



**HAL**  
open science

# Réactivité moléculaire et réponses cellulaires engendrées par des facteurs exogènes chez l'homme dans un contexte métabolique et infectieux

Marjolaine Roche

## ► To cite this version:

Marjolaine Roche. Réactivité moléculaire et réponses cellulaires engendrées par des facteurs exogènes chez l'homme dans un contexte métabolique et infectieux. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de la Réunion, 2021. tel-03792280

**HAL Id: tel-03792280**

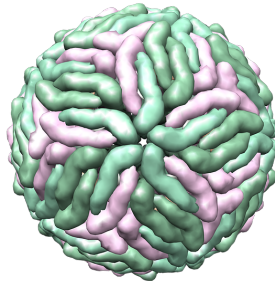
**<https://hal.science/tel-03792280>**

Submitted on 30 Sep 2022

**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.

**Réactivité moléculaire et réponses cellulaires  
engendrées par des facteurs exogènes chez l'homme  
dans un contexte métabolique et infectieux**



Présentée par

**ROCHE Marjolaine**

**Soutenance le 5 juillet 2021**

Composition du Jury :

Rapporteur PU Marie-Paule GONTHIER

Rapporteur PU Pierre-Emmanuel CECCALDI

Rapporteur DR Mathieu PICARDEAU

Examineur DR Nolwenn JOUVENET

Examineur PU-PH Estelle NOBECOURT

Examineur PU Philippe DESPRES

A mon mari Julien,

que je remercie pour m'avoir accompagné dans mon parcours professionnel dès l'obtention de mon doctorat.

C'est avec lui que j'ai pu relever tous les défis professionnels que je m'étais fixé grâce à son soutien inconditionnel, sa compréhension et sa patience.

A mes filles Joane et Manoée,

les deux soleils qui éclairent ma vie chaque jour.

## *Remerciements*

*Ma famille et notamment mes parents qui ont amplement financés mes longues études et mes déplacements.*

*Merci à mes collègues pour m'avoir motivé et aidé à commencer, à trouver le titre de cette HDR qui à la lourde tâche de regrouper les activités de recherches de mon parcours.*

*Merci aux 4 étudiants formidables que j'ai et que j'ai eu le privilège d'encadrer Etienne, Colette, Eva et Grégoire. Maman est fière de vous !!*

*Merci à mes tuteurs et responsables de master, de thèse, de post-doc, d'équipe et de laboratoire qui m'ont toujours aidé, épaulé et si bien formé.*

*Merci à tous les collègues avec qui j'ai fait un bout de chemin.*

## Abréviations

AAV	Virus adéno associé
A549	lignée cellulaire adénocarcinome pulmonaire humain
AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, oxydant, générateur de radicaux libres
ABTS <sup>+°</sup>	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate, radical cationique stable
ADN	acide désoxyribonucléique
AGE	produit avancé de glycation
ALAT	alanine aminotransférase, enzyme de type transaminase
ARN	acide ribonucléique
ASAT	aspartate aminotransférase, enzyme de type transaminase
ATER	attaché temporaire d'enseignement et de recherche universitaire
BSA	albumine de sérum de veau
BR15	clone moléculaire de souche ZIKV BeH819015 isolé au Brésil en 2015 chez un patient
COVID19	Pathologie virale causée par SARS-CoV2
DCFH <sub>2</sub> -DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, sonde fluorescente de détection des ERO
DENV	virus de la dengue
DENV-2 Run-18	virus de la dengue, souche réunionnaise isolé d'un patient en 2018
DPPH <sup>°</sup>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, radical stable
DS	dengue sévère
EA	équipe d'accueil universitaire
ERO	espèce réactive de l'oxygène
FLAG	étiquette octapeptidique DYDDDDK, ajouté aux protéines pour être facilement reconnue par un anticorps anti-FLAG
GLUT5	transporteur membranaire du fructose
G6P	glucose-6-phosphate
HDL	lipoprotéine de haute densité
HEK293T	lignée cellulaire embryonnaire de rein humain, hautement transfectable contenant le gène codant pour l'antigène SV40T
HETD	heure d'enseignement en équivalence TD
HSA	serum albumine humaine
HuH7	lignée cellulaire de carcinome hépatique humaine
IFIT	induced proteins with tetratricopeptide repeats, gène ISG
IFN	interféron, protéine de signalisation activée en cas d'infection virale
IL	interleukine, cytokine
IRF	facteur de régulation des interférons, facteur de transcription
ISG	gène stimulé par les interférons, gène exprimé en réponse à un IFN
LDL	lipoprotéine de faible densité
MAMP	motif moléculaire associé aux microbes et pathogènes
MitoSOX	Sonde fluorescente qui détecte les ERO mitochondriaux
MOI	multiplicité d'infection, ratio de particule virale infectieuse par cellules lors de l'infection exprimé en PFU/ml
MR766	clone moléculaire de souche de ZIKV isolé en Ouganda en 1947
MW	poids moléculaire
NAFLD	pathologie du foie gras non alcoolique

NASH	stéatose hépatique non alcoolique
NLR	récepteur à Toll and NOD
NOD	protéine à domaine d'oligomérisation nucléotidique
NODR	récepteur de la protéine NOD
NK	lymphocyte tueur
NS1	protéine non structurale 1
OI	océan Indien
OMS	organisation mondiale de la santé
PAMP	motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PF13	PF-25013-18, souche de ZIKV isolé de patient en Polynésie française en 2018
PFK	phosphofructokinase
PFU	comptabilisation de formation de plaque d'un tapis cellulaire infecté par une suspension virale
PLATIN-OI	plateforme d'infectiologie de niveau 3 de l'océan Indien
PRR	récepteurs cellulaires capables de reconnaître des motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes
rNS1	protéine virale NS1 recombinante
rNS1 <sup>FLAG-tag</sup>	protéine virale NS1 recombinante avec une étiquette FLAG
RT-qPCR	réaction de polymérisation en chaîne quantitative, en temps réel
SARS-CoV2	coronavirus type 2 causant le syndrome respiratoire aigu sévère
SDS	sodium dodécyl sulfate
SGLT1	transporteur membranaire du glucose
SINV	virus Sindbis, souche AR-339 isolé au Caire en Egypte en 1952
SOD	superoxyde dismutase, enzyme antioxydante
SOOI/SWIO	sud-ouest océan Indien
ST	sequence type
SW872	une lignée pré-adipocytaire issue de liposarcome humain SW872
TLR	recepteur toll-like, role dans le système immunitaire inné, PRR
TNF	facteur de nécrose tumorale, cytokine
UR	Univeristé de la Réunion
VERO	lignée cellulaire de rein de singe vert d'Afrique
VERO/ZIKV.NS1	lignée stable productrice de protéine recombinante NS1 de ZIKV
YF-17D	vaccin atténué du virus de la fièvre jaune
ZIKV	virus zika

## TABLE DES MATIERES

<b>A. Préambule .....</b>	<b>8</b>
<b>B. Curriculum vitae .....</b>	<b>11</b>
<b>I. Etat Civil .....</b>	<b>11</b>
<b>II. Cours universitaire .....</b>	<b>12</b>
<b>III. Cours professionnel .....</b>	<b>12</b>
<b>IV. Activité d'enseignement.....</b>	<b>12</b>
<b>V. Activité de recherche.....</b>	<b>13</b>
1. Maitre de Conférences de l'Université de la Réunion .....	13
2. Post-doctorat .....	13
3. Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche .....	14
4. Doctorat de Biochimie et de Chimie Bio-organique.....	14
5. Implication dans l'animation de la recherche .....	14
6. Contrats de recherche.....	15
<b>VI. Participation Universitaire.....</b>	<b>15</b>
1. Investissement au sein de l'UR.....	15
2. Membre de jury de soutenances .....	15
3. Membre de comité de thèse .....	16
4. Encadrements d'étudiants .....	16
<b>VII. Publications.....</b>	<b>17</b>
<b>VIII. Communications.....</b>	<b>19</b>
1. Communications orales.....	19
2. Posters .....	19
<b>C. Travaux de recherche antérieurs.....</b>	<b>21</b>
<b>I. L'albumine sérique haut lieu de modulation oxydative .....</b>	<b>21</b>
1. Objet et finalités du travail de recherche .....	22
2. Intérêt scientifique .....	22
3. Programme de travail et méthodes employées .....	23
a. <b>Extraction de composés phénoliques à partir de margines d'olive.....</b>	<b>23</b>
b. <b>Tests antioxydants simples .....</b>	<b>23</b>
c. <b>Inhibition de la peroxydation lipidique .....</b>	<b>23</b>
d. <b>Inhibition de l'oxydation protéique .....</b>	<b>24</b>
e. <b>Localisation et évolution des phénols dans les systèmes étudiés.....</b>	<b>24</b>
4. Principaux résultats.....	25
a. <b>Extraction de composés phénoliques à partir de margines d'olive.....</b>	<b>25</b>
b. <b>Tests antioxydants.....</b>	<b>25</b>
c. <b>Inhibition de la peroxydation lipidique et de l'oxydation protéique.....</b>	<b>26</b>
d. <b>Localisation et évolution des phénols dans les systèmes étudiés.....</b>	<b>26</b>
5. Conclusion.....	27
<b>II. Les antioxydants dans un contexte cellulaire de diabète et d'obésité.....</b>	<b>27</b>
1. Objet et finalités du travail de recherche .....	27
2. Intérêt scientifique .....	27
3. Programme de travail et méthodes employées .....	28
4. Principaux résultats.....	28
a. <b>Mesure de la viabilité cellulaire.....</b>	<b>28</b>
b. <b>Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaire .....</b>	<b>28</b>
c. <b>Expression de la superoxyde dismutase.....</b>	<b>29</b>
5. Conclusion.....	29
<b>III. Protection de l'altération de l'absorption intestinale par des vitamines.....</b>	<b>30</b>
1. Objet et finalités du travail de recherche .....	30
2. Intérêt scientifique .....	30

a.	<b>Biodisponibilité des nutriments et rôle protecteur des vitamines .....</b>	<b>31</b>
b.	<b>État du statut oxydant de l'intestin .....</b>	<b>31</b>
3.	Programme de travail et méthodes employées .....	32
a.	<b>Mesure de biodisponibilité du petit intestin murin.....</b>	<b>32</b>
b.	<b>Analyse de l'expression des gènes des principaux transporteurs intestinaux.....</b>	<b>33</b>
c.	<b>Étude des défenses antioxydantes de l'entérocyte.....</b>	<b>33</b>
4.	Principaux résultats.....	33
a.	<b>Biodisponibilité des nutriments après irradiation .....</b>	<b>33</b>
b.	<b>Modulation des enzymes antioxydantes.....</b>	<b>34</b>
5.	Conclusion.....	35
IV.	<b>Pathophysiologie cellulaire lors du processus infectieux.....</b>	<b>35</b>
1.	Objet et finalités du travail de recherche .....	36
2.	Intérêt scientifique .....	36
3.	Programme de travail et méthodes employées .....	36
a.	<b>Les sujets d'étude.....</b>	<b>37</b>
b.	<b>Les modèles d'étude.....</b>	<b>37</b>
c.	<b>Les moyens de détection de la pathogénicité.....</b>	<b>37</b>
4.	Principaux résultats.....	37
a.	<b>Implication de métaux exogènes lors d'une infection par un alphavirus.....</b>	<b>37</b>
b.	<b>Pathogénicité du virus émergent Zika .....</b>	<b>39</b>
5.	Conclusion.....	43
D.	<b>Travaux de recherche récents.....</b>	<b>43</b>
I.	<b>La protéine virale NS1 des flavivirus .....</b>	<b>43</b>
II.	<b>Pathogénicité des leptospires.....</b>	<b>47</b>
III.	<b>Conclusion .....</b>	<b>50</b>
E.	<b>Projet de Recherche DENGUE-SWIO, physiopathologie de la protéine NS1.....</b>	<b>52</b>
I.	<b>Intégration du projet de recherche DENGUE-SWIO dans l'UMR PIMIT .....</b>	<b>52</b>
II.	<b>Le virus de la Dengue et sa pathogénicité chez l'homme .....</b>	<b>53</b>
1.	Epidémiologie de la dengue .....	53
2.	La symptomatique de la Dengue .....	53
3.	Prophylaxie et traitement de la dengue.....	54
4.	Tropisme cellulaire de DENV chez l'homme.....	54
III.	<b>Projet DENV-SWIO, étude du DENV lors de troubles métaboliques.....</b>	<b>55</b>
1.	Infection de la dengue et les conséquences sur le foie .....	55
2.	Impact du virus de la dengue sur les systèmes vasculaire et immunitaire .....	56
3.	Pathogénicité de la protéine NS1 .....	56
4.	Production hépatique de la protéine NS1 hexamérique.....	57
5.	L'infection par DENV dans un contexte d'immuno-sénescence lié aux troubles métaboliques .....	59
IV.	<b>La NS1 DENV-2 dans le sérum du patient réunionnais.....</b>	<b>60</b>
V.	<b>Comparaison d'infection par DENV et ZIKV .....</b>	<b>60</b>
F.	<b>Projet de recherche LEPTO-SWIO, étude des leptospiroses de l'océan Indien et de leur potentiel pathogène .....</b>	<b>61</b>
G.	<b>Conclusion .....</b>	<b>62</b>
H.	<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>63</b>
I.	<b>Annexes : Articles choisis .....</b>	<b>73</b>



## A. Préambule

### \* Situation Actuelle

Maître de Conférences à l'Université de la Réunion depuis 2011, je suis actuellement chercheuse à l'UMR PIMIT 'Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical', dirigé par Patrick Mavingui, directeur de recherche au CNRS. L'UMR PIMIT, créée en 2015, s'attache à étudier les maladies infectieuses émergentes ou possiblement émergentes dans la zone Océan Indien dont les flavivirus Zika et Dengue. Le responsable d'équipe I2T 'Infection et Immunopathologies en milieu Tropical' devenue MOCA 'Mécanismes moléculaires et cellulaire des pathologies' depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2020, le professeur universitaire Philippe Desprès, coordonne les travaux de recherche portant sur l'étude de la pathogénicité des arbovirus de type flavivirus. J'anime actuellement un axe de recherche sur l'implication de la protéine virale NS1 des flavivirus dans la physiopathologie infectieuse. J'enseigne pour l'UFR Santé dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire. Je présente dans ce manuscrit mon cursus universitaire et professionnel suivi d'un développement de mes activités de recherche. J'expose ensuite dans ce document le projet de recherche que je développe et souhaite développer à l'UMR PIMIT, l'obtention de l'habilitation à diriger les recherches me permettra de mener à bien des travaux expérimentaux d'envergures avec des étudiants en thèse qui seront formés sous ma direction.

### \* Formation

Lors de ma formation post-baccalauréat, j'ai suivi un enseignement universitaire en biochimie et en biologie cellulaire à la Faculté des Sciences de Luminy de l'Université de Marseille. Mon cursus universitaire s'est achevé par l'obtention le 14 mars 2005 d'un doctorat es science en biochimie et chimie bio-organique de L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse réalisé à l'INRA à l'UMR "Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale" dans l'équipe chimie des antioxydants dirigée par le professeur universitaire Olivier Dangles sous l'encadrement de la chargée de recherche Claire Dufour.

Mes travaux de thèse sur 'L'étude cinétique et mécanismes de l'activité antioxydante des phénols de l'olive dans différents systèmes modèles : Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique lié à la sérum albumine', ont mené à quatre publications dont deux en première auteure de facteur d'impact de 2,4, 2,5, 3 et 3,8 dans le domaine de la biotechnologie et de la biochimie.

Lors de mon doctorat, j'ai suivi deux stages de spécialisation, le premier de 2 mois sur la détection de l'oxydation des protéines par fluorescence en Suisse dans le laboratoire de pharmaco-chimie de l'Université de pharmacie de Genève et le deuxième de 4 mois sur l'extraction de biomolécules dans l'Unité de Biotechnologie des Champignons Filamenteux de l'INRA de Marseille.

Ma formation doctorale m'a permis d'acquérir une expertise sur l'interaction de macromolécules que sont l'albumine et les lipides longues chaînes avec des métabolites secondaires de type composés phénoliques d'origine végétale. J'ai pu valoriser ces travaux lors de quatre congrès nationaux et internationaux sous la forme de trois posters et d'une communication orale.

### \* Activités d'enseignement

Après l'obtention de mon doctorat, j'ai acquis une expérience en enseignement tout en poursuivant mes activités de recherche lorsque j'ai rejoint l'Université de la Réunion

pour deux ans en tant qu'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche à l'UFR de Sciences et Technologies de 2005 à 2007 à raison de 96 HETD puis de 192 HETD par an.

Après un stage post-doctoral à l'étranger, j'ai intégrée en 2011 la jeune UFR Santé lors de mon recrutement MCU, je me suis fortement investie dans le montage de cours du nouveau master 2 de biochimie, biologie moléculaire et cellulaire, biotechnologies en animant l'UE toxicologie environnementale et mutagenèse et au sein de la PACES au travers d'un enseignement en génétique organisé de manière originale en Podcast, en cours magistraux (CM) suivis de TD sur les deux sites universitaires de Saint Denis et du Tampon. J'ai ensuite participé dès 2012 au rapprochement universitaire de l'école des sages-femmes et de l'institut de formation en soins infirmiers du CHU en proposant des cours en embryologie et en biologie moléculaire sous la forme de CM et de TD ceci à Saint Denis, à Saint Pierre et à Mayotte. Lors de la réorganisation de la PACES en 2015 sous la forme de tronc communs et d'UE spécifiques par filières j'ai créé deux enseignements en embryologie humaine et en génétique du cancer. Concernant la deuxième mouture du master renommé biologie Santé, j'ai pris la responsabilité de l'UE Bases Moléculaires et Cellulaires des Pathologies, et de l'UE Stage d'initiation à la recherche. Depuis 2019, après un voyage ERASMUS-plus au Liban et une formation spécifique 'enseigner en anglais' EMIRALD (English as a Medium of Instruction for Researcher, Academic and Learner Development), je délivre des cours et des TD en anglais aux étudiants de masters 1 et 2.

#### \* Activités de recherche

Lors de mon poste d'ATER de deux ans en 2005, j'ai intégré le laboratoire de recherche universitaire LBG (Laboratoire de Biochimie et de Génétique Moléculaire) de l'UR. J'ai pu adapter mes connaissances, acquises durant la thèse, sur les antioxydants dans la problématique du laboratoire d'accueil qui portait sur le diabète et l'obésité en utilisant un modèle cellulaire adapté de lignées de préadipocytes. Ces travaux de recherche furent valorisés par deux publications de facteur d'impact de 3,5 et 1,7, d'une revue et d'une communication orale dans un congrès international. L'acquisition de solides connaissances en biologie cellulaire, lors de cette première expérience professionnelle de 2005 à 2007, m'a permis ensuite d'intégrer l'Université Médicale du New-Jersey où pendant deux ans comme post-doctorante j'ai mené un axe de recherche en physiologie digestive en utilisant le modèle rongeur. Les recherches menées lors de ce post-doctorat m'ont permis d'exploiter mes connaissances sur les antioxydants comme thérapie préventive pour la conservation de l'absorption intestinale après une gamma-irradiation sur le modèle murin. Ce post-doctorat m'a permis d'obtenir des résultats que j'ai regroupés dans trois publications de facteur d'impact de 6,1, 3,1 et 2,9 et présentés lors de deux congrès internationaux.

Riche de ces expériences en recherche, et notamment en enseignement exposé dans le chapitre précédent, j'ai obtenu le poste de MCU à l'UR en 2011. L'EA GRI, Groupe de Recherche en Immunopathologie m'a accueilli dès mon recrutement me permettant d'appréhender la virologie par l'utilisation de l'arbovirus Sindbis pour mes travaux de recherche. J'ai débuté l'encadrement de stagiaires sur de courtes périodes (quatre masters) pour ensuite dès janvier 2013 co-encadrer le doctorat d'Etienne Frumence sur cette thématique. Ce doctorat s'est articulé sur deux périodes du fait de la création de l'UMR PIMIT en 2015 qui a fait suite au GRI durant cette thèse. Tout d'abord Etienne Frumence a évalué l'influence d'un élément environnemental toxique le cadmium sur l'infection virale par le virus Sindbis. Grâce à ces travaux, il a signé en premier auteur une publication de facteur d'impact 0,7 où je suis en dernier auteur et qu'il a présenté à un congrès international. Puis notre équipe I2T formée au sein de l'UMR PIMIT ayant décidé

de focaliser ses recherches sur le virus Zika, le doctorant et moi-même avons axé nos recherches sur la connaissance de ce virus émergent. En utilisant un modèle de lignée cellulaire épithéliale, Etienne Frumence avec l'implication de l'équipe I2T a pu mettre en avant des caractéristiques physiopathologiques de la souche épidémique 2015 du virus Zika. Ces travaux ont donné lieu à une publication de facteur d'impact 3,4 où le doctorant et moi-même sommes successivement premier et deuxième auteur. La thèse de Monsieur Frumence portant le titre de 'Réponse cellulaire à l'infection par les arbovirus Sindbis et Zika : Effets d'un facteur environnemental : le cadmium' a été soutenue en juillet 2016 avec succès.

J'ai poursuivi sur la thématique d'étude de l'équipe I2T, la physiopathologie du virus Zika, en me focalisant sur la protéine virale NS1. Retrouvée sécrétée dans le milieu sous forme hexamérique, la protéine NS1 transite dans le sang des individus infectés lors de la phase aiguë de l'infection et semble avoir une influence sur la transmission virale. La protéine NS1 circulante est un outil majeur de détection d'infection utilisé comme biomarqueur par les hôpitaux, attestant de la présence de réplication de flavivirus dans l'organisme. En collaborant avec tous les membres de l'équipe I2T et avec l'aide de deux stagiaires en master j'ai pu valoriser mes recherches par une publication en dernier auteur de facteur d'impact 3,5. De plus j'ai participé à quatre publications conduites par mes collègues. J'ai collaboré, avec l'autre équipe de l'UMR nommée DySIIS, sur la thématique pathogénicité de la leptospirose qui s'est traduit par un co-encadrement de thèse où j'ai dirigé la mise en œuvre des deux modèles expérimentaux animaux hamster et rats. Colette Cordonin a soutenu avec succès son doctorat 'Virulence et spécificité d'hôte de leptospires pathogènes endémiques de Madagascar et ses îles voisines' en avril 2019. Deux articles ont été publiés par la doctorante qui est en première auteure et moi-même en dernière auteure. Depuis janvier 2019 je m'investis dans l'étude de la pathogénicité de la protéine NS1 appartenant au virus de la dengue, un autre flavivirus épidémique. Ces travaux de recherche ont commencé avec une doctorante Eva Ogire et trois étudiants en master et se sont traduits par une publication où je suis en dernier auteure. Sur la thématique dengue je suis co-auteure dans deux publications de l'UMR PIMIT.

