J. K. Bacterial lipopolysaccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus. *Cell Host Microbe* **15**, 36–46 (2014).

310. Fotopoulos, G. *et al.* Transepithelial transport of HIV-1 by M cells is receptor-mediated. *PNAS* **99**, 9410–9414 (2002).

311. Bomsel, M. *et al.* Intracellular Neutralization of HIV Transcytosis across Tight Epithelial Barriers by Anti-HIV Envelope Protein dIgA or IgM. *Immunity* **9**, 277–287 (1998).

312. Owen, R. L. M Cells as Portals of Entry for HIV. *PAT* **66**, 141–144 (1998).

313. Pais-Correia, A.-M. *et al.* Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* **16**, 83–89 (2010).

314. Majorovits, E. *et al.* Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS ONE* **3**, e2251 (2008).

315. Van Prooyen, N. *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20738–20743 (2010).

316. Zacharopoulos, V. R., Perotti, M. E. & Phillips, D. M. Lymphocyte-facilitated infection of epithelia by human T-cell lymphotropic virus type I. *Journal of Virology* **66**, 4601–4605 (1992).

317. 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.* **74**, 6476–6484 (2000).

318. Karst, S. M. & Wobus, C. E. A Working Model of How Noroviruses Infect the Intestine. *PLoS Pathog* **11**, (2015).

319. Karst, S. M., Wobus, C. E., Goodfellow, I. G., Green, K. Y. & Virgin, H. W. Advances in Norovirus Biology. *Cell Host Microbe* **15**, 668–680 (2014).

320. Gonzalez-Hernandez, M. B. *et al.* Murine Norovirus Transcytosis across an In Vitro Polarized Murine Intestinal Epithelial Monolayer Is Mediated by M-Like Cells. *J Virol* **87**, 12685–12693 (2013).

321. Monel, B. *et al.* Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *EMBO J.* **36**, 1653–1668 (2017).

322. Lazear, H. M. *et al.* A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* **19**,

720–730 (2016).

323. Wang, R. *et al.* Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis* **6**, 829–837 (2014).

324. Souza, I. N. de O. *et al.* Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. *Science Translational Medicine* **10**, eaar2749 (2018).

325. Ramig, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J. Virol.* **78**, 10213–10220 (2004).

326. WHO | Infant feeding in areas of Zika virus transmission. *WHO* Available at: http://www.who.int/elena/titles/zika_breastfeeding/en/. (Accessed: 7th August 2019)