J'ai donc encadré 2 étudiants en thèse (Etienne Frumence, Colette Cordonin) qui ont soutenu avec succès et j'encadre actuellement une troisième doctorante (Eva Ogire) qui participe au projet de recherche que je viens d'amorcer en 2020 et que je présente dans un premier temps brièvement ci-dessous. Je suis co-encadrante également d'une quatrième thèse (Grégoire Lebeau) commencée en mars 2021. J'ai participé en tant qu'examinatrice à la soutenance de six thèses de l'Université de la Réunion et d'une thèse à l'Université Paul Bernard de Lyon. Je suis membre de comité d'une thèse CIFRE et d'une thèse Région actuellement en cours et je le fus aussi pour deux doctorantes ayant déjà soutenu.

#### \* **Projet de recherche**

Dans le cadre de mes activités de laboratoire au sein de l'UMR PIMIT je propose, forte de mes connaissances et des outils déployés pour l'étude de la protéine virale NS1 de flavivirus Zika et de la Dengue, un projet de recherche original DENV-SWIO. **Ce projet porte sur l'effet de l'infection du virus de la Dengue et la protéine virale NS1 associée sur le métabolisme cellulaire et tissulaire de l'organisme touché et inversement sur l'impact d'un dysfonctionnement métabolique sur l'infection virale.** Ce projet s'inscrit dans la thématique que développe l'équipe MOCA depuis le

renouvellement de l'UMR PIMIT en janvier 2020. Par la soumission de projets communs et par le biais de collaborations, je travaille avec des laboratoires en lien avec le métabolisme que sont l'UMR DÉTROI de l'UR et le CIRI de Lyon.

Par ce projet de recherche je souhaite savoir si la concomitance de deux types de pathologies infectieuse et métabolique peut avoir une influence l'une sur l'autre et qu'elles en sont les effets. La protéine virale NS1 présente la particularité d'être sécrétée par les cellules infectées pour se retrouver durant la phase aiguë de l'infection dans le tissu sanguin de l'individu. Elle s'y trouve sous la forme d'une lipoprotéine hexamérique ce qui laisse penser qu'elle peut avoir une influence sur le métabolisme lipidique notamment au niveau sanguin et hépatique ; lieu de circulation et de genèse des lipoprotéines HDL et LDL en particulier. Le métabolisme lipidique est lié à celui des sucres et l'étude que je propose revient à analyser les modifications de ces métabolismes cellulaires par la NS1. De manière plus globale et du fait de l'épidémie de Dengue qui sévit depuis janvier 2018 sur l'île de La Réunion, je focalise mes travaux sur la NS1 des flavivirus avec l'hypothèse principale que la protéine NS1 intervient sur les cellules endothéliales et hépatiques en modulant leur physiologie en terme notamment de métabolisme lipidique et glucidique.

Actuellement ce projet est fortement amorcé par deux étudiants en thèse. Mademoiselle Eva Ogire, en thèse depuis janvier 2019 est impliquée dans ce projet son sujet d'étude étant 'Souche épidémique Réunion 2018 du virus de la dengue-2 : conséquences de l'infection virale sur les cellules hépatiques humaines'. Monsieur Grégoire Lebeau, en thèse depuis mars 2021 va focaliser ses recherches sur 'Les Interactions Hôte/Virus de la Dengue : Focus sur le métabolisme et la réponse antivirale. Dans ce projet nous sommes également en collaboration avec le laboratoire IRISSE basée sur la respiration mitochondriale.

Je souhaite également continuer à m'investir dans les travaux de recherche de l'UMR sur la leptospirose et je propose un projet LEPTO-SWIO. Mes compétences en biochimie et en biologie cellulaire et animale me permettront d'aider au développement d'outils de détection et de biomarqueurs de choix pour les leptospiroses de la zone océan indien. Je fais partie depuis 2020 du comité d'éthique de la Réunion chargé d'évaluer les projets de recherche utilisant des animaux.

## **B. Curriculum vitae**

### **I. Etat Civil**

Je suis Marjolaine ROCHE née le 19 octobre 1976 à Pertuis (84) en France de nationalité française, actuellement domiciliée à Saint Paul, (974) en France.

Ma situation professionnelle depuis 2011 est d'occuper le poste de Maître de Conférence Universitaire à l'Université de la Réunion et je suis joignable par courriel : marjolaine.roche@univ-reunion.fr.

## II. Cursus universitaire

2005 Doctorat de Biochimie et de Chimie Bio-organique – Université Avignon  
2001 DEA de Microbiologie Moléculaire et Biotechnologie – Université Marseille-Luminy  
2000 Maîtrise de Biochimie Moléculaire et Cellulaire – Université Marseille-Luminy  
1999 Licence de Biochimie – Université Marseille-Luminy  
1998 DEUG Science de la Vie – Université Marseille-Luminy  
1997-1996 Premier Cycle des Etudes Médicales (PCEM1) – Université Montpellier  
1995 Baccalauréat S-scientifique – Académie Aix-Marseille

## III. Cursus professionnel

2011-2020 Maître de Conférences Universitaire  
à l'EA GRI puis à l'UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical)  
à l'UFR Santé de l'Université de la Réunion

2007-2009 Post-doctorat  
aux départements de pharmacologie / physiologie et de radiologie  
à l'Université de médecine du New Jersey - USA

2005-2007 Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche  
au laboratoire de biochimie et de génétique moléculaire (EA LBGGM) et au département  
de biochimie de l'Université de la Réunion

## IV. Activité d'enseignement

En tant que MCU au sein de l'UFR Santé depuis 2011 jusqu'à ce jour :

1. Génétique en PACES et en Institut de Formation des Soins Infirmiers
2. Embryologie en PACES et en Ecole des Sages-Femmes
3. Toxicologie environnementale et mutagenèse en Master 2 Biologie Santé
4. Approches thérapeutiques en Master 2 Biologie Santé
5. Toxicologie en L3 Biologie Santé
6. Biologie du cancer en PACES et en Master 2 Biologie Santé
7. Animation de l'organisation du stage d'initiation à la recherche des Master 1  
Biologie Santé

Type d'enseignements : Podcasts, cours magistraux, travaux pratiques et travaux dirigés.  
Responsabilité : responsable d'UEs en licence, en master 1 et 2.

En tant qu'ATER au département de Biochimie de l'UFR Science Technologies de 2005 à 2007

à raison de 96 HETD puis de 192 HETD:

- a. Enzymologie en licence Biochimie
- b. Biochimie en licence Biochimie
- c. Bioénergétique en licence Biochimie
- d. Immunologie en licence Biochimie

En tant que CEV à l'ESIROI et au département de biochimie en 2010 :

En tant que Docteur *es science*

1. Génétique à l'ESIROI
2. Physiologie en Master Biologie

## V. Activité de recherche

### 1. Maître de Conférences de l'Université de la Réunion

#### Depuis 2011

##### Laboratoire :

PIMIT Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (anciennement GRI)

##### Domaine de recherche :

- ✓ Infection de cellules humaines avec les virus Zika et Dengue issus de souches ancestrale et endémique
- ✓ Etude de la protéine virale NS1 dans la physiopathologie infectieuse
- ✓ Pathogénicité de la leptospirose sur modèle rongeur

Publications: 11 articles

Responsabilités : Encadrements d'étudiants en thèse, master 1 et 2, licence, participe à la gestion du laboratoire. Ecriture de projets de recherche 3 acceptés (FEDER, Projet incitatifs, Fédération BST)

Protocoles courants : Virologie, Biologie moléculaire, Biologie cellulaire et animale (rongeurs), Biochimie.

### 2. Post-doctorat

#### 2007-2009

Laboratoire : Départements de Pharmacologie/Physiologie et de Radiologie, Université Médicale et Cancer center du New Jersey – USA

Domaine de recherche: Biodisponibilité intestinale des nutriments et micronutriments chez le modèle murin.

Publications: 3 articles

##### Responsabilités:

Gestion d'un projet de recherche NIH regroupant deux départements de recherche.  
Titre du projet: Effets de vitamines sur le transport intestinal de nutriments (sucres, acides aminés) chez la souris *mus musculus* soumis à des radiations ionisantes génératrices de stress oxydant.

Type: physiologie, biochimie, biologie moléculaire, cellulaire et animale.

Encadrements : deux masters 2 recherche.

Projet 1: Stress oxydant chez la souris gamma-irradiée.

Projet 2: Effet de l'irradiation et de l'apport en micronutriments sur les cellules cancéreuses coliques humaines caco-2 à différents stades de différenciation.

Rédaction de projets de recherche

Fondation Philippe acceptée (12 000\$)

Co-investigateur principal pour une bourse NIH de 5 ans (400000\$)

Protocoles courants: Physiologie du petit animal: Prélèvement d'intestin de souris, mesure d'absorption intestinale de nutriments. Biologie cellulaire: culture de cellules. Biologie moléculaire: extraction d'ADN/ARN, PCR, blots. Biochimie: purification,

caractérisation de protéines, tests enzymatiques (chromatographies, électrophorèses, fluorimétrie).

### 3. Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

#### 2005-2007

Laboratoire: de Biochimie et de Génétique Moléculaire, axes de recherche : inflammation, obésité, diabète - Université de la Réunion

Domaine de recherche: Stress oxydant cellulaire et rôle protecteur des antioxydants

Publications: 2 articles, 1 revue

Responsabilités:

Création et gestion d'un projet en relation avec la thématique générale du laboratoire.  
Titre du projet: Effets d'antioxydants végétaux sur des adipocytes humain soumis à un stress glyco-oxydant.

Encadrement apporté pour les travaux de thèse portant sur l'Apolipoprotéine E limitatrice de dommages cellulaires engendrés par un stress oxydant chez les adipocytes humains.

Protocoles courants: Biologie cellulaire, culture de cellules de liposarcome, induction et suivi de leur différenciation. Biologie moléculaire : PCR temps réel, blots. Biochimie: tests antioxydants (spectro-fluorimétrie).

### 4. Doctorat de Biochimie et de Chimie Bio-organique

#### 2001-2005

Laboratoire: INRA d'Avignon - Unité "Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale", Thèse obtenue à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Domaine de recherche: Chimie des polyphénols, modélisation de la liaison protéine-micronutriments (phénols et acides gras insaturés)

Publications: 3 articles

Réalisations: Projet de thèse: Etude cinétique et mécanismes de l'activité antioxydante des phénols de l'olive dans différents systèmes modèles. Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique lié à la sérum albumine.

Stages de spécialisation

2004 Détection de l'oxydation des protéines par fluorescence (2 mois)

2003 Spécialisation en extraction de biomolécules (4 mois)

Protocoles courants: Biochimie - Chimie bio-organique: détermination du pouvoir antioxydant (spectroscopies UV-visible, HPLC). Oxydation de l'acide linoléique et de la sérum albumine humaine en présence de phénols (HPLC-MS). Extraction d'antioxydants (chromatographies).

### 5. Implication dans l'animation de la recherche

J'ai participé dans les différents laboratoires au journal club.

J'organise la réunion de l'équipe MOCA depuis 2017 jusqu'à ce jour.

Je participe à la fête de la science de l'Université de la Réunion depuis 2017.

J'ai été membre du comité de pilotage du congrès international BioHealF de Sept-Dec 2017.

Je suis membre du conseil de laboratoire depuis 2020.

## 6. Contrats de recherche

1. Bourses NIH en 2005 en postdoctorat
2. Projet BQR 2016 financé par l'UR (coordinatrice)
3. Projet MétaZik 2017 financé par la Fédération de Recherche BioST de l'UR (coordinatrice)
4. Projet ZikAlert 2018 financé par le FEDER Réunion
5. Projet DENDIA 2020 financé par la Fédération de Recherche BioST de l'UR (coordinatrice)
6. Projet RunDengue 2021
7. Projet CASI 2021 financé par la Fédération de Recherche BioST de l'UR (experimentatrice)

## VI. Participation Universitaire

### 1. Investissement au sein de l'UR

Dès mon recrutement MCU je me suis investie dans chacune des 2 mandatures en étant successivement :

- **Membre élu** au Conseil de la formation et de la vie étudiante, au Conseil académique et au Conseil académique restreint de l'UR de 2012 à 2016.
- **Chargée de Mission** Ecosystème Recherche Développement Innovation pour l'UR depuis mai 2017 jusqu'à janvier 2021. J'ai eu pour rôle de renforcer les relations de l'UR avec les structures de l'écosystème régional, national et international. J'ai représenté l'UR dans les CA, les bureaux et les AG et de plusieurs structures RDI. J'ai fait le lien entre le président, le président du Cac et le vice-président recherche et valorisation de l'UR et les plateformes de recherche universitaire afin de potentialiser et de faciliter leur fonctionnement. J'ai organisé un comité de pilotage pour la plateforme SEAS-OI. Je participe au fonctionnement du pôle recherche renommé la DRIVE (La direction du soutien à la recherche, innovation, valorisation et partenariat) et j'ai mené les entretiens professionnels de 4 agents. Avec l'aide des agents de la DRIVE, j'ai initié et mis en place 5 conventions cadre avec les structures RDI suivantes le Conseil Régional, l'entreprise CLS, la Technopole et le pôle de compétitivité outremer Qualitropic et la SATT AxLR de Toulouse. J'ai proposé avec succès à la communauté universitaire, avec le SPV (Service des partenariats et de la valorisation) de la DRIVE, un projet de site internet d'envergure pour la visibilité de la recherche universitaire nommé Plud in Labs, il est en cours d'installation.

### 2. Membre de jury de soutenances

- Je participe aux jurys de Soutenances orales d'étudiants de Licence, Master 1 et 2 de 2011 jusqu'à ce jour.
- J'ai été membre de jury de 7 soutenances de thèse en tant qu'examinatrice pour l'évaluation des travaux de :



- \* Marianne FIGL en 2020 sur 'La réplication du virus de la dengue dans les cellules hépatocytaires dépend de l'isoforme d'hexokinase exprimée.' à l'Université Claude Bernard Lyon 1.
- \* Anthony DOBI en 2018 sur le 'Stress oxydant et glycoxydation : impact des produits avancés de glycation sur les mitochondries des cellules endothéliales dans le cadre de la pathologie diabétique' à l'Université de la Réunion.
- \* Angélique ARCAMBAL en 2018 sur le 'Effet délétère de l'hyperglycémie sur la fonctionnalité des cellules endothéliales cérébrales et rôle protecteur des polyphénols antioxydants' à l'Université de la Réunion.
- \* Latufa YOUSOUF en 2016 sur le 'Fonctionnalisation de biopolymères extraits de macroalgues pour encapsuler des principes actifs hydrophobes.' à l'Université de la Réunion.
- \* Florence BOYER en 2016 sur le 'Stress oxydant et pathologie diabétique. Impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses' à l'Université de la Réunion.
- \* Avinash PARIMISHETTY en 2015 sur 'anti-inflammatory properties of factors produced by the fat tissue. Potential applications in neurodegeneration.' à l'Université de la Réunion.
- \* Jennifer BARAKA-VIDOT en 2014 sur le 'Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion - Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée.' à l'Université de la Réunion.

### 3. Membre de comité de thèse

- \* Kevin CHEMOLLO depuis 2020 de l'URM DÉTROIT
- \* Marianne FIGL en 2019 du CIRI à Lyon
- \* Eloïse CHECKOURI depuis 2018 de l'UMR DÉTROIT
- \* Miora RALANBONDRINI de 2014 à 2016 de l'UMR PIMIT

### 4. Encadrements d'étudiants

J'ai accueilli et encadré sur mes thématiques de recherche :

#### 10 étudiants en master :

- \* Alexandre Saint Lys – Master 1 et 2 Biologie Santé Réunion – 2020 et 2021
- \* Florent Bressac– Master 2 en Virologie fondamentale Lyon– 2020
- \* Charlotte Maxit– Master en Pharmacie Genève– 2019
- \* Eva OGIRE - Master 1 et 2 Biologie Santé Réunion -2017 et 2018
- \* Alexia N'DEBO – Master en Pharmacie Genève- 2016
- \* Zainabou ALI MCOLO– Master 2 Biologie Santé Réunion – 2015

- \* Sophie BEAUBELICOUX et Sanel HAMZIC - Master 2 IADE infirmiers anesthésistes Réunion - 2014
- \* Laurence CORDONIN – Master 1 Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire, Biotechnologies Réunion - 2013
- \* Colette CORDONIN – Master 1 Biochimie, Biologie moléculaire et cellulaire, Biotechnologies Réunion - 2012

### 3 étudiants en thèse

- \* Grégorie Lebeau - Doctorat Biochimie et Biologie moléculaire – depuis mars 2021
- \* Eva Ogire - Doctorat Biochimie et Biologie moléculaire – depuis janvier 2019
- \* Colette Cordonin– Doctorat Biologie – 2015-2018
- \* Etienne FRUMENCE – Doctorat Biochimie, Biologie moléculaire – 2013-2016

## VII. Publications

22

Instability of the NS1 Glycoprotein from La Reunion 2018 Dengue 2 Virus (Cosmopolitan-1 Genotype) in Huh7 Cells Is Due to Lysine Residues on Positions 272 and 324. Ogire, E.; Diaz, O.; Vidalain, P.-O.; Lotteau, V.; Desprès, P.; **Roche, M.** Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 1951. doi : 10.3390/ijms22041951.

21

Pathogenic Leptospira and their animal reservoirs: testing host specificity through experimental infection. Cordonin C, Turpin M, Bringart M, Bascands J-L, Flores O, Dellagi K, Mavingui P, **Roche M**, Tortosa P. Sci Rep. 2020 Apr 29;10(1):7239. doi: 10.1038/s41598-020-64172-4.

20. Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Epidemic Strains from Reunion Island and the Seychelles. Pascalis H, Biscornet L, Toty C, Hafsia S, **Roche M**, Desprès P, Atyame Nten C, Bibi J, Louange M, Gedeon J, Mavingui P. Microbiol Resour Announc. 2020 Jan 23;9(4). pii: e01443-19. doi: 10.1128/MRA.01443-19. (IF 0,9)

19. A chimeric zika virus between viral strains MR766 and BeH819015 highlights a role for E-glycan loop in antibody-mediated virus neutralization. Frumence E, Viranaicken W, Bos S, Alvarez-Martinez M-T, **Roche M**, Arnaud DJ Gadea G, Desprès P. Vaccines. 2019 Jun 24;7(2). pii: E55. doi: 10.3390/vaccines7020055. (IF=3,3)

18. The epidemic of Dengue virus type-2 Cosmopolitan genotype on Reunion Island relates to its active circulation in the Southwestern Indian Ocean neighboring islands. Pascalis H, Turpin J, **Roche M**, Krejbich-Trotot P, Gadea G, Nten CA, Desprès P., Mavingui P. Heliyon. 2019, Apr 10;5(4):e01455. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01455 (IF 1,7)

17. Three leptospira strains from Western Indian Ocean wildlife show highly distinct virulence phenotypes through hamster experimental infection. Cordonin C, Turpin M, Bascands J-L, Dellagi K, Mavingui P, Tortosa P, **Roche M**. Frontiers in Micr. 2019, 10, 382. doi: 10.3389/fmicb.2019.00382 (IF=4,1)

16. The Flavonoid Isoquercitrin Precludes Initiation of Zika Virus Infection in Human Cells. Gaudry A, Bos S, Viranaicken W, **Roche M**, Krejbich-Trotot P, Gadea G, Desprès P, El-Kalamouni C. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 5;19(4). doi: 10.3390/ijms19041093. (IF 3,5)
15. The structural proteins of epidemic and historical strains of Zika virus differ in their ability to initiate viral infection in human host cells. Bos S, Viranaicken W, Turpin J, El-Kalamouni C, **Roche M**, Krejbich-Trotot P, Desprès P, Gadea G. *Virology* 2018 516:265–273. (IF 2,7)
14. Recombinant Zika NS1 Protein Secreted from Vero Cells Is Efficient for Inducing Production of Immune Serum Directed against NS1 Dimer. Viranaicken W, Ndebo A, Bos S, Souque P, Gadea G, El-Kalamouni C, Krejbich-Trotot P, Charneau P, Desprès P, **Roche M**. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec23;19(1). (IF 3,5)
13. ClearColi BL21(DE3)-based expression of Zika virus antigens illustrates a rapid method of antibody production against emerging pathogens. Viranaicken W, Nativel B, Krejbich-Trotot P, Harrabi W, Bos S, El Kalamouni C, **Roche M**, Gadea G, Desprès P. *Biochimie*. 2017 Nov;142:179-182. (IF 3,5)
12. Cadmium reduces the efficiency of Sindbis virus replication in human cells and promotes their survival by inhibiting apoptosis. Frumence E, Guiraud P, **Roche M**. *Biochem. Biophys. Reports* 2016 Aug;8:151-156 (IF 0,7)
11. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- $\beta$  production and apoptosis induction. Frumence E, **Roche M**, Krejbich-Trotot P, El-Kalamouni C, Nativel B, Rondeau P, Missé D, Gadéa G, Viranaicken W, Desprès P. *Virology* 2016 Jun;493:217-26 (IF 3,4)
10. High levels of dietary supplement vitamins A, C and E are absorbed in the small intestine and protect nutrient transport against chronic gamma irradiation. **Roche M**, Neti PVS, Kemp FW, Azzam EI, Ferraris RP, Howell RW. *Rad. Research*. 2015 184, 470–481 (IF 2,9)
9. Marked changes in endogenous antioxidant expression precede vitamin A-, C-, and E-protectable, radiation-induced reductions in small intestinal nutrient transport. **Roche M**, Kemp FW, Agrawal A, Attanasio A, Neti PV, Howell RW, Ferraris RP. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jan;50(1):55-65. (IF=6,1)
8. Radiation-induced reductions in transporter mRNA levels parallel reductions in intestinal sugar transport. **Roche M**, Neti PV, Kemp FW, Agrawal A, Attanasio A, Douard V, Muduli A, Azzam EI, Norkus E, Brimacombe M, Howell RW, Ferraris RP. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 Jan;298(1):R173- 82. (IF 3,1)
7. Olive phenols efficiently inhibit the oxidation of serum albumin-bound linoleic acid and butyrylcholine esterase. **Roche M**, Dufour C, Loonis M, Reist M, Carrupt PA, Dangles O. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1790(4):240-8. (IF 3)

6. Apolipoprotein E limits oxidative stress-induced cell dysfunctions in human adipocytes. Tarnus E, Wassef H, Carmel JF, Rondeau P, **Roche M**, Davignon J, Bernier L, Bourdon E. FEBS Lett. 2009 Jun 18;583(12):2042-8. (IF 3,5)
5. Effects of nutritional antioxidants on AAPH- or AGEs-induced oxidative stress in human SW872 liposarcoma cells. **Roche M**, Tarnus E, Rondeau P, Bourdon E. Cell Biol Toxicol. 2009 Dec;25(6):635-44. (IF 1,7)
4. The antioxidant properties of serum albumin. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. FEBS Lett. 2008 Jun 11;582(13):1783-7. (IF 3,5)
3. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. **Roche M**, Dufour C, Mora N, Dangles O. Org Biomol Chem. 2005 Feb 7;3(3):423- 30. (IF 3,8)
2. Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. Bouzid O, Navarro D, **Roche M**, Asther M, Haon M, Delattre M, Lorquin J, Labat M, Asther M and Lesage- Meessen L. Process Biochemistry, 2005, 5, 1855-1862. (IF 2,4)
1. Molecular clustering of Pycnoporus strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction. Lomascolo A, Cayol J.L, **Roche M**, Guo L, Robert J.L, Record E, Lesage-Meessen L, Ollivier B, Sigoillot J.C and Asther . Mycological Research, 2002, 106, 1193-1203. )(IF 2,5)

## VIII. Communications

### 1. Communications orales

The American Society of Virology's 40th annual meeting, on line Ogire, E.; Diaz, O.; Vidalain, P.-O.; Lotteau, V.; Desprès, P.; Roche, M. 2021

2nd world Congress on prevention and therapies against obesity. Paris, France. Roche M., Tarnus E., Singh N., Rondeau P., Bourdon E. 2007

XIInd International Conference on Polyphenols, 25–28 August. Helsinki, Finland. Roche M., Dangles O., Dufour C. 2004

Rencontre INRA du groupe 'Polyphénols et Micronutriments'. Montpellier, France. Roche M., Dangles O. et Dufour C. 2003

### 2. Posters

39th Annual Meeting American Society for Virology. Fort collins CO USA. Poster accepted but meeting cancelled because of Covid19 Pandemia. 2020

International Scientific Symposium – International Leptospirosis Society, Palmerston North, New Zealand. Cordonin C., Roche M., Mavingui P., Tortosa P. 2017

Institut Pasteur International Network, Paris, France. Frumence E., Viranaïcken W., Roche M., Ali Mcolo Z., Guiraud P., Gasque P., Despres P. 2015

55th meeting of the Radiation Research Society, Savannah, Georgia, USA. Roche M., Kemp F.W., Neti P.V.S.V., Agrawal A., Attanasio A., Howell R.W. and Ferraris R. 2009

54th meeting of the Radiation Research Society, Boston, Massachusetts, USA. Roche M., Neti P.V.S.V., Kemp F.W., Agrawal A., Azzam E.I., Howell R.W. and Ferraris R. 2008

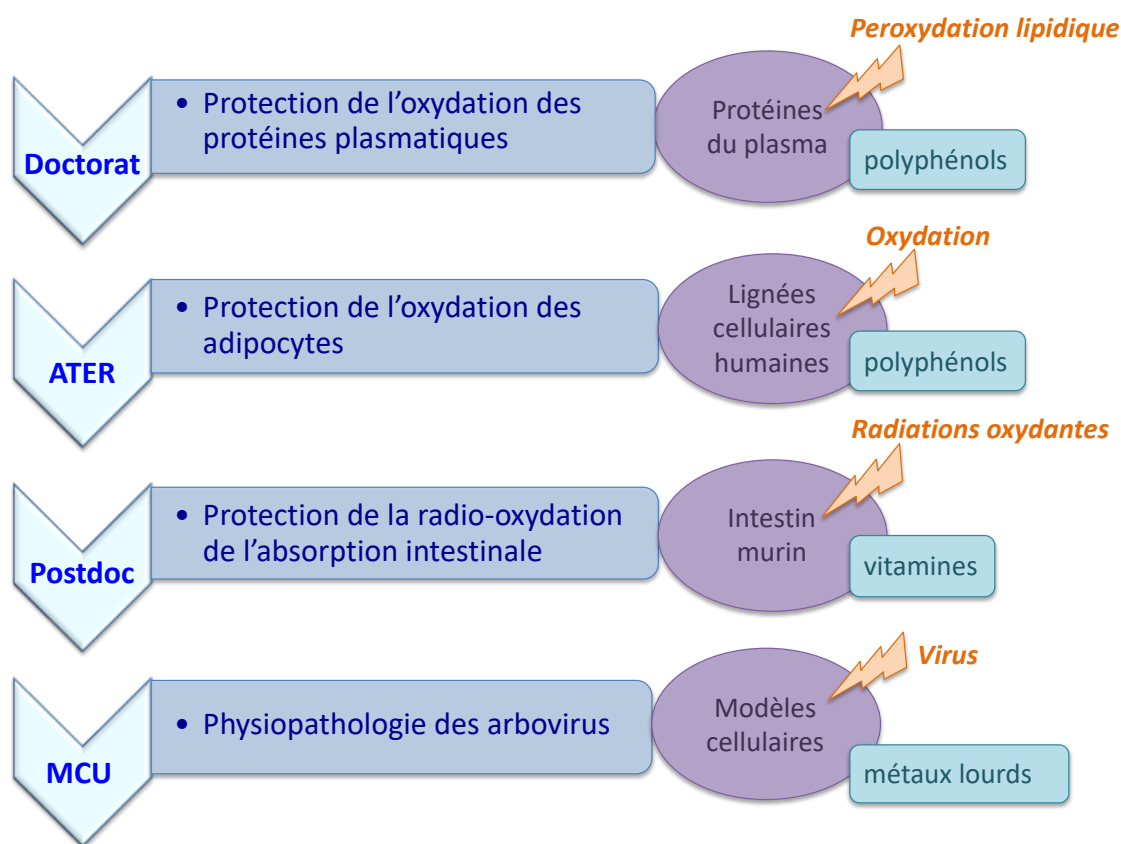
XXIInd International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finlande. Roche M., Dangles O. and Dufour C. 2004

1st International Conference of Polyphenols and Health. Vichy, France. Roche M., Dangles O. and Dufour C. 2003

6èmes Journées Francophones des Jeunes Physico-Chimistes. Marseille, France. Roche M., Dangles O. et Dufour C. 2002

## C. Travaux de recherche antérieurs

Le titre de ce mémoire d'HDR 'Réactivité moléculaire et réponses cellulaires engendrées par des facteurs exogènes chez l'homme dans un contexte métabolique et infectieux' illustre le parcours que j'ai suivi en recherche en tant que doctorante, attaché temporaire d'enseignement et de recherche, postdoctorante puis chercheuse-enseignante universitaire (MCU). Tous les travaux de recherche que j'ai mené se sont articulés autour d'un axe central global : l'effet de facteurs exogènes chez l'homme. J'ai en effet étudié, dans différents systèmes modèles : moléculaire, cellulaire et animal, la capacité de polyphénols, de vitamines alimentaires ou de métaux lourds à moduler la réactivité des systèmes utilisés face à une attaque oxydante ou en présence d'arbovirus (Figure 1).



**Figure 1.** Parcours de recherche avec les thématiques étudiées et les modèles mis en place.

Du fait de la cohérence temporelle de mes activités de recherche je vais vous présenter mes travaux dans l'ordre chronologique.

### I. L'albumine sérique haut lieu de modulation oxydative

Le doctorat en chimie bio-organique que j'ai effectué en étant à la base biochimiste de formation m'a donné une grande capacité d'adaptation. J'ai acquis de solides compétences dans la mise en œuvre d'expériences que je développe ci-après. De manière très intéressante et originale j'ai appréhendé finement le déroulé de l'oxydation au niveau de macromolécules biologiques majoritairement l'albumine. Ces travaux de thèse regroupés

dans le manuscrit 'Étude cinétique et mécanismes de l'activité antioxydante des phénols de l'olive dans différents systèmes modèles. Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique lié à la sérum albumine.' m'ont donné une connaissance approfondie sur les interactions intermoléculaires dans une situation d'oxydation [1].

## 1. Objet et finalités du travail de recherche

Étant biodisponible chez l'homme, les phénols issus de l'alimentation se retrouvent dans le plasma sanguin au contact de molécules circulantes comme les protéines et les lipides [2]. Des études ont montré que ces composés phénoliques sont capables de protéger les cellules et les LDL de l'oxydation [3].

Le but de ces travaux de thèse fut tout d'abord la mise au point d'un procédé d'extraction des phénols à partir de sous-produits de l'extraction de l'huile d'olive : les margines d'olive et ceci en étant exempt d'agents chimiques. Ensuite les potentialités de ces composés phénoliques isolés et purifiés furent évaluées au niveau de leur activité antioxydante. Les mécanismes moléculaires du pouvoir antioxydant des phénols de l'olive ont, dans ces travaux de thèse, été évalués de manière précise par différents systèmes modèles. En effet la dynamique d'action des polyphénols a été évalué en suivant la cinétique d'oxydation de lipides et de protéines dans les modèles plasmatiques en leur présence et à différentes concentrations.

La connaissance de la qualité et du mode de protection de ces composés phénoliques a eu pour but de valoriser les produits issus de l'olive comme bénéfique pour la santé et la nutrition humaine.

## 2. Intérêt scientifique

La particularité de l'olive vient de son hétérogénéité car elle rassemble dans sa pulpe des composés hydrophobes (huile) et hydrophiles. L'extraction se fait par un procédé biphasique permettant d'obtenir deux phases: l'huile et les margines (pulpe/noyau). Les phénols sont partagés dans ces deux phases mais la majorité se retrouvent dans les déchets que sont les margines produites en grande quantité dans le bassin méditerranéen essentiellement. Elles sont polluantes et pourraient être détoxiquées et valorisées en extrayant les composés phénoliques [4]. En effets les phénols à terme stérilisent les sols qui subissent des épandages massifs de margines. La margine est une matrice complexe dont la mobilité des antioxydants est limitée car enchâssés par des liaisons covalentes dans les constituants végétaux (cellulose, lignines). L'extraction des phénols nécessite donc leur libération de la matrice par exemple par l'ajout innovant d'enzymes fongiques hydrolysant les liaisons sucres-phénols. L'utilisation des enzymes fongiques issus de champignons du bois a permis de répondre aux contraintes d'emplois des composés phénoliques dans la cosmétique et l'alimentation qui nécessitent un procédé exempt d'agents chimiques [5]. A l'issue de cette extraction, l'intérêt a été d'obtenir une fraction pure en antioxydant de l'olive non disponible commercialement à l'époque (l'hydroxytyrosol).

L'importance de l'emploi de phénols antioxydants résident dans le fait que chez l'Homme, du fait du fonctionnement aérobie les molécules biologiques (lipides, glucides, protéines et acides nucléiques) sont confrontées au stress oxydant engendrés par des espèces réactives issues de l'oxygène (ERO). Des pathologies dégénératives sont associées au stress oxydant comme les cancers, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer et

l'athérosclérose. Les enzymes antioxydantes intracellulaires sont présentes pour lutter contre ce déséquilibre oxydatif mais peuvent être dépassées selon l'ampleur de l'oxydation. Une alimentation riche en antioxydants dont les polyphénols peut aider à réduire le niveau de stress des cellules et des fluides biologiques [6].

Dans cette étude doctorale la matrice sanguine a été sélectionnée et modélisée *in vitro* afin de déterminer la localisation et les interactions des molécules : protéines, acides gras, phénols et oxydants, entre elles.

### 3. Programme de travail et méthodes employées

#### a. Extraction de composés phénoliques à partir de margines d'olive

L'extraction des phénols des margines d'olive fût optimisée au moyen d'un procédé non toxique utilisant un outil de biotransformation déstructurant : les estérases de souches fongiques d'*Aspergillus Niger*. L'utilisation de ces cinnamoyl-estérases a eu pour but d'améliorer le rendement grâce à l'hydrolyse des liaisons esters entre les acides phénoliques et les polysaccharides des parois cellulaires. L'utilisation d'eau et d'éthanol a permis ensuite d'obtenir des fractions de métabolites pures, stables et non toxiques.

#### b. Tests antioxydants simples

Plusieurs composés phénoliques issues de l'olive ont été testés : le tyrosol, l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine, l'acide caféique, l'acide p-coumarique et l'acide férulique, ces deux derniers étant également des métabolites de l'acide caféique chez l'homme. L'acide chlorogénique, principale source végétale de l'acide caféique, a été également sélectionné pour renforcer l'étude. La quercétine, un flavonol, l' $\alpha$ -tocophérol et l'acide L-ascorbique, deux vitamines, ont été étudiés à titre de comparaison.

Les composés ci-dessus ont été comparés entre eux pour leur capacité à réduire les radicaux colorés détectables le DPPH° et l'ABTS+°. Ces tests sont simples, fiables et très utilisés dans la littérature formant ainsi de solides outils de mesure et de comparaison de la capacité antioxydante [7]. La spécificité de mon travail de recherche a été d'analyser la cinétique de réduction du radical libre DPPH° ce qui a permis d'obtenir des informations fines sur la réactivité intrinsèque de chaque molécule.

#### c. Inhibition de la peroxydation lipidique

Les antioxydants ont été ajoutés à deux types de matrices contenant l'acide gras doublement insaturé : l'acide linoléique (C18 :2,  $\Delta$ 9,12). La peroxydation lipidique a été initiée par le AAPH, un composé hydrophile qui a la particularité en solution de générer de manière constante au cours du temps des radicaux libres oxygénés. L'acide linoléique a été présenté à l'agent oxydant en étant solubilisé dans les deux matrices modèles suivantes :

- des micelles de SDS

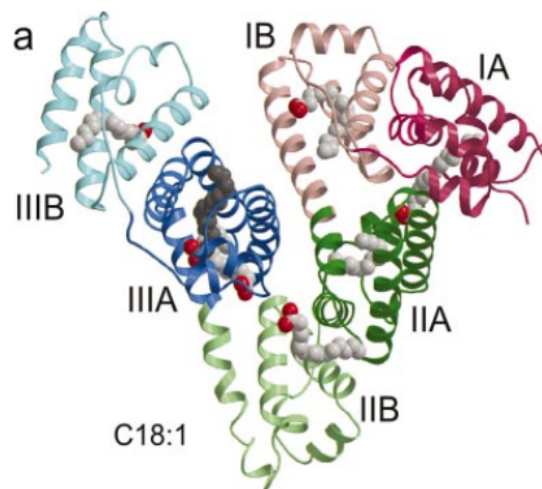
Les acides gras ont été solubilisés dans une solution aqueuse de Sodium Dodécyl Sulfate créant ainsi des micelles [8]. L'oxydant ajouté s'est localisé dans la phase aqueuse



en périphérie des micelles. La capacité des métabolites à protéger de la peroxydation l'acide linoléique a été mesurée. Les antioxydants se sont partagés différemment entre les deux phases, aqueuse et lipidique, suivant leurs structures et leurs caractéristiques physicochimiques. Ils ont chacun eu une mobilité et une dynamique différente qui ont eu un impact sur leur action antioxydante. La cinétique de la réaction d'oxydation a été suivie par spectroscopie à 234 nm qui correspond à la longueur d'onde d'absorption des hydroperoxydes des produits précoces d'oxydation des acides gras.

- complexé à l'albumine du sérum humain.

Dans ce modèle, les acides gras libres ont été solubilisés dans l'albumine dans les mêmes conditions d'osmolarité que le plasma sanguin (Figure 2) [9].



**Figure 2.** Modélisation de la structure tridimensionnelle de l'albumine sérique humaine composée de 6 domaines et complexée à 7 acides oléiques (C18:1) résolution 2,4Å [9].

Les acides gras se sont localisés dans des sites spécifiques de la protéine. Les antioxydants se sont dispersés dans le milieu selon leurs caractéristiques physicochimiques. L'évolution de cette matrice modèle fût suivie par chromatographie liquide haute pression pour la détection des différents acides gras oxydés produits au cours du temps.

#### d. Inhibition de l'oxydation protéique

Comme les lipides, les protéines du plasma subissent elles aussi des attaques oxydantes. Dans le plasma sanguin se trouvent l'albumine ainsi que la butyrylcholine estérase qui est par ailleurs co-purifiée avec l'albumine par les fabricants. Cette estérase est une enzyme dont l'activité est mesurable avec précision en fluorimétrie [10]. L'oxydation de l'albumine a alors été suivie indirectement au travers de la mesure fluorimétrique de l'activité enzymatique de la butyrylcholine estérase avec et sans phénols.

#### e. Localisation et évolution des phénols dans les systèmes étudiés

L'albumine est entre autres un transporteur spécifique de micronutriments et peut fixer les métabolites secondaires des plantes. L'utilisation de la fluorimétrie m'a permis de calculer l'intensité de liaison entre l'albumine et les phénols [11]. Tandis que mes études précédentes ont évalué le potentiel antioxydant des phénols, l'utilisation de la spectrométrie de masse m'a permis de constituer des hypothèses sur le devenir des métabolites phénoliques après oxydation en visualisant leurs structures oxydées.

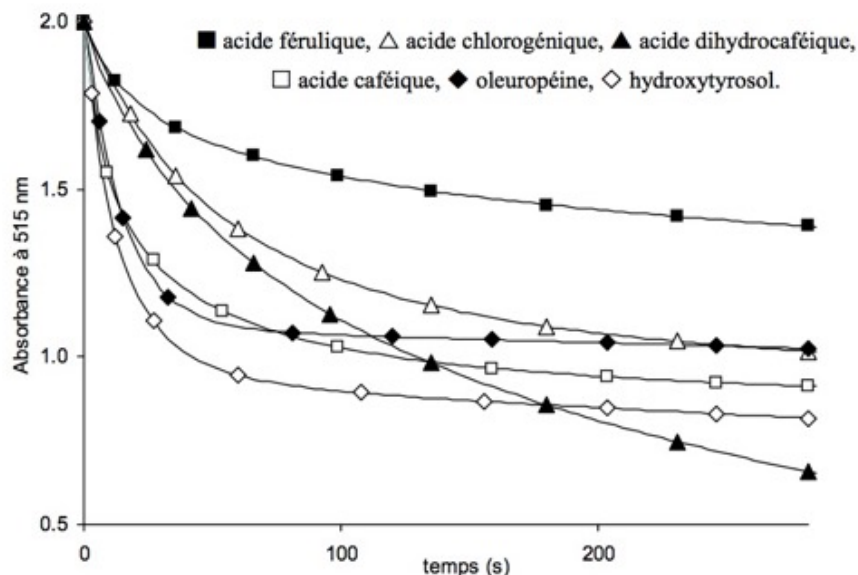
#### 4. Principaux résultats

##### a. Extraction de composés phénoliques à partir de margines d'olive

A l'issue de l'extraction à partir des margines, cinq composés phénoliques ont été obtenus : l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'acide caféique, l'acide p-coumarique et l'acide férulique. L'obtention de la fraction avec 85 % de pureté d'hydroxytyrosol à raison de 1.4 gr/kg de margine sèche a donné un espoir pour la réalisation de cette extraction à plus grande échelle [12].

##### b. Tests antioxydants

Les résultats obtenus par spectroscopie ont mis en avant le fait que les phénols de l'olive ont une activité antioxydante modérée mais de longue durée grâce à leurs fortes stœchiométries en terme de capture de radicaux libres [13] (Figure 3). En effet certaines de ces molécules phénoliques sont capable de réduire des oxydants radicalaires avec un ratio supérieur à 1.



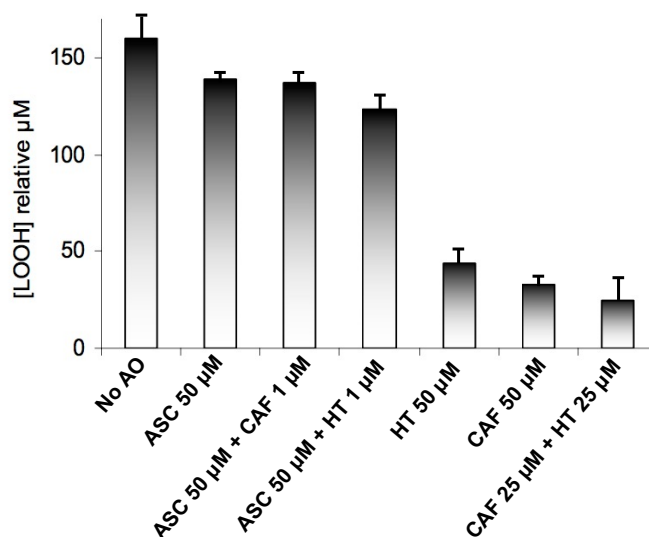
**Figure 3.** Cinétique de diminution de l'absorbance à 515 nm d'une solution éthanolique de 200 µM du radical stable DPPH° se réduisant en DPPH<sub>2</sub> après ajout de 50 µM de phénols [13]. Ces courbes sont représentatives des expériences menées en n=5.

Ce test a révélé que certaines molécules phénoliques étudiées peuvent réduire jusqu'à 3 radicaux par molécule. Ces tests antioxydants ont apporté des caractéristiques

intrinsèques de ces métabolites phénoliques ce qui a permis de les comparer entre eux. L'hydroxytyrosol, l'oleuropéine et l'acide caféique ont présentés les cinétiques de piégeage de radicaux les plus rapides. L'hydroxytyrosol et l'acide dihydrocaféique ont enregistrés les plus fortes stœchiométries. Donc ces tests antioxydants simples et rapides ont mis en avant l'hydroxytyrosol qui s'est avéré être l'antioxydant le plus performant du fait d'une cinétique rapide et d'une stœchiométrie supérieure à 2.

### c. Inhibition de la peroxydation lipidique et de l'oxydation protéique

Les phénols de l'olive ont été capables d'inhiber la peroxydation de l'acide gras doublement insaturé l'acide linoléique solubilisé dans des micelles de SDS et dans l'albumine après oxydation par l'AAPH qui en solution aqueuse se dissocie au cours du temps en radical [14]. Dans la matrice micellaire (SDS-acide linoléique), la vitesse de peroxydation a été ralentie alors que dans le modèle plasmatique (HSA-acide linoléique) la peroxydation a été totalement inhibée pendant un temps de latence spécifique à chaque phénol traduisant la puissance protectrice de ces derniers (Figure 4).



**Figure 4.** Inhibition de l'oxydation des acides linoléiques complexés à l'albumine du sérum humain HSA en présence d'antioxydants par mesure de la détection des hydroperoxydes (LOOH) accumulés au bout de 3h d'oxydation par l'oxydant AAPH. No AO : pas d'antioxydants, ASC : acide ascorbique, CAF : acide caféique, HT : hydroxytyrosol [14]. Les données correspondent aux moyennes et écart types de n=5 répétitions.

La quercétine, et les composés à noyau catéchol (acide caféique, oleuropéine, acide chlorogénique et hydroxytyrosol) sont incontestablement les composés les plus antioxydants. Les phénols de l'olive dont l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol présentent des capacités antioxydantes originales qu'il serait opportun de valoriser. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'oxydation strictement protéique via le test avec la butyrylcholine estérase.

### d. Localisation et évolution des phénols dans les systèmes étudiés

Les tests fluorimétriques ont montré que les phénols de l'olive sont liés à l'albumine dans des sites précis. De manière très intéressante les analyses par spectrométrie de masse des phénols après oxydation ont démontré une forte capacité de

dimérisation de ces derniers et c'est grâce à ce procédé qu'ils atteignent de fortes stœchiométries de réduction d'oxydants par molécule. C'est cette capacité de dimérisation des phénols soumis à l'oxydation qui explique la forte potentialité de régénération des ces molécules en faisant des antioxydants de choix car actifs dans le temps.

## 5. Conclusion

Mes travaux de thèse ont montré que chaque molécule dite antioxydante a un mode d'action spécifique lié à sa structure et à sa capacité de liaison avec les macromolécules présentes. Les phénols de l'olive se sont révélés avoir une capacité antioxydante modérée mais efficace car active sur de longues périodes de temps grâce à leur forte capacité de régénération par dimérisation. L'utilisation et la consommation par l'homme de ces composés phénoliques végétaux sont importants pour la santé car leurs potentialités sont réelles pour lutter contre l'oxydation notamment celle des lipides insaturés circulants dans le sérum.

## II. Les antioxydants dans un contexte cellulaire de diabète et d'obésité

J'ai souhaité évoluer pour la suite de mes recherches sur la même thématique d'étude de composés phénoliques mais au niveau cellulaire. J'ai ainsi choisi d'étudier le stress oxydant cellulaire et les antioxydants végétaux en tant qu'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche pendant deux ans dans le laboratoire d'accueil.

### 1. Objet et finalités du travail de recherche

Mon projet s'est naturellement inscrit dans la thématique du laboratoire qui concentrait ses activités sur les phénomènes inflammatoires dans l'obésité et les pathologies associées comme le diabète du fait de la particulière sensibilité du territoire réunionnais au syndrome métabolique et plus généralement de la France [15]. Spécialisée, grâce à ma recherche doctorale, sur les antioxydants alimentaires dans les phénomènes d'oxydation, j'ai rejoint le laboratoire universitaire consacré aux pathologies du diabète et de l'obésité au sein d'une équipe qui avait pour thématique l'étude du stress oxydant [16]. Sachant que la balance oxydante/antioxydante de l'organisme humain est impliquée dans les désordres métaboliques, j'ai étudié l'effet d'antioxydants végétaux sur des cellules soumises à l'oxydation. Ce travail fut une étude consacrée à la capacité de diminution du stress oxydant par des molécules d'origine végétale en mimant une situation pathologique de diabète-obésité dans un modèle cellulaire.

### 2. Intérêt scientifique

Une enquête épidémiologique en 2000 a montré que près de 18% de la population adulte réunionnaise, soit trois fois plus que la population métropolitaine, était atteinte de diabète avec 80% des individus concernés présentant une surcharge pondérale [17].

Le phénomène de glycation des protéines plasmatiques est une modification oxydative retrouvée accrue chez des patients atteints de diabète. La glycation correspond

à la fixation d'un sucre réducteur sur une protéine, donnant lieu à la formation de produits avancés de glycation (AGE). La glycation touche en premier lieu la séralbumine, la protéine circulante la plus abondante du plasma [18]. La problématique est que les protéines glyquées peuvent réagir avec l'oxygène pour former des radicaux libres oxygénés [16].

Dans le cas d'hyperglycémie non contrôlée il se forme dans le plasma des AGEs qui sont en majorité de l'albumine glyquée. Or l'albumine transporte entre autres les acides gras et donc le tissu adipeux est soumis à ce stress dit glycoxydant car la vascularisation sanguine amène au contact des adipocytes les albumines glyquées pour les échanges d'acides gras. Certains antioxydants apportés par l'alimentation sont retrouvés dans le plasma sanguin et sont susceptibles de protéger l'albumine et ainsi au niveau du tissu adipeux éviter un stress oxydant exacerbé. Dans cette étude j'ai choisi de mesurer la capacité protectrice de quatre antioxydants majeurs présents dans l'environnement nutritionnel humain et biodisponibles : l'acide caféique (phénols des céréales), la quercétine (flavonol de l'oignon), l'acide L-ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol (vitamines) [19].

Ce projet de recherche s'est orienté sur la thématique du bienfait d'une alimentation saine riche en micronutriments issus de végétaux capables de réduire les conséquences désastreuses de l'installation d'un syndrome métabolique chez l'homme [20].

### 3. Programme de travail et méthodes employées

Le choix du modèle cellulaire s'est porté sur une lignée pré-adipocytaire issue de liposarcome humain SW872 [21]. Ces adipocytes ont été soumis pendant 24 h à 72 h à un ajout de différents AGEs comme de la BSA glyquée avec ou sans antioxydants dans leur milieu de culture. Dans ce modèle de stress oxydant plusieurs fonctions cellulaires ont été potentiellement altérées. J'ai étudié les dommages cellulaires à l'aide de différentes méthodes testant la viabilité cellulaire, la quantification des espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaire et l'expression génique des enzymes antioxydantes.

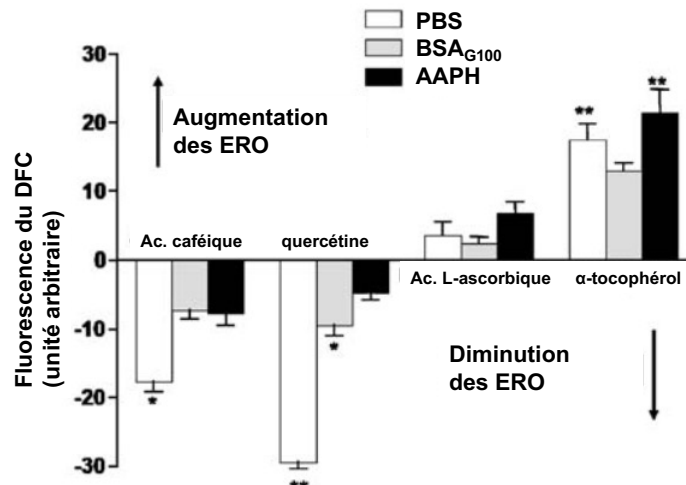
### 4. Principaux résultats

#### a. Mesure de la viabilité cellulaire

J'ai déterminé les concentrations en oxydant et en antioxydant pour laquelle la viabilité des lignées préadipocytaires est de 100 %. L'acide L-ascorbique et l'acide caféique se sont avérées être les molécules les moins toxiques avec une viabilité cellulaire de 100 % pour des concentrations allant jusqu'à 1 mM. Par contre la quercétine a été jugée comme assez toxique car elle a provoqué dès 100  $\mu$ M une forte mortalité cellulaire. L' $\alpha$ -tocophérol pour des concentrations maximales de 800  $\mu$ M a respecté totalement la viabilité des préadipocytes. Pour cette molécule de plus fortes concentrations n'ont pas pu être testées pour des raisons de limites de solubilité.

#### b. Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaire

Une concentration commune de 50  $\mu\text{M}$  a été choisie pour cette étude car ne présentant pas de mortalité cellulaire. L'acide caféique et la quercétine apportent une action antioxydante intense en réduisant fortement le taux d'ERO intracellulaire (Figure 5). Par contre l'acide L-ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol ont de manière intéressante dans cette étude joué un rôle pro-oxydant. Comme l'acide caféique possède un très faible indice de toxicité et qu'il est prédisposé à jouer son rôle d'antioxydant sur les adipocytes, il est sélectionné pour la suite des travaux.



**Figure 5.** Effets des antioxydants sur le taux de ERO intracellulaires des cellules SW872 après un stress oxydant de type BSA glyquée 12 mM ou AAPH 2 mM. Le PBS est utilisé comme contrôle. Les cellules ont été incubées avec 50  $\mu\text{M}$  d'antioxydants pendant 48h [22]. Le niveau de fluorescence DCF est exprimé en pourcentage de variation (diminution ou augmentation) en comparaison des cellules non traitées. Les données sont exprimées comme moyenne et écart types  $n=3$  et les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant une comparaison multiple one way ANOVA. Effets des antioxydants sur l'accumulation d'ERO (vs cellules non traitées): \*\*  $P<0,01$  and \*  $P<0,05$ .

### c. Expression de la superoxyde dismutase

Cette étude a montré que l'acide caféique diminue significativement la transcription des superoxydes dismutases cytoplasmique et mitochondriale cellulaire en présence des oxydants utilisés [22][23]. Les cellules semblent protégées de l'oxydation par l'acide caféique et il n'y a pas d'induction d'expression des enzymes antioxydantes et même au contraire les taux de transcrits de ces enzymes sont diminués. Cette diminution peut se traduire par le fait que le stress oxydant étant contrôlé par l'acide caféique il n'est pas nécessaire que la cellule exprime un fort taux d'enzymes antioxydantes.

## 5. Conclusion

Chaque modèle d'oxydation apporte des informations uniques sur le comportement de molécules sur leur potentiel antioxydant. Les espèces végétales riches en molécules de type métabolites secondaires possèdent des capacités protectrices à analyser comme des capacités antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes. L'utilisation dans cette étude du modèle cellulaire a permis de distinguer les molécules testées entre elles et l'acide caféique a présenté des caractéristiques de toxicité faible et de pouvoir antioxydant élevé ce qui le place comme molécule phare pour la lutte antioxydante chez l'homme [24]. Pour l'alimentation et la cosmétique, l'utilisation de

molécules naturelles et un plus mais les extraits purs doivent être utilisés avec attention afin de choisir une dose permettant un effet antioxydant et non pro-oxydant. La quercétine présente un très bon effet antioxydant mais sa toxicité est élevée, la dose utilisée doit être adaptée à l'utilisation [25]. Ces études cellulaires sont donc majeures pour connaître le comportement des molécules sur du matériel vivant. Il est à noter que chaque molécule absorbée par les individus est sujette à la métabolisation. Des études ont identifié et testé chaque métabolite des molécules initiales qui ingérées sont modifiées lors de la digestion par le microbiote intestinal puis dans les tissus de l'organisme notamment le foie [26].

Ces travaux menés au niveau cellulaire m'ont conforté dans l'idée de poursuivre sur ce même axe de recherche concernant les molécules antioxydantes. Forte de ces connaissances approfondies j'ai eu l'opportunité de prétendre à un postdoctorat à l'étranger sur l'étude de micronutriments sur un modèle *in vivo* : les rongeurs.

### III. Protection de l'altération de l'absorption intestinale par des vitamines

A ce stade de mes recherches sur les molécules antioxydantes, j'ai souhaité étudier la capacité antioxydante de molécules au sein d'un organisme entier en utilisant le modèle petit rongeur. Les molécules peuvent subir en premier lieu une métabolisation par le microbiote intestinal, puis suivant leur structure ont une biodisponibilité intestinale variable et le passage éventuel par le foie modifie également la molécule de départ. Au final l'étude des capacités antioxydantes d'une substance doit intégrer ses modifications afin de tester réellement l'effet d'une molécule lorsqu'elle est délivrée *via* l'alimentation.

#### 1. Objet et finalités du travail de recherche

Un des oxydant auquel l'Homme est confronté naturellement où du fait d'analyse et de traitements médicaux sont les radiations [27]. L'intestin, tissu mou fortement hydraté, est particulièrement sensible au stress oxydant de type radiatif [28]. Parmi les radiations ionisantes se trouvent les radiations gammas qui possèdent l'énergie nécessaire pour engendrer de multiples réactions d'oxydation dans les organismes irradiés générant des effets néfastes sur l'ensemble de la physiologie cellulaire et tissulaire [29]. Le projet ci-dessous s'est intéressé à l'irradiation par rayons gammas de souris par le biais du suivi de la fonctionnalité d'absorption de l'intestin grêle avec ou sans apport oral de vitamines. Ce travail de recherche a pu être mené grâce à la collaboration des deux équipes de radiologie et de physiologie intestinale de l'UMDNJ.

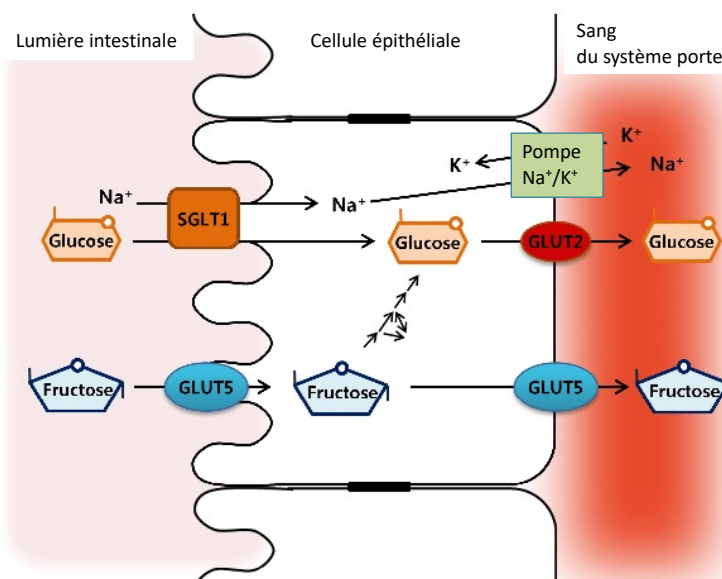
#### 2. Intérêt scientifique

L'homme soumis aux radiations ionisantes (radiothérapies, radiations issues de l'espace, accidents industriels) peut avoir certaines fonctions biologiques plus ou moins altérées. C'est le cas du petit intestin qui reconnu comme radiosensible et peut présenter des altérations d'absorption de plusieurs nutriments notamment les sucres [30]. Dans ce projet je me suis penchée sur les questions suivantes : Comment les radiations gammas affectent-elles la physiologie intestinale de la souris et plus précisément les transporteurs

intestinaux des sucres ? Et est-ce que les vitamines sont un moyen efficace de préserver l'absorption intestinale suite à une irradiation ?

#### a. Biodisponibilité des nutriments et rôle protecteur des vitamines

Le transport des sucres au travers de la membrane intestinale est un marqueur essentiel dans l'étude de la biodisponibilité des nutriments. Le suivi du glucose et du fructose, sucres majoritaires de l'alimentation humaine, permet de mesurer précisément l'absorption dans la partie proximale de l'intestin grêle (Figure 6) [31]. L'analyse du transport d'acides aminés et de sels biliaires est également importante car ces transports s'effectuent dans la partie distale de l'intestin grêle.



**Figure 6.** Transport du glucose et du fructose au travers de l'épithélium intestinal de mammifères. Le glucose est transporté dans les entérocytes au niveau apical au travers de la membrane de la barrière en brosse par le cotransporteur sodium/glucose SGLT1 et est relargué dans le système porte au niveau basal par le transporteur glucose à gradient de concentration GLUT2 situé dans la membrane basolatérale. La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> maintient le gradient de SGLT1 fonctionnel. Le fructose est transporté de part et d'autre de l'entérocyte par une diffusion facilitée via le transporteur GLUT5 [31].

La prise préventive et curative de vitamines est intéressante du fait de leur capacité à réduire les effets des radiations notamment dans le cas de traitement de cancers [32]. Dans mon étude j'ai porté mon choix sur les vitamines A, C et E du fait de leur grande disponibilité dans le commerce et de leur faible coût permettant une prise facilitée par un sujet susceptible d'être exposé à des radiations ionisantes de types gammas.

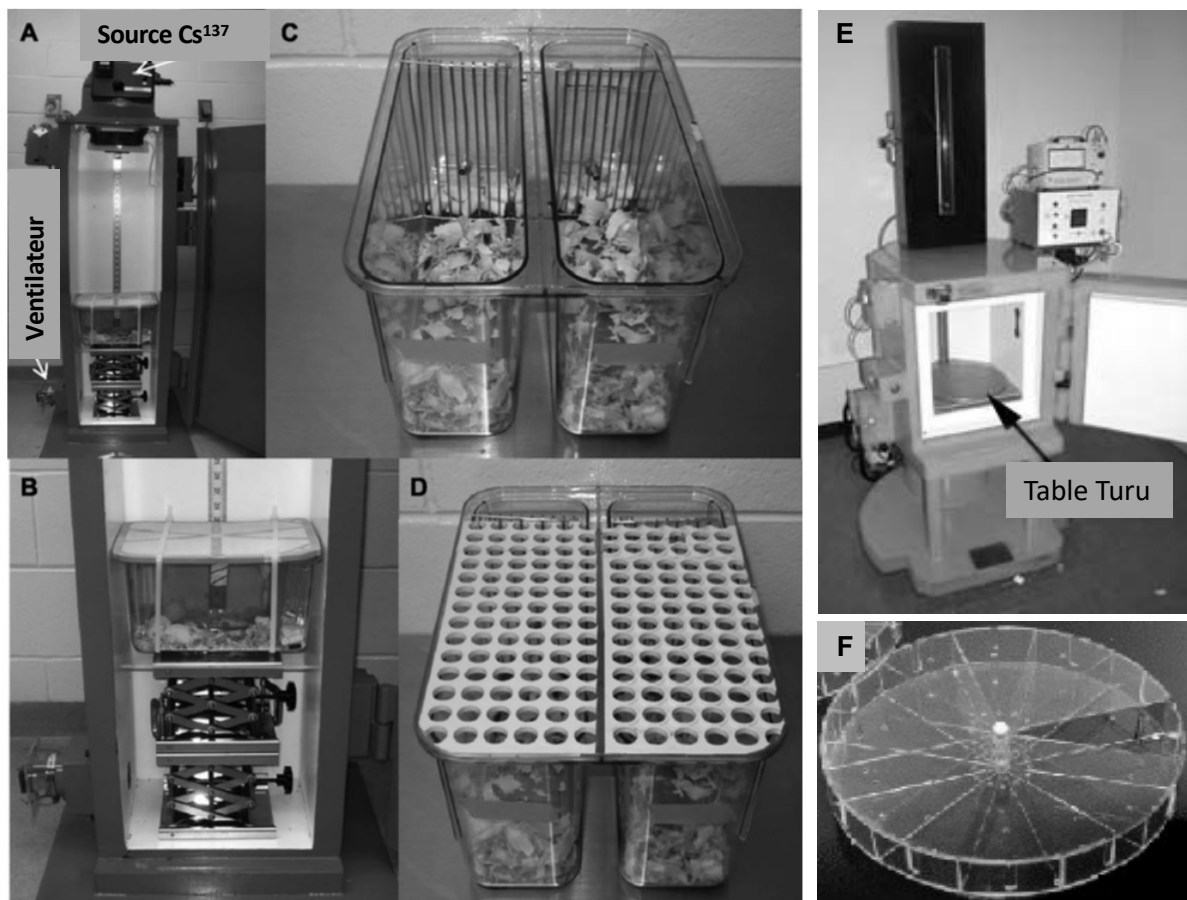
#### b. État du statut oxydant de l'intestin

Les enzymes cellulaires antioxydantes ont pour rôle de réduire le taux d'espèces réactives générées dans l'organisme comme cela est le cas au niveau des cellules épithéliales du petit intestin dans le modèle souris [33]. Les radiations ionisantes ont-elles un effet régulateur sur ses enzymes ? Mon étude a permis de caractériser la réponse antioxydante de l'intestin face à une irradiation de type gamma.



### 3. Programme de travail et méthodes employées

Plusieurs lots de souris ont été irradiés aux rayons gammas à différentes doses allant jusqu'à 10 Gray selon deux procédés nommés irradiations aigues et chroniques : la dose étant répartie sur 10 min ou sur trois jours dans deux types d'appareils d'irradiation adaptés (Figure 7). Chaque lot de souris a disposé d'une alimentation normale ou enrichie en vitamines A, C ou E mise en place 4 à 5 jours avant l'irradiation. Les souris ont été sacrifiées à différents temps soit précocement sur une période de 48h soit à plusieurs jours d'intervalle 3, 5, 8 et 14 jours post-irradiation et les intestins ont été prélevés pour réaliser les analyses ci-dessous.



**Figure 7.** Système d'irradiation des souris par des rayons gamma issus de la source de Césium Cs137. A-D Irradiateur gamma faible dose et son système de cage d'une capacité de 3 cages pour les irradiations de type chronique sur 3 jours. E-F Irradiateur gamma haute dose pour les irradiations de type aigues sur quelques minutes. Les souris sont placées dans une boîte porte-souris qui effectue une rotation sur la table Turu pour obtenir une irradiation uniforme [34][35].

#### a. Mesure de biodisponibilité du petit intestin murin

Les mesures d'absorption des nutriments ont été réalisées *ex vivo* tout de suite après sacrifice des souris sur différentes parties choisies de leur intestin grêle via l'utilisation d'isotopes radioactifs. Les transports étudiés furent ceux des sucres (fructose et glucose), des acides aminés (proline), de dipeptides (la carnosine : alanine - histidine) et de sels biliaires (l'acide taurocholique). Cette étude sur une période maximale de 14 jours post-

irradiation a permis d'appréhender l'effet de rayons gamma d'intensité différente et des vitamines A, C et E sur la biodisponibilité des nutriments dans les différentes régions de l'intestin grêle des souris [36].

La biodisponibilité intestinale des vitamines A, C et E a été spécifiquement analysée par chromatographie liquide haute pression afin de suivre leur taux et la formation de métabolites dans l'intestin grêle et le sang.

#### b. Analyse de l'expression des gènes des principaux transporteurs intestinaux

La quantité des ARNm des transporteurs dans les entérocytes après irradiation sur une courte période de 48h fut étudiée par PCR en temps réel. Le taux de protéines a été détecté par western blot. Cette étude a abouti à l'éclaircissement du mécanisme de régulation de l'expression des transporteurs intestinaux après un stress radiatif.

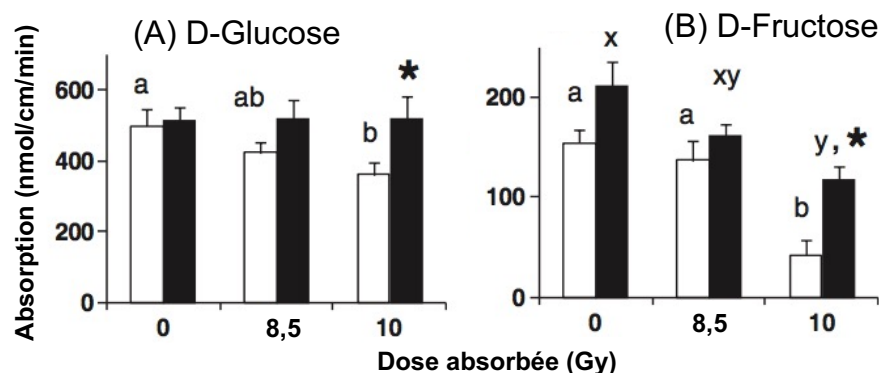
#### c. Étude des défenses antioxydantes de l'entérocyte

Après avoir détecté la présence d'oxydation au niveau des cellules de l'intestin grêle, l'expression des enzymes antioxydantes intestinales a été analysée au niveau transcriptionnel par PCR en temps réel, traductionnel par western blot et enzymatique par détermination de l'activité afin de comparer le profil oxydant du petit intestin dans les différentes conditions d'irradiation et d'alimentation en vitamines utilisées [33].

### 4. Principaux résultats

#### a. Biodisponibilité des nutriments après irradiation

Le transport actif du glucose s'est avéré radio-résistant, cette préservation permet certainement à l'organisme de continuer à recevoir de l'énergie via ce sucre essentiel en cas d'irradiation. Par contre l'absorption du fructose a été fortement réduite et constitue alors un marqueur d'irradiation de l'intestin (Figure 8 A et B histogrammes blancs) [37]. Concernant les transporteurs, l'analyse de l'expression transcriptionnelle de SGLT1 responsable du transport du glucose n'a pas été affectée par l'irradiation alors que GLUT5 qui transporte le fructose l'a été avec une diminution par deux de l'expression de son ARNm. L'absorption de la proline, de la carnosine et de l'acide taurocholique n'a été que partiellement affecté par l'irradiation dans les conditions de l'étude.



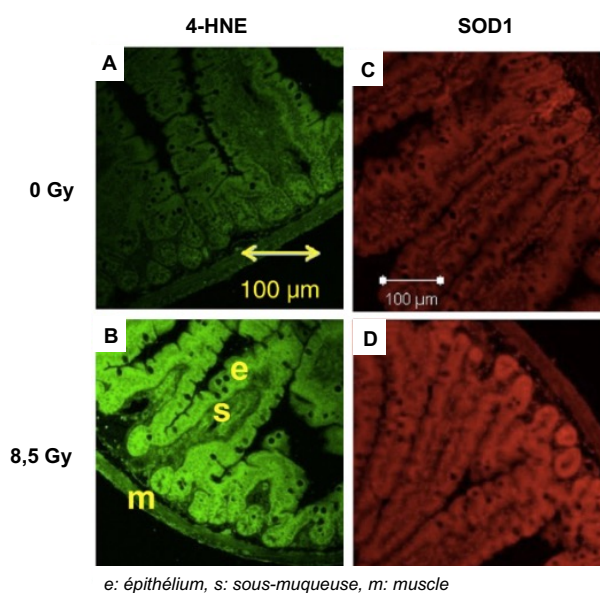
**Figure 8.** Mesure *ex vivo* de l'absorption du (A) D-glucose et (B) D-fructose de jéjunum de souris irradiées en aigue avec 0, 8,5 ou 10 Gray et sacrifiées 8 jours post-irradiation. Les souris ont été nourries avec une alimentation normale (contrôle, barres blanches) ou avec une alimentation supplémentée avec un cocktail de vitamines A, C, and E (400 IU/g rétinyl-acétate 100× contrôle, 28.6 mg/g d'acide ascorbique phosphate 35% active, et 12.5 IU/g  $\alpha$ -tocophérol acétate) (barres noires) [37]. Les résultats correspondent aux moyennes ( $\pm$ ET) de 6 expériences indépendantes. ( $P < 0.05$  par one-way ANOVA).

Les trois vitamines A, C et E ont été correctement absorbées par les entérocytes de la partie proximale testée de l'intestin grêle car elles ont été retrouvées en grande proportion dans le plasma et le tissu intestinal [34]. Le rétinol (vitamine A) a présenté la particularité d'être retrouvé aussi sous des formes conjuguées à des acides gras ce qui potentialise certainement sa biodisponibilité grâce à son hydrophobicité acquise. Chaque vitamine seule en prise orale a été peu efficace pour protéger le transport des nutriments par les cellules intestinales murines. Par contre les trois vitamines associées dans l'alimentation de la souris ont été radio-protectrices comme cela est montré dans le cas d'une irradiation aigue en Figure 8 A et B histogrammes noirs.

La délivrance de rayons gamma en mode aigue ou chronique a affecté de la même manière les transporteurs de nutriments et de même l'alimentation riche en vitamine A, C et E donné aux souris a permis dans les deux types de délivrance des rayons une protection de l'absorption intestinale [37][34].

#### b. Modulation des enzymes antioxydantes

L'effet oxydant des rayons gammas a été observé sur des coupes d'intestins de souris irradiées par la présence significative détecté par immunohistochimie, par rapport aux intestins non irradiés, du produit final de peroxydation lipidique le 4-HNE (Figure 9 A-B). Ensuite la réponse antioxydante a été appréciée par détection de l'enzyme superoxyde dismutase notamment dont le taux d'ARNm augmente très rapidement dès 4 heures post-irradiation et dont la présence est plus marquée dans le tissu irradié comme cela été révélé par immunolocalisation dans les figures 9 C-D [35]. Les entérocytes répondent aux radiations sous la forme d'une réponse antioxydante pour lutter contre l'afflux d'espèces réactives.



**Figure 9.** Immunolocalisation du 4-HNE (A-B) en vert et de la SOD1 (C-D) en rouge dans une coupe histologique de petit intestin de souris 8h après irradiation avec 0 et 8.5 Gy.

## 5. Conclusion

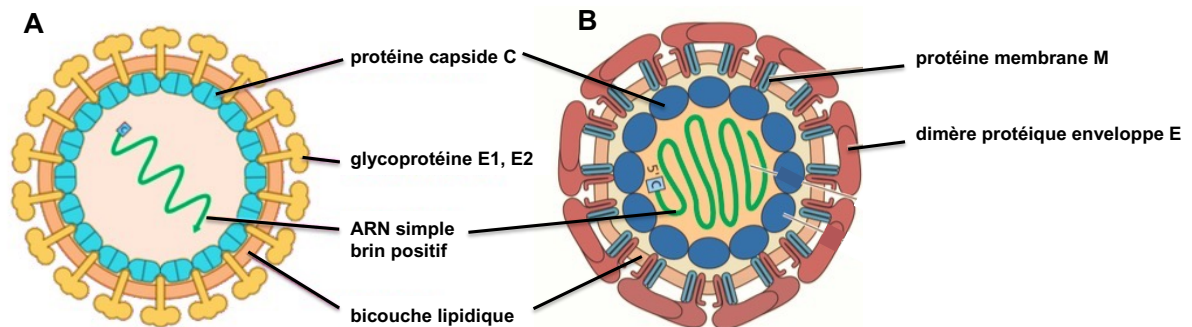
Le recours majeur pour protéger le corps de rayonnement dont les rayons gammas sont les antioxydants et ces études ont montré une protection intestinale efficace par l'association des vitamines A, C et E. De nombreuses études ont montré la capacité de micronutriments dont la curcumine à protéger l'organisme suite à l'exposition à des rayons gammas [38].

Ce post-doctorat dans ce laboratoire américain m'a permis de m'affirmer en tant que responsable de projet dans une équipe mixte provenant de la collaboration de deux départements de recherche de physiologie et de radiologie de l'Université de Médecine et d'Odontologie du New Jersey. Outre les compétences scientifiques que j'ai acquises notamment en expérimentation animale, j'ai pris la mesure de l'importance du travail en équipe pour l'avancée des recherches à mener dans la réalisation d'un projet.

## IV. Pathophysiologie cellulaire lors du processus infectieux

Dès mon recrutement en tant que MCU, j'ai inscrit ma recherche dans la thématique générale du laboratoire d'accueil 'les maladies infectieuses' créée en réponse à l'épidémie du Chikungunya de 2005; cette dernière ayant fait prendre conscience de l'importance de développer une recherche réunionnaise sur les pathogènes émergents de la zone OI [39]. Les maladies infectieuses présentes dans le bassin du sud-ouest de l'océan Indien et notamment l'île de la Réunion sont une des causes de mortalité humaine dans cette zone [40]. Récemment du fait de l'évolution de plusieurs facteurs notamment environnementaux et humains, la présence de maladies infectieuses humaines se traduit par la réémergence de pathologies anciennes, l'émergence de nouveaux pathogènes et leur persistance dans le monde [41]. Parmi elles, les maladies vectorielles transmises par les insectes sont bien représentées car actuellement responsables de la transmission à l'homme de nombreux pathogènes dont **les arbovirus** (arthropodes born virus) comme

**les alphavirus** dont les virus Sindbis, Chikungunya et de la vallée du Rift (Figure 10A) et **les flavivirus** dont les virus Zika et Dengue (Figure 10B) et en particulier dans les zones tropicales.



**Figure 10.** Schéma (A) d'un alphavirus, (B) d'un flavivirus [42][43].

Du fait de mes recherches antérieures sur les facteurs exogènes et leurs implications dans la physiologie cellulaire, j'ai axé dans un premier temps mes travaux sur un système cellulaire d'infection arbovirale, l'alphavirus Sindbis, pour étudier l'impact d'un facteur exogène de type métallique le cadmium. Mes recherches se sont tournées ensuite sur la pathogénicité du virus émergent Zika, souche du Polynésie Française de 2013.

### 1. Objet et finalités du travail de recherche

Les pathogènes de l'homme que sont les virus sont doués d'une grande plasticité génétique générant une grande variété de souches dont certaines sont responsables d'infections épidémiques [44]. L'environnement et les xénobiotiques qui le composent sont à prendre en considération dans l'évolution de ces pathologies dont les maladies infectieuses comme celles qui sont transmises par un vecteur arthropode de type moustique au contact de l'Homme. En effet l'environnement va avoir un impact sur les infections humaines. J'ai axé mes recherches sur les pathogènes viraux Sindbis et Zika pouvant émerger dans la zone OI afin d'étendre les connaissances sur leur pathogénicité.

### 2. Intérêt scientifique

Étudier les souches virales qui circulent actuellement dans le monde et en particulier dans la zone subtropicale permet d'accroître les connaissances sur leur fonctionnement et leur mode d'action afin de trouver des moyens de lutte efficace contre ces pathogènes. En utilisant comme sujet d'étude les pathogènes, l'évolution environnementale doit être prise en considération comme la présence croissante des contaminants comme les métaux lourds (le cadmium, le mercure et le plomb) se trouvant au contact de l'Homme [45].

### 3. Programme de travail et méthodes employées

L'objectif a donc été de mettre en place des systèmes d'étude permettant de se trouver dans un contexte de coprésence de xénobiotiques présents dans l'environnement et

proche de l'homme : les produits toxiques et des pathogènes. Les analyses des infections virales se sont faites *via* l'utilisation de modèles cellulaires développés en laboratoire.

#### a. Les sujets d'étude

L'homme est au contact de métaux retrouvés concentrés initialement dans du matériel issu de l'industrie, comme **le cadmium** qui est présent dans les batteries notamment, et qui se retrouvent dans les sols, les eaux et donc à terme dans l'alimentation [45]. Pour l'étude portant sur l'impact de facteurs environnementaux sur l'infection virale : le cadmium a été délivré sous la forme de chlorure de Cadmium.

Les éléments pathogènes ont été de deux origines : soit isolés d'individus infectés, de vecteurs arthropodes (**virus**), soit produits en laboratoire (**clones viraux**). Dans ce dernier cas, l'objectif a été de disposer d'un produit standardisé mais strictement de même nature que l'élément dit 'naturel'. Suivant la question de recherche à investiguer l'utilisation de l'une ou de l'autre technique d'obtention des éléments pathogènes a été privilégiée.

#### b. Les modèles d'étude

La détermination de l'impact cellulaire des pathogènes a été investigué par culture de lignée cellulaire humaine afin de reproduire une infection virale *in vitro*. Le choix des types cellulaires utilisés s'est fait en fonction des qualités de permissivité virale et/ou suivant l'origine tissulaire naturellement infectée par le virus étudié.

#### c. Les moyens de détection de la pathogénicité

Pour suivre l'infection des marqueurs spécifiques ont été choisis comme outils de détection. Le suivi des infections cellulaires virales s'est fait par marquage direct des particules virales par immunocytochimie, par détection de l'ARN viral au moyen de la PCR. La quantification du nombre de virus relargués dans le surnageant de culture est réalisé par la technique PFU (plaque forming unit) qui consiste à déterminer le nombre de particules virales infectieuses par unité de volume sur un tapis cellulaire homogène en comptant le nombre de plaques virales formées. Une plaque correspond à l'absence de cellules du fait de leur mort après infection par un seul virus dont la progénie s'est propagées aux cellules voisines.

L'étude de la pathogénicité s'est faite par l'analyse de marqueurs spécifiques au niveau cellulaire principalement que sont les cytokines pour l'immunité innée, le stress oxydant et les molécules antioxydantes ainsi que les marqueurs moléculaires de mort.

### 4. Principaux résultats

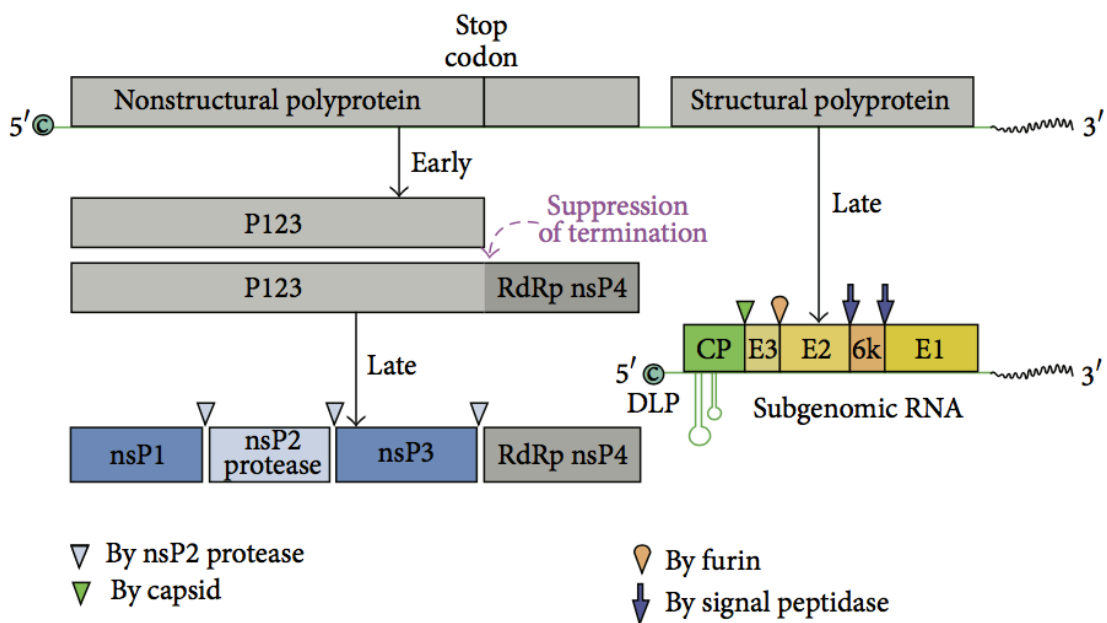
#### a. Implication de métaux exogènes lors d'une infection par un alphavirus

Comme modulateur d'infection, les facteurs exogènes sont en prendre en considération. Les facteurs environnementaux dont les xénobiotiques, peuvent influencer la propagation, la susceptibilité et le devenir d'une infection virale chez l'individu infecté

[46]. Parmi eux, le cadmium, métal toxique est connu pour moduler la résistance de l'hôte lors de nombreuses infections. J'ai mené avec le doctorant Etienne Frumence une étude sur un modèle cellulaire qui a eu pour visée de décrire les effets du cadmium lors de l'infection par l'arbovirus modèle : le Sindbis.

L'alphavirus Sindbis possède la distribution géographique la plus étendue à travers le monde dont l'océan Indien. C'est un des virus les plus étudié pour la caractérisation de la biologie des alphavirus. Parmi les alphavirus sont retrouvés notamment les virus du Chikungunya, de la forêt de Semiliki, de Barmah, Mayaro, encéphalite équine, de la Rivière Ross, O'nyong'nyong, ils ont une structure moléculaire commune (Figure 10 A).

Le virion des alphavirus, d'un diamètre de 70 nm, est composé en son centre d'un génome viral d'ARN simple brin positif d'environ 11000 nucléotides entouré d'une capsid composée de protéine virale C recouverte d'une bicouche lipidique, provenant du dernier hôte infecté, où sont enchâssées les protéines virales E1 et E2 (Figure 10 A et 11) [47]. Ces virus infectent les vertébrés dont les mammifères et les invertébrés dont le moustique créant un cycle de transmission entre ces 2 types d'hôtes. Au niveau cellulaire chez les mammifères, les alphavirus sont internalisés par endocytose puis désassemblés pour libérer les composants viraux afin que la cellule hôte produise d'autres virus qui seront exocytés.



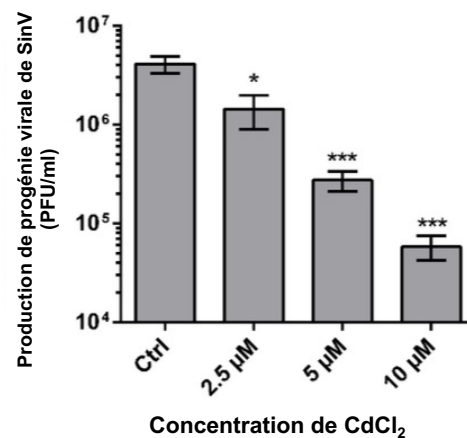
**Figure 11.** Le génome et les protéines des alphavirus. Les protéines non structurales (NSP) sont traduites à partir de l'ARN génomique et les protéines structurales (C, E3, E2, 6K et E1) à partir de l'ARN subgénomique. Seules les protéines C, E1 et E2 seront présentes dans le virion mature, dans certains cas E3 peut également être présente [48].

La phase d'incubation chez l'homme des alphavirus dure environ une semaine. Les néovirus répliqués vont alors se disséminer dans l'organisme pour préférentiellement se répliquer dans les tissus hépatique, musculaire, articulaire et lymphoïde et parfois au niveau cérébral. Les symptômes de ces infections chez l'homme se traduisent par des douleurs musculaires, articulaires, de la fièvre et des éruptions cutanées.

Les métaux pour certains composent des protéines cellulaire et virales mais certains métaux dits exogènes, tels que le cadmium, peuvent perturber l'homéostasie et le

fonctionnement de ces protéines. Les effets du Cadmium lors de l'infection par des alphavirus et des flavivirus ont été décrits dans des modèles cellulaires et murins. Certaines études démontrent qu'une faible dose de chlorure de cadmium réduit l'infection virale et augmente la survie cellulaire *in vitro* [49] et d'autres montrent que chez les souris l'infection est plus efficace en présence de cadmium [50][51].

Nos travaux ont montré que les cellules embryonnaires de reins humains HEK293T infectées par le virus Sindbis ont un déclenchement de l'apoptose diminuée en présence de doses non toxique de chlorure de cadmium [52]. Il semble que le cadmium protège les cellules des effets cytopathiques induit par le SINV. De façon intéressante, le prétraitement des cellules avec du cadmium avant infection a permis de réduire davantage la réplication du virus (Figure 12). Ce phénomène pourrait s'apparenter à l'hormèse qui est une relation dose-réponse positive de la part d'une substance très toxique qui à faible dose ne l'ai plus ou différemment.



**Figure 12.** Production virale de cellules HEK 293T traitées pendant 24h avec diverses concentrations de CdCl<sub>2</sub> puis infectées par SINV avec une multiplicité d'infection (MOI) de 1 PFU/cellule. Les titres viraux ont été déterminés 24h post-infection [52]. Les résultats représentent les moyennes ( $\pm$  SEM) de 3 expériences indépendantes. Les valeurs statistiques sont indiquées

En conclusion, les perturbations environnementales susceptibles d'atteindre l'organisme humain comme la présence de métaux lourds peuvent être étudiées dans un système modèle simple qu'est l'infection virale d'une lignée cellulaire. Ces études sont à considérer pour comprendre les possibles modulations d'infections humaines dans des situations d'expositions avec des toxiques environnementaux.

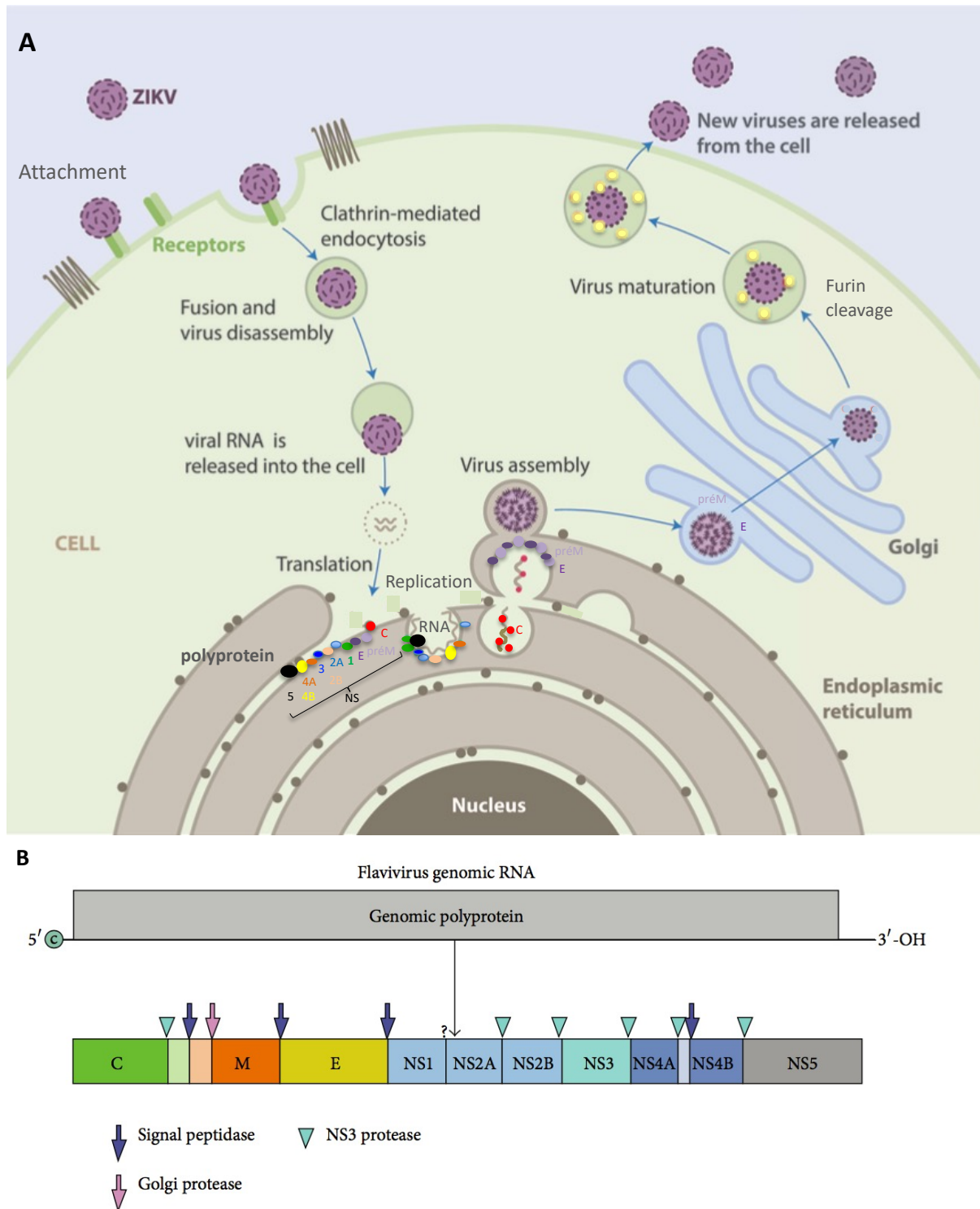
## b. Pathogénicité du virus émergent Zika

Une épidémie due au virus Zika a émergé en Polynésie Française dès 2013 puis au Brésil en 2014 de manière rapide et massive [53]. Bien que ce virus n'ait pas atteint le sud-ouest de l'océan Indien à ce jour, le risque potentiel d'une émergence dans la zone est bien réel. La transmission rapide de cet arbovirus du genre flavivirus représente une urgence de santé publique de portée mondiale. Mon équipe a fait alors le choix de consacrer ses recherches sur la pathogénicité virale du virus Zika grâce au projet FEDER Zikalert obtenu. Dans le cadre des travaux de thèse d'Etienne Frumence nous avons alors



focalisé nos efforts sur la caractérisation de la réponse cellulaire à l'infection par le flavivirus Zika.

Les virus de la Dengue, de la fièvre jaune, de l'encéphalite japonaise, du Nil occidental sont avec le virus Zika des flavivirus dont la structure est présentée dans la figure 10B. Ces virus, transmis principalement par les moustiques, ont un diamètre d'environ 50 nm contenant des protéines virales enchâssées dans la membrane lipidique issu de l'hôte qui recouvre une capsidie contenant le génome viral d'ARN simple brin positif (Figure 10B) [48]. L'entrée dans les cellules hôtes de mammifère se fait par attachement et endocytose. L'acidification de l'endosome entraîne la fusion des membranes cellulaire et virale permettant ainsi la libération du génome viral dans le cytoplasme suivi après son désassemblage d'une répllication de nombreux virus qui sont ensuite maturés puis libérés dans le milieu extracellulaire (Figure 13A). La traduction de l'ARN viral d'environ 11000 nucléotides donne une polyprotéine qui après protéolyse donne 3 protéines non structurales (C, E et M) et 7 protéines structurales (NS1 à NS5) (Figure 13B). La protéine C forme la capsidie qui contient l'ARN viral entouré des protéines E et M enchassées dans une bicouche lipidique. Les protéines non structurales font toutes parties du complexe répllicationnel dans une vacuole du RER.

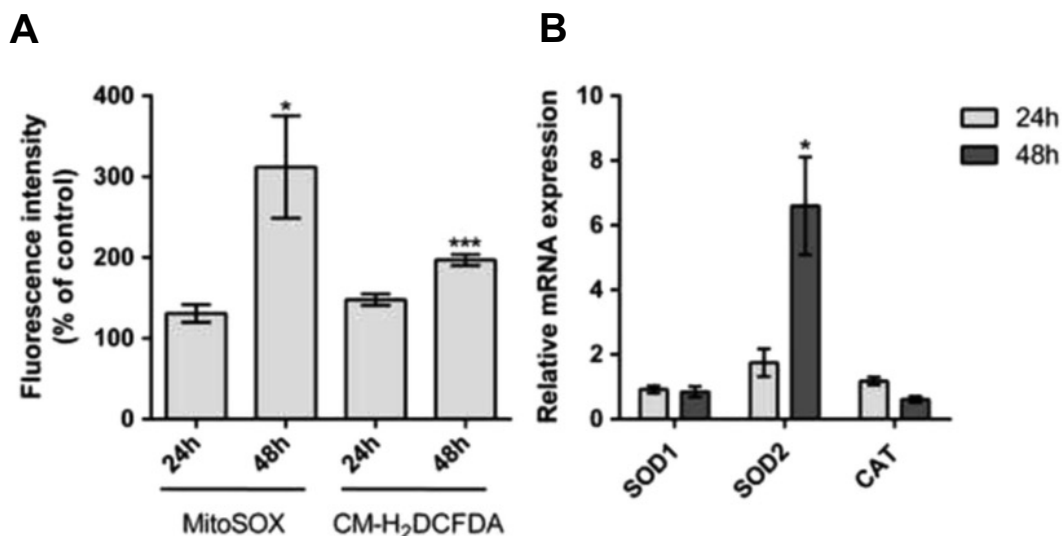


**Figure 13.** Le cycle de répliation (A), le génome et la polyprotéine (B) des flavivirus. La polyprotéine après protéolyse aboutit 3 protéines structurales (C, M et E) et 7 protéines non structurales NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, 5) [54].

Le virus Zika s'est propagé dans la zone tropicale et sub-tropicale du globe et provoque chez l'Homme, après une période d'incubation pouvant aller jusqu'à 2 semaines, une fièvre, des douleurs musculaires, des douleurs rétro-orbitaires, des éruptions cutanées et une asthénie. La transmission se fait généralement selon un cycle

homme/moustique type *Aedes* et des études ont révélées des transmissions interhumaines [55][56]. De manière catastrophique, l'infection d'une femme enceinte par le virus peut impacter le développement cérébral de l'enfant pouvant provoquer des désordres assez important pouvant aller jusqu'à une microcéphalie sévère [57].

Notre étude a eu pour intérêt de caractériser le comportement de cette souche émergente. Nous avons montré que l'infection de la lignée cellulaire épithéliale humaine A549 par le virus Zika (souche PF-25013-18) induit l'activation de gènes de facteurs de transcription impliqués dans la régulation des interférons IRF (interferon regulatory factor) comme IRF3 et IRF7 et de type ISG qui sont exprimés en réponse aux interférons de la famille IFIT (interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats) comme ISG56/IFIT1 et ISG54/IFIT2 (IFN stimulated-gene/IFN induced proteins with tetratricopeptide repeats). Les cellules semblent donc être capable de mettre en place une immunité innée antivirale basée sur la voie interféron. Des interleukines pro-inflammatoires ont été produites à l'issue de cette infection dont les IL1 $\beta$ , IL6 et IL8 ceci 24 à 48h après infection. La production d'interféron béta (IFN $\beta$ ) augmente jusqu'à 48h après infection. Un ajout préventif d'IFN $\beta$  aux cellules avant infection a permis de réduire la réplication virale et de retarder l'initiation de l'apoptose visualisée par réduction de la caspase-3 clivée. Les cellules infectées ont présenté dès 24h des caspases 9 clivées signifiant une perméabilisation des mitochondries. L'infection virale a généré chez les cellules A549 une hausse de l'état oxydatif cellulaire (Figure 14A) engendrant une activation des enzymes antioxydantes dont la SOD2 superoxyde dismutase 2 mitochondriale (Figure 14B).



**Figure 14.** État oxydatif intracellulaire et expression de l'ARNm d'enzymes antioxydantes des cellules A549 en réponse à une infection par le virus Zika (MOI 5). (A) Pourcentage de fluorescence correspondant à la présence intracellulaire et mitochondriale de ROS avec l'utilisation de sondes DCFH<sub>2</sub>DA et mitoSOX respectivement et détectées par cytométrie de flux pour des cellules infectées avec ZIKV vs cellules non infectées (contrôles). (B) Expression des ARNm de la SOD1, SOD2 et catalase normalisée avec l'ARNm de la GAPDH par quantification par RT-qPCR pour des cellules infectées avec ZIKV vs cellules non infectées (contrôles) [58]. Chaque valeur est le résultat de 3 expériences indépendantes faites en triplicats.

En conclusion, nous avons montré que l'infection des cellules A549 par le virus Zika provoque un stress oxydant et la mise en place de l'apoptose [58]. L'IFN $\beta$  est une molécule majeure de lutte contre l'infection par son expression cellulaire précoce ce qui provoque

un effet retard sur le processus d'apoptose. Est-ce un moyen du virus pour prolonger la survie des cellules infectées ? L'équipe a continué ses recherches en ce sens.

## 5. Conclusion

Ces recherches dans le domaine infectieux m'ont permis de m'affirmer en tant que chercheuse en virologie. Ces acquis m'ont servi pour mener une investigation poussée dans le domaine des protéines virales que je vous présente ci-dessous.

## D. Travaux de recherche récents

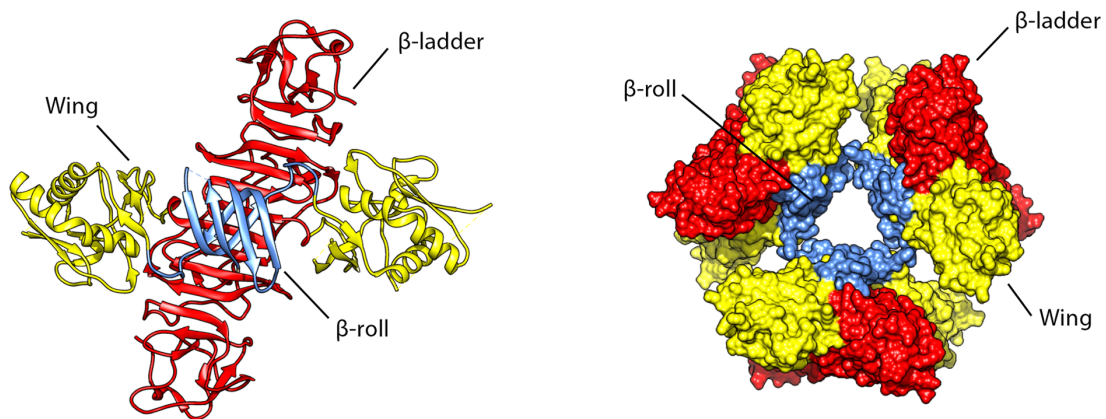
Mes recherches se sont tournées ensuite rapidement sur **la protéine virale NS1** de ZIKA pour étudier son rôle physiopathologique lors de l'infection humaine. Je suis actuellement en train de déployer ces connaissances acquises sur l'étude de la NS1 du virus épidémique de la Dengue, souche cosmopolitaine de type 2, isolé d'un patient réunionnais en 2018.

J'ai participer en parallèle à une recherche sur l'évaluation de la pathogénicité de plusieurs souches de leptospires issues de la faune sauvage de l'océan indien. Dans la région et notamment à la Réunion **la spirochète leptospire**, transmise majoritairement par les rats, est également présente et les symptômes chez l'homme peuvent s'apparenter aux arboviroses ce qui complique le diagnostic de ces maladies infectieuses [59].

J'ai donc axé mes recherches sur les pathogènes présents dans la ZOI (Leptospire, Dengue) ou pouvant y émerger (Zika).

### I. La protéine virale NS1 des flavivirus

Chez l'homme, la réplication des flavivirus aboutie à la formation d'une polyprotéine qui après protéolyse donne 3 protéines structurales (prM, C, E) et 7 protéines non structurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b et NS5) (Figure 13B). Dans la cellule hôte, chacune de ces protéines a un rôle essentiel au niveau de la réplication virale et/ou de la pathogenèse virale [60]. La protéine non structurale 1 (NS1) présente la particularité d'être présente sous deux formes actives le dimère et l'hexamère (Figure 15) [61]. Elle est produite sous la forme de monomère de 352 acides aminés, N-glycosylé sur deux sites, elle se dimérise et se localise à la face cytosolique du réticulum endoplasmique pour faire partie du complexe de réplication qui synthétise les néo-ARN viraux [62]. La NS1 dimérique favorise également l'assemblage, la maturation et la libération des particules virales [61]. Certains dimères sont exposés à la membrane après association à des lipides, le rôle précis due à cette localisation au niveau des cellules infectées n'est pas connu [63]. De plus trois dimères lipidés ont la capacité dans le réticulum endoplasmique de s'associer pour former une particule hexamérique contenant un cœur hydrophobe composé d'environ 70 lipides [64]. Ces NS1 hexamériques sont sécrétées hors de la cellule.



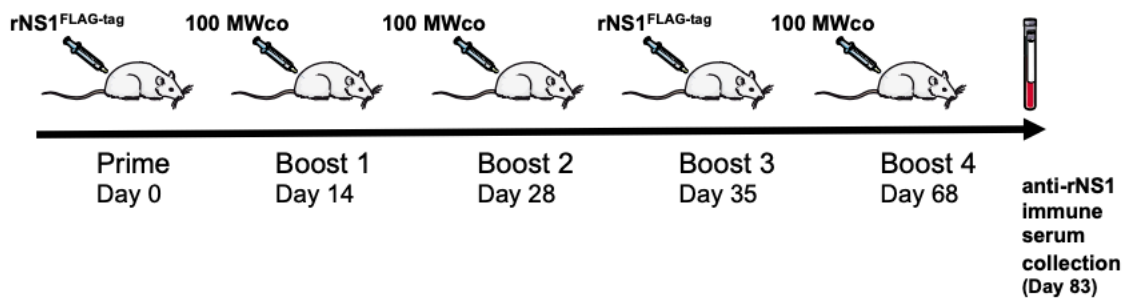
**Figure 15.** Structure 3D du dimère et de l'hexamère de la NS1 de DENV. A gauche le dimère est composé de deux monomères comportant chacun 3 domaines nommés wing en jaune,  $\beta$ -ladder en rouge et  $\beta$ -roll en bleu. A droite l'hexamère composé de 3 dimères avec au centre une zone accueillant des lipides formant le cœur hydrophobe [61].

De par sa sécrétion, l'hexamère de NS1 soluble se trouve dans le sang à hauteur chez l'Homme de 1 à 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lors d'infection par DENV et de 30  $\text{ng}/\text{mL}$  lors d'infection par ZIKV et ceci pendant 2 à 8 jours après déclaration des symptômes. Des études ont montré que la concentration de la protéine NS1 dans le sérum humain au cours de l'infection par DENV est corrélée au degré de sévérité de la maladie développée comme la dengue hémorragique [65][66]. Une étude clinique a rapporté que le niveau sérique de NS1 est corrélé à la virémie mais qu'à *contrario* un faible niveau de NS1 est associé aux formes très sévères (dengue hémorragique et syndrome de choc) [67]. Une étude sur le modèle souris a montré que le niveau sérique de NS1 ne corrèle ni avec la virémie et est plutôt souche dépendante et ni avec la sévérité de la maladie [68]. La NS1 soluble étant antigénique, l'organisme infecté produit également des anticorps anti-NS1 et ces éléments protéine virale et anticorps ont tous les deux une action physiopathologique. En effet dans le sang de patients infectés, la NS1 et les anticorps correspondants interagissent avec différents facteurs et cellules présents dans la circulation générant une perturbation de la physiologie sanguine [69].

Des études ont permis d'identifier NS1 comme étant un antigène de fixation du complément, composant majeur de l'immunité innée [70]. La dengue hémorragique se caractérise par la perturbation de l'intégrité de la couche de cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, ce qui entraîne une hémorragie. Or suite à l'activation de la voie du complément par la protéine NS1, il y a production de facteurs inflammatoires qui peuvent entraîner des lésions endothéliales, engendrant des fuite plasmatiques et facilitant la propagation du virus [71]. Les lésions endothéliales sont facilitées par la NS1 qui est responsable de l'altération du glycocalyx [72]. La protéine NS1 possède également des épitopes communs avec les plaquettes humaines et des protéines de surface des cellules endothéliales [73]. Ce mimétisme moléculaire permet aux anticorps anti-NS1 de se lier aux plaquettes et ainsi d'inhiber leur agrégation, diminuant la coagulation et donc augmentant les saignements. Ces anticorps anti-NS1 peuvent également se lier aux protéines de surface des cellules endothéliales provoquant des lésions de l'endothélium et des fuites plasmatiques [69]. Il a été montré que la NS1 amène à une libération de

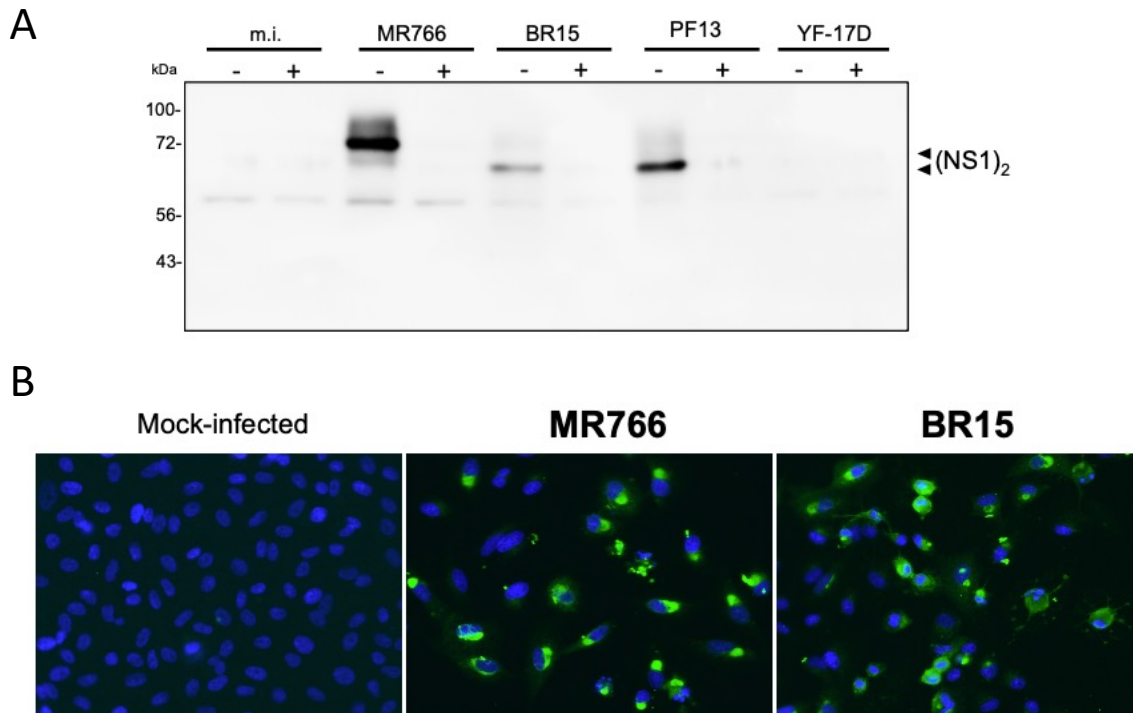
cytokines inflammatoires par les monocytes notamment l'interleukine 10 [74]. A ce titre certains auteurs qualifient la NS1 de toxine virale.

Tout d'abord j'ai mené avec mes collègues et des chercheurs de l'Institut Pasteur, une étape assez conséquente de production de la protéine NS1 recombinante de Zika à partir de la transduction de cellules Vero avec un lentivirus (IP Paris) et de la transfection par plasmide pcDNA3 de cellules HEK-293T (UMR PIMIT). Dans les deux cas les surnageants de culture ont été purifiés pour obtenir une rNS1 glycosylée concentrée afin de donner lieu à une autre étape biotechnologique qui a consisté produire des anticorps anti-NS1 par des rats (Figure 16) [75].



**Figure 16.** Déroulé de l'immunisation des rats avec la protéine recombinante NS1 ZIKV obtenue. Les rats Wistar femelle adulte ont été immunisés avec la rNS1<sup>FLAG-tag</sup> purifiée. Après la première injection, les animaux ont été boostés trois fois par injection avec de la rNS1 concentrée issue d'une fraction de 100 MWco de surnageants de cellules Vero/ZIKV.NS1. Une seconde inoculation de la rNS1<sup>FLAG-tag</sup> purifiée a été faite au 35<sup>ème</sup> jour. Le sang total a été collecté au 83<sup>ème</sup> jour après la première immunisation [75].

Le sérum immun de rat obtenu a été testé pour sa capacité à reconnaître la NS1. Des tests d'immunoblot et immunofluorescence ont montré une très bonne réactivité entre le sérum immun de rat et la NS1 détectée dans des cellules humaines. Les immunoblots des lysats des cellules Vero infectées avec les souches de ZIKV MR766, BR15 et PF13 ont révélés des dimères de NS1 avec des migrations légèrement différentes du fait de la variation des souches (Figure 17A). Ce sérum ne détecte pas les monomères car il reconnaît plutôt un épitope conformationnel de la protéine quand elle est dimérique. Cela est dû au fait de l'immunisation des rats s'est faite avec de la protéine recombinante NS1 issue du surnageant de culture qui contient la forme sécrétée hexamérique issue de l'association de 3 dimères. Le sérum immun est également capable de détecter par immunofluorescence la NS1 produite après infection de cellules A549 avec les souches de ZIKV MR766 et BR15 (Figure 17B). Notre protocole de production de rNS1 et d'anticorps a eu pour objectif d'être au plus près de la structure de la NS1 hexamérique dans le sang pour augmenter la sensibilité de détection et envisager des tests discriminants entre souche et entre flavivirus.



**Figure 17.** Réactivité du sérum immun de rat anti-rNS1 contre la protéine NS1 ZIKV synthétisée par des cellules humaines. (A) Immunoblot sur des lysats de cellules Vero infectées avec les souches de ZIKV MR766, BR15, PF-25013-18 (PF13) ou le vaccin atténué YFV 17D (YF-17D) dénaturés (+) ou non (-) à la chaleur (95°C, 10min) avant analyse avec le sérum immun de rat à la dilution de 1 :1000. Les flèches indiquent la position du dimère de NS1. Le poids moléculaire (MW) des marqueurs de taille des protéines est indiqué à gauche de la membrane (B) immunofluorescence sur des cellules A549 infectées 48h avec ZIKV MR766 et BR15 ou non infectées. Les cellules ont été perméabilisées avec un détergeant non ionique et ensuite incubées avec le sérum immun de rat à la dilution de 1 :2000. Grossissement x400 [75].

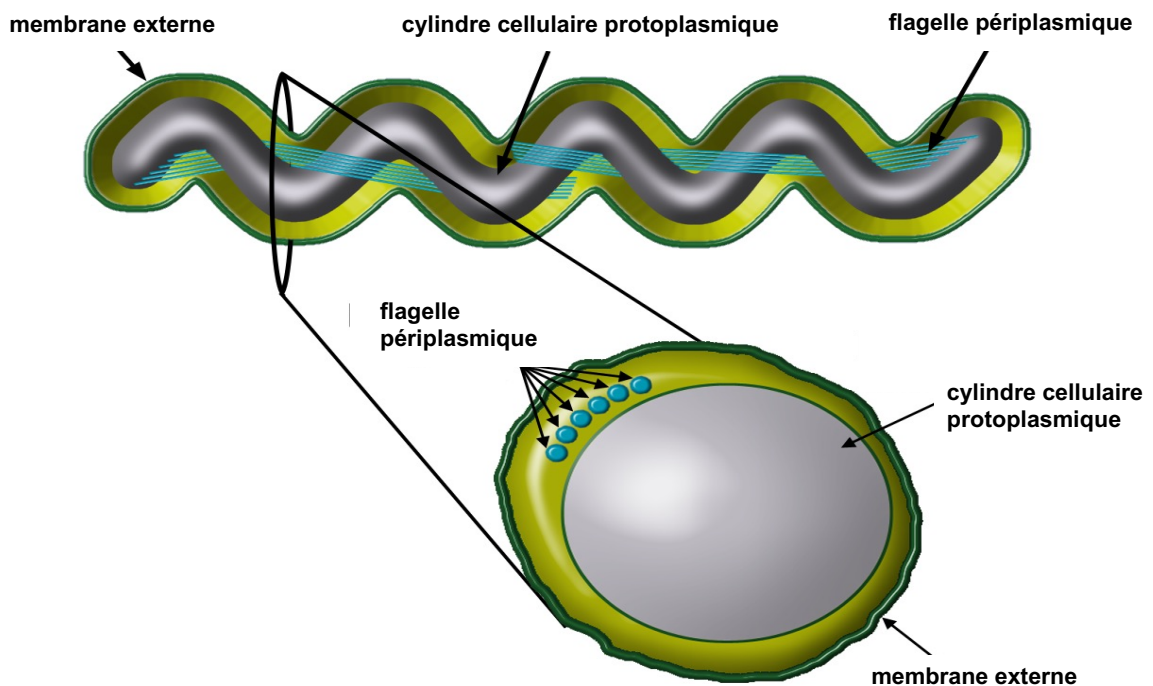
Concernant sa structure, les protéines NS1 de ZIKV et des quatre sérotypes de la DENV sont homologues à 70% au niveau de leur enchainement en acides aminés du fait de la présence de nombreuses régions conservées [76]. Tous les hexamères de NS1 des flavivirus ont un canal central hydrophobe qui héberge 70 lipides ce qui leur confère le statut de lipoprotéine. De ce fait nous pouvons supposer que l'hexamère de NS1 est un ligand de choix pour les hépatocytes du foie, organe clé du catabolisme des lipides. Une particularité intéressante des lipides associés à la NS1 hexamérique est qu'ils présentent de grandes similitudes avec ceux contenus dans les lipoprotéines de haute densité (HDL) impliquées dans le transport du cholestérol et l'homéostasie vasculaire. La forme hexamérique de la NS1 est ainsi considérée comme une lipoprotéine [64].

Depuis 2018, Les îles du sud-ouest de l'océan Indien sont confrontées à une épidémie de Dengue. Le sérotype de DENV-2 a été le premier à se répandre dans la population réunionnaise, il était d'ailleurs le seul présent en 2018 [77]. Nous avons à l'UMR PIMIT isolé et séquencé le génome de DENV-2 à partir d'individus infectés de l'île de la Réunion [78][79]. Le mécanisme exact et le mode de dissémination de DENV dans les différents tissus et organes n'est pas compris avec précision. Le tropisme de DENV concerne en particulier les cellules de la peau, les monocytes et les hépatocytes. Le foie est un haut lieu métabolique, il est le carrefour notamment du métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Or comme l'hexamère de NS1 est une lipoprotéine-like, le foie devient un organe cible d'intérêt pour étudier l'impact cellulaire de la NS1. Je me suis donc penchée,

dans le cadre d'un projet de thèse, sur l'étude de la NS1 DENV-2 souche réunionnaise dans des lignées d'hépatocytes humains Huh7. Une première étude biochimique a permis de distinguer deux acides aminés de la séquence de NS1 DENV-2 de la souche réunionnaise qui diminuent la production et la sécrétion de la protéine par les cellules Huh7 [80]. Nous nous penchons à présent sur l'effet de cette rNS1-2 soluble issue de Huh7 transfectées sur les cellules vasculaires connues pour être affectées par cette protéine virale. La NS1 DENV-2 réunionnaise semble être produite en faible quantité et nous voulons tester si cela conditionne sa pathogénicité. Une étude clinique montre que la NS1 induit la perte d'intégrité de l'endothélium microvasculaire indépendamment de la dose présente [81]. Je ne décris pas plus cette partie car cela sera fait en fin d'année lors de la soutenance de thèse de la doctorante E.

## II. Pathogénicité des leptospires

La leptospirose est une zoonose bactérienne négligée et ré-émergente qui atteint un million de personnes par an et provoque environ 60000 décès dans le monde [82]. Les îles tropicales de l'ouest de l'Océan Indien reportent la plus grande incidence mondiale de leptospirose. La bactérie responsable de cette pathologie est de l'ordre des spirochètes du genre *Leptospira*, elle se retrouve libérée dans l'environnement par les animaux réservoirs *via* leurs urines (Figure 18) [83]. Les infections humaines sont généralement le fait de contaminations indirectes *via* une source environnementale contaminée le plus souvent de l'eau. La plupart du temps chez les humains, l'infection est asymptomatique, dans le cas contraire elle provoque de la fièvre, des maux de tête, des vomissements ou des symptômes plus sévères comme une hémorragie pulmonaire, une altération du foie et des reins [84].



**Figure 18.** Schéma d'une leptospire [43].

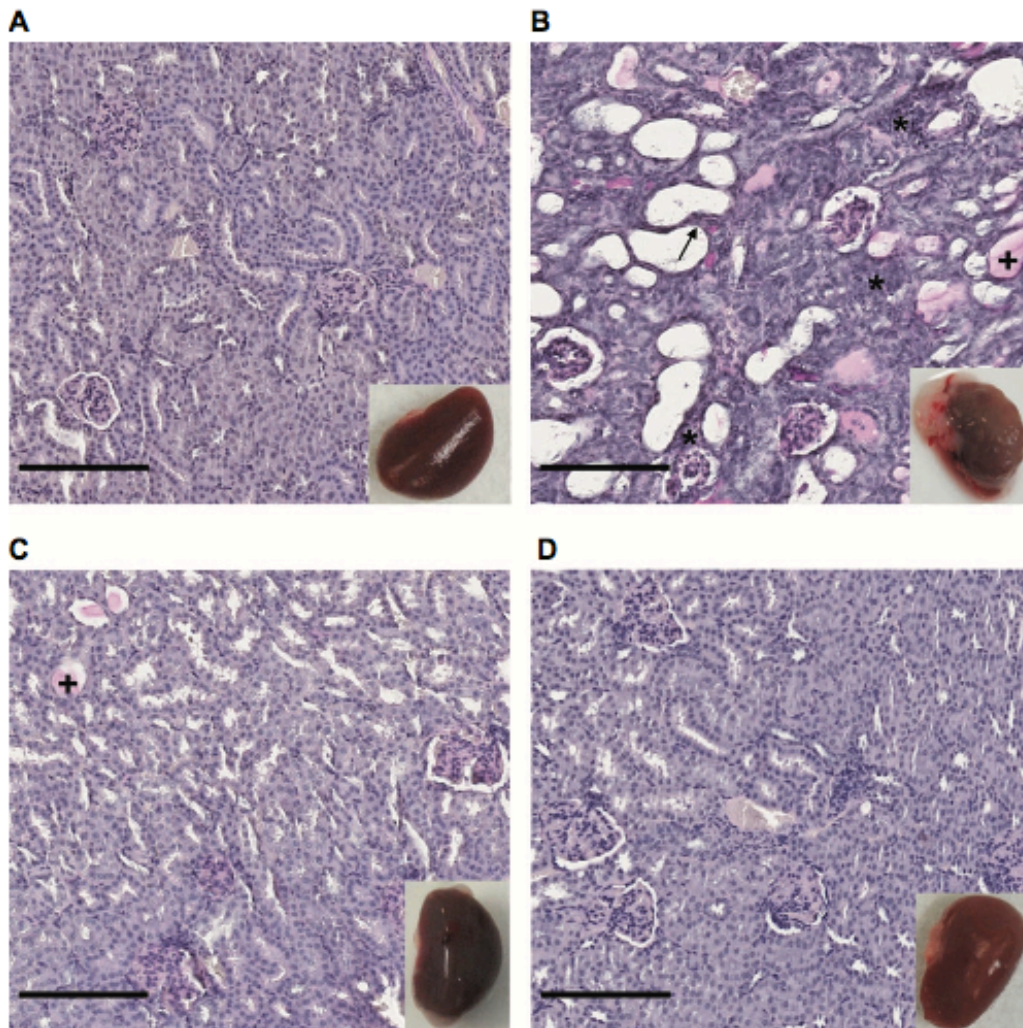


La plupart des espèces de mammifères sont infectés par les leptospires mais peu agissent comme des réservoirs. Les réservoirs sont des mammifères terrestres et volants comme le rat, la chauve-souris et le tenrec ainsi que les chats et les chiens et même le bétail [85]. Ces animaux réservoirs infectés conservent une colonisation durable dans les reins où les bactéries y logent en générant des biofilms [86]. Les individus infectés disséminent alors les bactéries dans l'environnement *via* les urines.

A la Réunion la plupart des cas humains de leptospirose est due à *L. interrogans* dont les séquences types (ST) sont similaires à celles retrouvées partout dans le monde [85]. Par contre à Mayotte les cas humains proviennent d'espèces ayant des ST originales appartenant à *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, et *L. mayottensis* [87]. De manière intéressante, la sévérité de la maladie diffère dans les deux îles, avec 4,6% d'admission en soins intensifs et 0,7% de mortalité à Mayotte contre 30% d'admission en soin intensifs et 5% de mortalité à la Réunion [88].

Afin de mieux connaître la virulence et les mécanismes responsables de la spécificité d'hôte des différentes souches de leptospires circulants dans les îles de l'ouest de l'Océan Indien nous avons mené des études expérimentales sur petits rongeurs. Pour cela nous avons testés trois isolats de leptospires issus de la faune sauvage : ***L. interrogans*** d'un rat à la Réunion avec un ST associé à la majorité de cas humains aigus sur le territoire, ***L. Mayottensis*** d'un tenrec de Mayotte avec un ST reporté dans plusieurs cas humains aigus sur l'île et ***L. borgpetersenii*** isolé d'une chauve-souris à Madagascar non connue dans des cas humains.

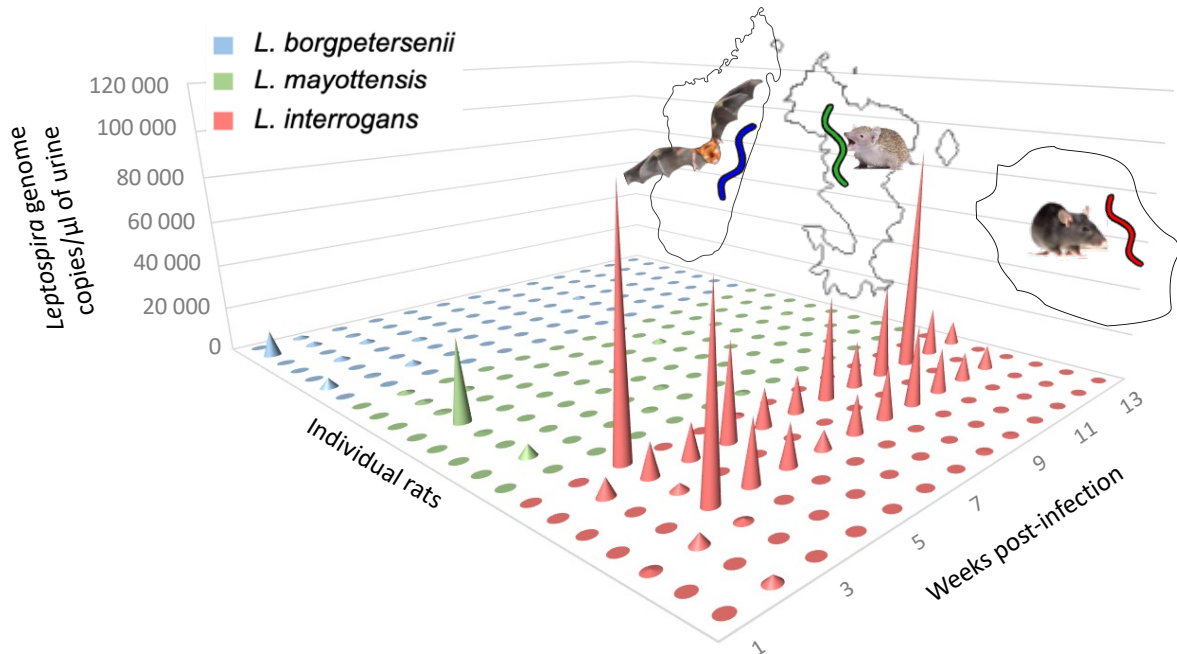
L'étude de la **virulence** s'est faite par l'inoculation de ces 3 souches de leptospires à des hamsters dorés de Syrie car ils présentent l'avantage d'être un modèle d'infection aigue [89]. Les hamsters ont été inoculés avec  $2.10^8$  bactéries puis suivis sur un mois pendant lequel s'est fait le prélèvement des urines et après sacrifice la récupération des organes. Dès le 7<sup>ème</sup> jour post-inoculation et ce jusqu'à la fin, une mortalité est constatée seulement chez le groupe de hamsters infectés avec *L. interrogans*. Le plus fort taux d'ADN bactérien a été retrouvé dans les urines et les organes (cerveau, reins, foie, poumons et rate) des hamsters infectés avec *L. interrogans*. Les isolats de *L. mayottensis* et *L. borgpetersenii* n'ont eux que faiblement disséminé dans l'organisme des hamsters. En parallèle l'histochimie des organes montrent des altérations prononcées des reins et des poumons des hamsters infectés avec *L. interrogans* alors que n'est pas le cas pour les deux autres isolats (Figure 19). Nous pouvons conclure que les souches de leptospires hébergés par des animaux endémiques des système insulaire (*L. mayottensis* et *L. borgpetersenii*) sont moins pathogènes que la *L. interrogans* isolée chez le rat. Ces résultats permettent d'apporter des précisions sur l'épidémiologie contrastée observée dans les cas de leptospiroses humaines aigues des îles de l'ouest de l'Océan Indien.



**Figure 19.** Structure de reins d'hamsters non infectées (contrôle) et infectés. Observations microscopiques de coupes de reins colorés à l'acide périodique et au réactif de Schiff obtenues à partir d'animaux contrôles (A) et d'animaux infectés avec *L. interrogans* (B), *L. mayottensis* (C) ou *L. borgpetersenii* (D) 4 semaines après infection intra-péritonéale de  $1,5$  à  $3 \times 10^8$  leptospires dans  $500 \mu\text{l}$  de PBS1X. Les observations macroscopiques des reins sont montrées dans les inserts [89]. Ces résultats sont représentatifs des répétitions menées avec plusieurs rats infectés.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de **spécificité d'hôte** nous avons mené une seconde étude en inoculant les mêmes leptospires à des rats de type *Rattus norvegicus* connus comme étant un réservoir naturel et un bon modèle expérimental pour étudier les infections chroniques [90]. Aucune mortalité n'a été enregistré sur les trois mois de l'expérience quel que soit le groupe de rats inoculés. Les isolats de *L. borgpetersenii* (issue d'une chauve-souris) et *L. mayottensis* (issue d'un tenrec) n'ont pas provoqué de colonisation rénale car aucune culture de bactérie vivante n'a pu être obtenue des urines bien qu'il y ait eu une petite détection d'ADN dans les reins de manière très sporadique dans certains cas. Par contre, deux des 7 rats infectés avec *L. interrogans* (issue d'un rat) ont développés une colonisation rénale et une forte libération de bactéries dans les urines et ceci durant les 3 mois après l'infection (Figure 20). Prises globalement ces données montrent que les leptospires isolées des mammifères sauvages endémiques de la région de l'ouest de l'Océan Indien, à savoir les chauves-souris et les tenrecs, ne sont pas capables de coloniser les reins des rates. Cela relate d'une spécificité d'hôte entre une espèce de leptospire et un mammifère endémique. Cette spécificité est certainement en lien avec la

génétique de l'hôte ainsi qu'avec des facteurs écologiques. Il y a probablement des déterminants génétiques et des caractéristiques biologiques des leptospires qui pourraient expliquer pourquoi *L. mayottensis* et *L. borgpetersenii* ont un comportement de dissémination ralenti chez une autre espèce en l'occurrence ici le rat par rapport à leur réservoir naturel respectivement le tenrec et la chauve-souris.



**Figure 20.** Libération urinaire de *Leptospira* de rats infectés en i.p.  $1,5 \times 10^8$  dans 500  $\mu$ l de PBS1X avec *L. interrogans* (rouge), *L. mayottensis* (vert) ou *L. borgpetersenii* (bleu). Les résultats sont exprimés pour chaque individu en nombre de copies de génome de leptospire par  $\mu$ l d'urine [90].

### III. Conclusion

Ainsi les différents projets de recherche exposés ci-dessus ont eu pour but d'investiguer la virulence des souches de leptospires des îles de la zone et des souches arbovirales présents dans le monde. La pathogénicité a été évaluée sur un plan moléculaire au niveau des systèmes tissulaire et cellulaire. Les connaissances acquises sur ces pathogènes dans ces études a eu pour but d'aider à l'orientation de futurs travaux de recherche pour des traitements adaptés.

La zone de l'ouest de l'Océan Indien de localisation sub-tropicale est le lieu d'émergence et de réémergence propice à un bon nombre de maladies vectorielles et d'anthropozoonoses transmises respectivement par les insectes et les mammifères à l'Homme [91]. Les îles de la région sont fortement impactées par les infections transmises par les moustiques du genre *aedes* et la leptospirose et ceci pendant la saison chaude et humide. Or les symptômes dues aux infections par les leptospires et les arbovirus comme les virus Chikungunya, Zika et Dengue présentent des similarités et le diagnostic est difficile à établir [59][92][93]. La caractérisation des pathogènes de l'homme circulant dans la zone de l'ouest de l'Océan Indien constitue donc un intérêt majeur pour la gestion de ces maladies infectieuses. Il est également intéressant de pouvoir les discriminer rapidement au moyen de tests diagnostic

rapides. La protéine virale NS1 des flavivirus est un marqueur de choix pour évaluer la présence d'une infection par les amphavirus et mérite des études supplémentaires.

## E. Projet de Recherche DENGUE-SWIO, physiopathologie de la protéine NS1

Forte de tous ces acquis que j'ai présenté et des problématiques infectieuses du territoire réunionnais et de la zone OI, je propose un projet de recherche sur le thème des maladies émergentes. Je vais focaliser mes recherches en étant ancrée encore plus fortement sur la problématique de santé des îles de l'OI. Depuis 2018 une émergence massive de la Dengue a eu lieu et est toujours en cours en 2021. L'île de la Réunion présente un fort taux d'infection par les différents sérotypes de dengue qui circulent (DENV-1, 2 et 3). Le territoire enregistre en outre une forte prévalence pour des désordres de type métabolique pouvant aboutir à des pathologies graves comme le diabète. Le projet de recherche que je propose se positionne dans le relationnel entre les maladies infectieuses et les maladies métaboliques.

### I. Intégration du projet de recherche DENGUE-SWIO dans l'UMR PIMIT

Le projet DENGUE-SWIO que je propose s'inscrit totalement dans les priorités de recherche de l'UMR PIMIT qui a pour mission d'étudier notamment les arboviroses émergentes ou présentant un risque de propagation dans le sud-ouest de l'Océan Indien. Depuis sa création en 2015, PIMIT s'intéresse aux virus transmis par les moustiques dont le virus émergent Zika (ZIKV) qui est apparenté au virus de la dengue (DENV). Mes collègues et moi-même avons concentré nos efforts sur la caractérisation moléculaire de ZIKV, les interactions hôte-pathogène, la production d'outils de détection et le développement de candidats vaccins. Les projets menés sur ZIKV par PIMIT ont été intégrés dans le programme ZIKAlert (coordonnateur : Ph. DESPRES, 2017-20) financé sur les fonds FEDER de la Région Réunion 2015-20.

En 2018, PIMIT a démarré un programme d'étude visant à caractériser le virus de la dengue de type 2 qui a été identifié comme étant initiateur de l'épidémie actuelle à La Réunion. La caractérisation génétique incluant le séquençage total du génome de DENV-2 de cette souche réunionnaise issues d'isolats cliniques est exposée dans deux de nos publications [78][79]. Les conclusions majeures en sont que DENV-2 a co-circulé dans les îles des Seychelles et de la Réunion car les deux génomes séquencés d'individus issus des deux zones insulaires présentent respectivement 99,8 % et 93 % d'identité avec une séquence de DENV-2 de Thaïlande. L'analyse phylogénétique positionne ces deux génomes issus d'individus de Seychelles et de la Réunion dans le groupe DENV-2 cosmopolite (lignée génotypique 1). Cette étude donne une meilleure vision de l'histoire de l'évolution épidémiologique, de l'introduction et de la circulation virale. Du fait de l'importance fondée d'investiguer les souches de dengue circulant à la Réunion, j'ai amorcé en janvier 2019 un projet avec une étudiante en thèse sur le DENV-2 et la protéine NS1 associée dans le contexte hépatique, le foie étant un organe infecté par le virus [94][95]. Les données de ce projet en cours de finalisation me permettent de vous proposer un projet plus ambitieux ci-dessous. Depuis 2021, l'UMR est a déployé le programme RUNDENG (coordonnateur : P. Mavingui, 2020-23). Permettez-moi avant de vous proposer un focus sur la dengue dans le monde et la zone du sud-ouest de l'Océan Indien.

## II. Le virus de la Dengue et sa pathogénicité chez l'homme

### 1. Epidémiologie de la dengue

Le virus de la Dengue est un arbovirus transmis par les moustiques du genre *Aedes*, connu depuis plus de 200 ans, faisant partie de la famille des Flaviviridae plus précisément du genre *flavivirus*. Ce virus d'importance médicale est composé de quatre sérotypes différents et est apparenté à d'autres virus tel que le virus de la fièvre jaune, le West Nile, l'Encéphalite Japonaise ou encore le virus Zika. Le virus de la Dengue sévit dans les régions tropicales et subtropicales du globe de manière endémique mais ne cesse de s'étendre et de gagner de nouvelles zones géographiques tel que le continent européen. Selon l'OMS, 390 millions de cas de dengue par an avec une prévalence d'exposition au virus estimée à 3.9 milliards de personnes faisant de la dengue l'infection virale à transmission vectorielle la plus importante du monde [96]. Aujourd'hui les pays d'Asie et d'Amérique latine sont les plus touchés, faisant de ce virus une cause majeure d'hospitalisation dont une forte proportion d'enfant avec 2.5% de mortalité.

A la Réunion une épidémie de dengue est en cours, elle a débuté en 2018 avec le sérotype 2 [77]. En 2019 l'épidémie s'est poursuivie à un niveau supérieur à 2018 avec une co-circulation des 2 sérotypes DENV1 et DENV2 avec environ 1660 cas de dengue confirmé par semaine au pic de l'épidémie [97]. En 2020 le sérotype 1 est devenu majoritaire avec une circulation sporadique de DENV-2 et le même nombre de cas enregistré [98]. Le pic épidémique se situe au plus haut chaque année en avril et l'épidémie est active de janvier à juillet. Lors du premier semestre 2020 période du pic épidémique, les données de l'ARS ont avancé un fort nombre de cas de dengue primaire mais également secondaire enregistrant 22 décès alors même que cette infection est passée un peu au second plan du fait de la présence concomitante de la pandémie de la COVID-19 due au SARS-CoV2. Pour l'année 2021 c'est le sérotype 1 qui est responsable de la majorité des infections avec certains cas assez sévères amenant à des hospitalisations et avec l'apparition d'un symptôme particulier d'altération visuelle de type scotomes [99]. A la date du 27 avril 2021, le niveau d'épidémie est comparable à celles de 2019 et 2020 et deux décès ce sont avérés directement liés à la dengue pour cette année [100]. Le sérotype DENV-3 est présent mais à bas-bruit depuis 2019 dans certaines zones de l'île.

### 2. La symptomatique de la Dengue

Lors d'une infection par le virus de la dengue, 70% des cas sont asymptomatiques contre 30% des cas symptomatiques. Après une période d'incubation de 3 à 7 jours le tableau clinique se caractérise le plus souvent par des symptômes dit pseudo-grippaux comme une fièvre soudaine à 40°C, accompagnée plus ou moins de : céphalées, douleurs rétro-orbitaires, myalgies, arthralgies, perte d'appétit, douleurs abdominales, nausées et éruption cutanée de type non spécifique [101]. Après une période d'asthénie la forme classique de la dengue évolue généralement vers une guérison sans séquelle chez le malade [102]. Malheureusement, dans environ 20% des cas symptomatiques la forme classique évolue vers les formes sévères potentiellement mortelles que sont la fièvre hémorragique et le syndrome de choc de la dengue. Le développement de ces formes sévères apparaît en majorité chez des personnes plus vulnérables en particulier les enfants de moins de 15 ans [103]. Ces formes se traduisent par des symptômes plus graves comme une fuite plasmatique importante entraînant un état de choc ou une

accumulation liquidienne corporelle, accompagnée d'une détresse respiratoire, d'hémorragies et/ou d'une insuffisance organique grave [104]. Les symptômes sont précédés par des douleurs ou une sensibilité abdominale, des vomissements persistants, des œdèmes, un saignement des muqueuses, un état de léthargie ou d'agitation, une hépatomégalie ou une augmentation de l'hématocrite accompagnée d'une thrombopénie d'installation rapide [105]. Les causes du développement de ces formes sévères chez certains patients relèveraient de leur statut immunologique. L'hypothèse se base sur la formation d'anticorps, dirigé contre les protéines de DENV, de type ADE (antibody-dependant-enhancement) provoquant une réponse immunitaire antivirale inappropriée pouvant être à l'origine de la forme hémorragique et du syndrome de choc. En effet lors d'une réinfection par la dengue d'un autre sérotype (ce qui est très fréquent dans les zones endémiques), la particule virale serait reconnue par les anticorps spécifiques du virus de la primo-infection, mais serait moins bien neutralisée puisque d'un sérotype différent [106]. En effet, il semble que lors d'une seconde infection, les complexes virus-anticorps sont bien internalisés par les macrophages via les récepteurs de surface pour la région constante (Fc) des immunoglobulines. Mais une fois dans les macrophages les virus se libèrent des anticorps issus de la primo-infection qui sont moins spécifiques et moins nombreux, et ces virus se répliquent alors au lieu d'être neutralisés [107]. De manière générale, les macrophages infectés sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme des interleukines (IL) : IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$  notamment, capables d'activer à leurs tours des lymphocytes T et des cellules endothéliales. Dans le cas de seconde infection, la décharge cytokinique est importante, alors qu'elle ne devrait pas, et cette réaction inflammatoire forte aggrave les symptômes de l'individu pouvant aller vers une dengue sévère. D'ailleurs il a été montré que chez les patients présentant une forme hémorragique, le taux de cytokines sanguines est très élevé [108]. Ce phénomène ADE pose donc un problème majeur dans l'élaboration de la vaccination contre les quatre sérotypes de Dengue rendant difficile l'obtention d'un vaccin fortement et durablement efficace pour les quatre formes.

### 3. Prophylaxie et traitement de la dengue

A l'heure actuelle, il n'existe aucune mesure préventive ou curative spécifique du virus de la dengue autorisée en France. Cependant, le premier vaccin contre la dengue Dengvaxia a été mis au point par le laboratoire Sanofi Pasteur et testé sur la population aux Philippines en 2015-2016. Ce vaccin tétravalent atténué vivant est destiné aux personnes âgées de 9 à 45 ans vivant dans les zones endémiques du virus de la dengue et primo-infecté [97]. À ce jour, ce vaccin est autorisé dans 3 pays : le Mexique, les Philippines et le Brésil mais non autorisé dans les pays européens. L'analyse du vaccin Dengvaxia par Sanofi a montré un effet protecteur persistant contre la dengue mais les analyses montrent qu'à plus long terme à la suite de la vaccination, davantage de cas sévères de dengue pourraient être observés en cas de primo-exposition au virus. La méthode actuelle la plus efficace reste la lutte anti-vectorielle afin de limiter la transmission et la propagation du virus [109].

### 4. Tropicisme cellulaire de DENV chez l'homme

Le tropisme cellulaire et tissulaire de DENV peut avoir un impact majeur sur l'issue des infections. Les données sur le tropisme de DENV chez l'Homme sont issues d'études

de cas humains sévères voire fatals et d'études *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines. Les organes majeurs de répllication de DENV chez l'homme sont la rate, la peau et le foie [110]. Différentes études montrent un tropisme du virus de la dengue spécifiquement pour les cellules immunitaires tel que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins périphériques, ainsi que les cellules hépatiques [111]. Les trois systèmes immunitaire, vasculaire et hépatique sont ceux qui sont particulièrement altérés dans les formes sévères de la dengue [112].

### III. Projet DENV-SWIO, étude du DENV lors de troubles métaboliques

Les trois tissus fortement impactés par le virus de la dengue lors de l'infection chez l'homme sont également concernés par des troubles d'ordre métabolique. Le foie est le siège du métabolisme lipidique et glucidique, ce dernier étant en cause dans la pathologie diabétique. Les individus atteints de diabète de type 2 peuvent être sujets à une altération hépatique comme la pathologie du foie gras non alcoolique (NAFLD) dont la stéatose hépatique non alcoolique (NASH) [113]. La prévalence de la NAFLD est actuellement de 25% dans le monde. Dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien et notamment à La Réunion, la prévalence diabétique est deux à trois fois supérieure à celle retrouvée en métropole [114]. De plus les personnes souffrant de diabète présentent un risque accru de développer des DS lors d'une infection par le virus, signe de comorbidité [115]. Du fait de leur hyperglycémie chronique, les personnes diabétiques présentent dans leur circulation sanguine, s'il il n'est pas contrôlé, un taux élevé de glucose, des produits avancés de glycation (AGE) et un statut inflammatoire élevé avec un recrutement des leucocytes [116]. Des travaux récents menés et publiés par l'UMR DETROI mettent en évidence l'effet délétère des AGEs sur l'équilibre redox de cellules vasculaires [117]. Or les cellules endothéliales sont également fortement impactées dans le cas de DS. Les systèmes hépatiques, immunitaires et vasculaires sont donc concernés dans le cas du diabète et également de la dengue.

#### 1. Infection de la dengue et les conséquences sur le foie

Au cours d'une infection par le virus de la dengue, les patients développent de manière fréquente des atteintes hépatiques faisant de l'hépatomégalie un signe d'alerte de la maladie. Ces atteintes se traduisent par un taux de transaminases (ASAT, ALAT) 2 à 5 fois plus élevé que la normale avec une corrélation positive au degré de sévérité de la maladie. La libération de ces enzymes est le reflet de lésions hépatiques. À partir de biopsies de patients décédés lors de formes sévères, des stéatoses hépatiques, des zones d'infiltration cellulaire, d'apoptose et de nécrose ont été observées [118]. Des études ont rapporté que lors d'une infection par DENV les patients présentaient une perturbation des lipides sanguins, indiquant que DENV a bien un impact sur le fonctionnement du foie qui orchestre le métabolisme lipidique [119]. De manière intéressante, la protéine NS1 sécrétée lors de l'infection est une protéine lipidée qui pourrait influencer le métabolisme lipidique [64].

Lors de l'infection par le virus de la dengue des troubles du profil lipidique plasmatiques sont observés dans les formes graves. En effet, le virus de la dengue peut orchestrer une réorganisation du métabolisme hépatique afin de créer un environnement



favorable à sa réplication. Le cycle de vie du virus de la dengue est lié aux lipides cellulaires, puisque ces derniers participent à l'entrée du virus, à sa réplication et entrent dans la composition des néo-particules virales [120]. Lors d'une infection hépatocytaire, le virus va utiliser le glucose comme source majeure d'énergie et de synthèse des composés nécessaires à sa multiplication. Sachant que les voies métaboliques lipidique et glucidique sont étroitement liées, une infection par DENV va alors moduler l'homéostasie métabolique. En effet, le virus provoque une intensification de la glycolyse permettant une augmentation de la concentration cytoplasmique du citrate produit par le cycle de Krebs qui alimente la lipogénèse. En parallèle la concentration accrue de citrate inhibe la phosphofructokinase (PFK), augmentant ainsi la concentration cytoplasmique de glucose-6-phosphate (G6P) qui alimente la voie des pentoses phosphate pour la production d'acides nucléiques nécessaire à la réplication du génome viral. L'activation de la lipogénèse apportera tous les acides gras, triglycérides et cholestérols (AG, TG, Ch) nécessaire à la formation des particules virales [121].

Il est bien admis que l'infection des hépatocytes par DENV est un évènement déterminant dans l'apparition des formes sévères de la dengue chez l'Homme [122]. En effet l'infection virale par DENV est responsable de perturbations majeures des fonctions métaboliques de l'hépatocyte avec en particulier les voies de la glycolyse et de la lipogénèse qui sont inter-dépendantes [121]. Face au nombre croissant d'individus infectés par la dengue à La Réunion, il est important de concentrer nos efforts sur l'évaluation de la sensibilité des cellules hépatiques humaines au DENV circulants et de déterminer si l'infection de la cellule hépatique par DENV est associée à une modulation de la glycolyse et de la lipogénèse.

## 2. Impact du virus de la dengue sur les systèmes vasculaire et immunitaire

DENV infecte très bien les phagocytes mononucléaires à savoir les monocytes, les macrophages et dans une moindre mesure les péricytes [111]. Ces infections leucocytaires mènent à une réponse immune inflammatoire par production de TNF-alpha, IL-1-béta et d'IL-10 avec une perturbation de l'intégrité de la barrière vasculaire [123]. En effet suite à une infection par DENV une production exacerbée de cytokines se produit dans le sang du fait d'une activation incontrôlée des cellules de l'immunité innée comme les cellules dendritiques, macrophages, monocytes et aussi les cellules NK et T [124]. Les plaquettes sont des modulateurs de l'immunité innée, elles possèdent des récepteurs comme les TLR et NLR (Toll et NOD-like receptors) pour détecter les pathogènes dans la circulation sanguine [125]. Or l'activation plaquettaire et la thrombocytopenie sont des marqueurs de l'infection par DENV [126]. Lors de l'infection les plaquettes produisent MIF (macrophage migration inhibitory factor), également produit par les macrophages, les monocytes et les cellules endothéliales, ce facteur est responsable entre autres de l'hyperperméabilité vasculaire lors de la dengue [127][128]. En terme d'infection, DENV est moins performant sur les cellules endothéliales pour autant les altérations vasculaires sont marquées [129]. Les analyses chez les malades montrent que l'infection par la dengue est associée fréquemment à une leucopénie, une thrombopénie et des anomalies hématologiques. En effet l'infection par DENV provoque une déstabilisation du tissu vasculaire à cause entre autres d'une décharge de cytokines par les globules blancs et les plaquettes mais également par la présence plasmatique de la protéine virale NS1 sécrétée et des anticorps produits correspondants.

## 3. Pathogénicité de la protéine NS1

La contribution de la protéine virale NS1 dans la pathogénicité de la dengue est à l'étude depuis plusieurs années. L'incidence de la NS1 sur l'endothélium vasculaire est établie par des études qui ont mis en lumière des actions sur différents composants des vaisseaux sanguins. La NS1 et les anticorps correspondants favorisent la perte de perméabilité endothéliale par déstructuration du glycocalyx notamment, expliquant partiellement les hémorragies qui peuvent survenir dans le cas de dengue sévère [72]. La NS1 soluble se lie, *via* les récepteurs TLR4, aux monocytes ce qui provoque une libération de cytokines engendrant un état inflammatoire sanguin élevé [130][74]. De ce fait la NS1 de DENV est considérée comme un PAMP (pathogen-associated molecular pattern). L'augmentation de l'adhésion plaquettaire lors d'une infection par DENV serait due à la liaison de NS1 sur les TLR4 présents sur les plaquettes menant à terme à une thrombopénie et favorisant les hémorragies [131]. De plus les anticorps anti-NS1 favoriseraient la phagocytose des plaquettes par les macrophages concourant ainsi également à accentuer la thrombopénie [132]. L'inhibition de la voie du complément par la NS1 de DENV est clairement établie [70]. Ces faits montrent que la protéine virale NS1 participe à la pathogenèse et aura une incidence sur les formes graves. Des expériences ont montré cependant une faible implication de la NS1 hexamérique soluble dans la virulence. En effet que la NS1 soit éliminée par capture d'anticorps ne change rien à la production virale de souris infectées par la Dengue 1 [133]. Par contre des hépatocytes qui ont acquis de manière préventive la NS1 hexamérique soluble dans les endosomes tardifs ont une infection par le DENV-1 favorisée [134]. La protéine NS1 reste un bon candidat à intégrer dans un vaccin pour produire des anticorps qui seront présents en cas de primo-infection et pourront neutraliser rapidement la NS1 produite. La séquence protéique de NS1 à introduire dans le vaccin doit être exempt de la partie peptidique responsable du phénomène ADE. Ainsi avec une vaccination enrichie avec la protéine NS1 ou une vaccination avec la protéine NS1 seule permettrait d'éviter les risques d'ADE et donc les risques de dengue sévère.

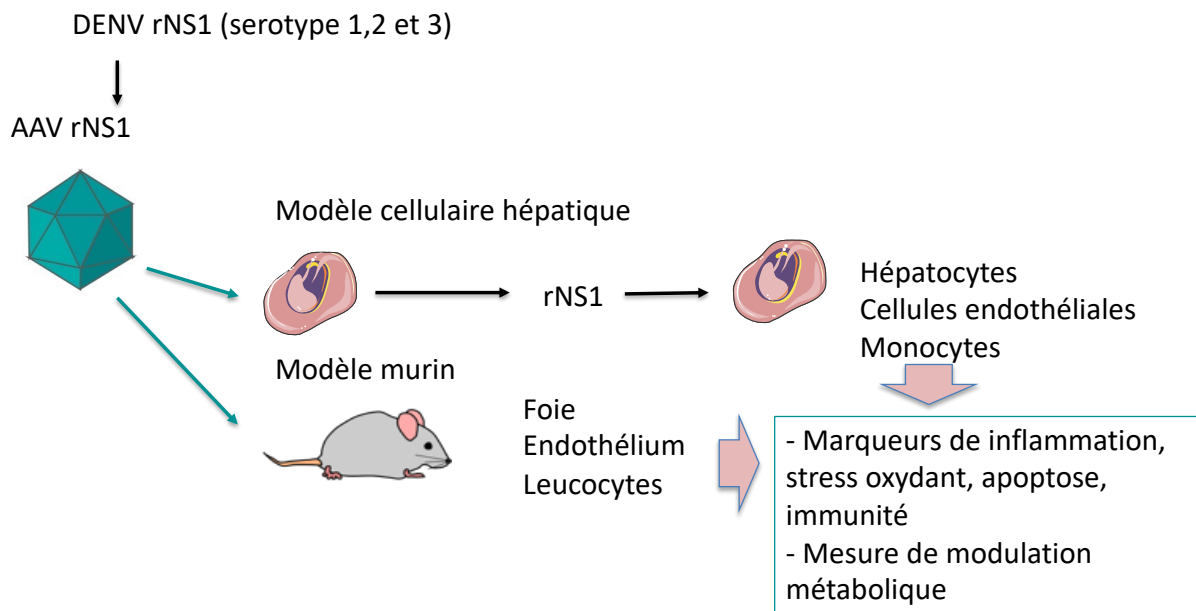
Une partie du projet que je propose concerne l'étude de la protéine NS1 de DENV épidémique de l'océan Indien et sa pathogénicité au niveau hépatique, vasculaire et immunitaire. Afin de prendre en compte des comorbidités éventuellement existantes chez des patients infectés, je propose d'y associer les paramètres définissant de diabète et l'obésité. Le métabolisme glucidique et lipidique est perturbé dans ses pathologies et est modulé lors de l'infection par DENV pour répondre aux besoins de la réplication virale. Les NS1 des différentes souches des sérotypes 1,2 et 3 circulants dans la zone seront comparées.

#### 4. Production hépatique de la protéine NS1 hexamérique

Étudier la protéine NS1 soluble nécessite de la produire sous sa forme sécrétée hexamérique car c'est cette forme qui est retrouvée circulante dans le sang. Pour produire la protéine NS1 hexamérique, j'utilise actuellement la transfection de lignées cellulaires adhérentes avec des plasmides et sa récupération dans le surnageant de culture. La transfection transitoire est un succès mais l'obtention de lignées stables n'a pas été possible certainement du fait de la toxicité de la NS1 de DENV. Par contre nous avons obtenu des lignées stables avec la protéine NS1 de ZIKV souche épidémique 2013 par transfection plasmidique ainsi que par transduction avec un lentivirus (IP Paris) [75]. Malheureusement au cours des décongélations successives la capacité de production protéique dans le surnageant diminue fortement rendant impossible la purification de la NS1 hexamérique recombinante.

Je souhaite donc utiliser une autre méthode de production de NS1 recombinante en utilisant des vecteurs viraux adéno-associés AAV (Adeno-Associated Virus) dans les modèles expérimentaux cellulaire et animaux. Dans les deux cas l'expression de la NS1 sera effectuée dans les cellules hépatiques. En effet les AAV sauvages et recombinants infectent préférentiellement le tissu hépatique [135]. Les AAV sont non pathogènes pour l'homme et sont étudiés depuis 1980 comme potentiels vecteurs de gène en vue d'une thérapie génique. Il se pose la question de leur potentiel oncogène qui est existant surtout sur les nouveaux nés (modèle souris). En effet le niveau d'intégration des AAV dans le génome est d'autant plus élevé que la transcription au sein du tissu est active. Les AAV ciblant préférentiellement des tissus comme les muscles et le foie peuvent générer des tumeurs mais ce phénomène cancéreux est très limité sur des modèles murins adultes car les tissus et les organes sont constitués. Cependant comme le foie est un tissu doué d'auto-régénération les AAV sont possiblement intégrés.

Je propose de procéder en deux temps. (1) Tout d'abord utiliser le vecteur recombinant AAV sur des cellules de lignées hépatiques en vue d'une production et d'une purification de la NS1 DENV2. La protéine ainsi obtenue sous forme concentrée sera utilisée en incubation sur des tapis cellulaires hépatique et vasculaire et des cultures monocytaires (Figure 21). L'objectif est d'évaluer l'effet de la NS1 hexamérique seule sur les cellules et de comparer les NS1 de différentes souches. (2) Ensuite l'objectif sera d'injecter par voie sanguine un AAV recombinant possédant le gène codant pour la NS1 dans le modèle murin [136]. Dans ce cas le foie sera préférentiellement infecté comme cela est le cas pour la dengue. Il y aura donc production et sécrétion de la NS1 par les cellules hépatiques (Figure 21). De cette manière je pourrai étudier les conséquences de la présence de NS1 dans l'organisme murin notamment les conséquences de la réponse inflammatoire et la perméabilité vasculaire. Des analyses seront menées sur le tissu hépatique pour déterminer des altérations éventuelles, des modulations dans l'expression des enzymes responsables de la glycolyse et de la lipogenèse.



**Figure 21.** Schéma du projet DENV-SWIO impliquant l'infection d'hépatocytes et en i.p. de souris avec le vecteur AAV contenant le gène codant pour NS1 des sérotypes 1, 2 et 3 de DENV souches réunionnaises suivi de l'analyse de différents marqueurs d'atération cellulaire et tissulaire.

## 5. L'infection par DENV dans un contexte d'immuno-sénescence lié aux troubles métaboliques

En utilisant les deux modèles exposés ci-dessus cellulaire et animal en figure 21, je souhaite connaître l'influence d'un excès de glucose sanguin chronique comme c'est le cas dans le diabète non contrôlé ceci dans un contexte infectieux en axant l'étude sur la protéine NS1. Cette étude part du postulat qu'un grand nombre de personnes atteint de diabète résident dans des zones où sévit la dengue. Le glucose en excès est générateur de stress oxydant ce qui au niveau des cellules hépatiques va moduler les voies métaboliques dont la glycolyse et induire une activation de l'inflammation créant ainsi une perturbation de l'immuno-métabolisme [137]. L'immuno-métabolisme est une interface entre les systèmes métabolique et immunitaire qui fonctionne selon un mécanisme central pour maintenir l'homéostasie de l'organisme [138]. Le niveau inflammatoire est augmenté dans le cas d'hyperglycémie, le diabète est à terme responsable d'immuno-sénescence du fait de la présence de DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) et d'une constante et importante sollicitation du système immunitaire [139]. L'immuno-sénescence est une détérioration graduelle du système immunitaire au cours du temps du fait de sollicitation chronique. Une étude cellulaire a montré que l'immuno-sénescence favorise les infections par la dengue ce qui signifie que les individus diabétiques seraient plus sensibles aux virus, que leur état peut s'aggraver suite aux infections virales successives [140]. Du fait d'une infection, la présence de PAMPs (Pathogene Associated Molecular Pattern) stimule alors le système immunitaire déjà fortement sollicité par les DAMPs dus au diabète pouvant amener à une dengue sévère. Dans notre contexte, les PAMPs sont les molécules d'origine virales dont la NS1 et les DAMPs les AGE produits lors de diabète comme l'albumine glyquée. L'immuno-sénescence chez le sujet âgé, naturellement et physiologiquement présente, est gravement accentuée chez les individus ayant des maladies chroniques et métaboliques. Ces individus âgés serait d'autant plus fragile aux infections virales [141]. Il me semble oportum d'étudier l'infection par la dengue et l'effet de la NS1 hexamérique dans un contexte d'immuno-métabolisme et d'immuno-sénescence.

Le DENV est connu pour moduler le métabolisme cellulaire à son avantage. Les cellules Huh7 infectées avec DENV enregistrent une augmentation de la métabolisation de glucose [121]. Ces perturbations de la physiologie cellulaire ne sont pas sans conséquences et enclenchent diverses voies dont l'inflammasome qu'il me semble intéressant d'étudier dans le contexte d'immuno-sénescence présentée plus haut. La protéine NRF2 joue un rôle crucial dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 et de sécrétion d'IL1-béta en cas de stress oxydant qui est présent lors d'infection par la dengue [142]. De manière très intéressante des souris diabétiques avec la streptozotocine et traitées avec un plasmide recombinant pEGFP-C2/NS1 du virus influenza A ont une réduction de l'hyperglycémie et un taux plus élevé en insuline que les souris non traitées [143]. Cet effet d'amélioration glycémique transitoire peut ensuite conduire à des conséquences de diabète aggravé ou de pré-diabète selon l'état métabolique de départ des individus. Dans ces deux modèles cellulaire et rongeur présenté en Figure 21, je souhaite mesurer l'impact de la protéine virale hexamérique NS1 sur les voies métaboliques et les métabolites produits en situation diabétique et d'immuno-sénescence.

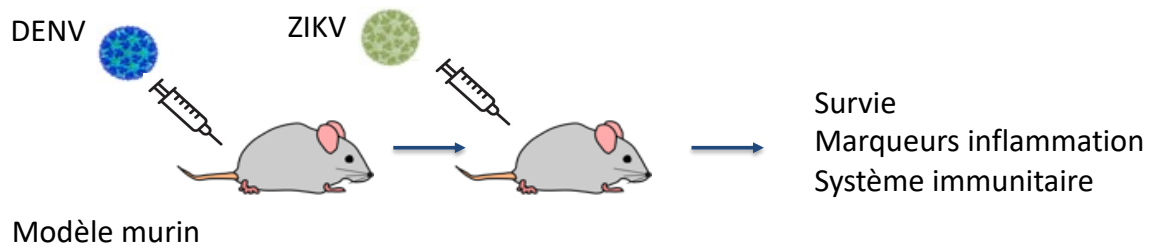
#### IV. La NS1 DENV-2 dans le sérum du patient réunionnais

Les travaux menés pendant la thèse d'Eva Ogire ont montré que la modification de quelques acides aminés seulement peuvent voir un effet important sur la sécrétion de l'hexamère de NS1 [80]. En effet il s'avère que dans notre étude, la rNS1 produite par les cellules HuH7 de la souche réunionnaise de DENV-2 est peu sécrétée. En est-t-il de même dans le sérum des patients infectés par DENV-2 ? Dans le cadre du projet RUNDENG, je propose de doser la NS1 circulante.

#### V. Comparaison d'infection par DENV et ZIKV

En perspective il me semble important de se pencher sur les conséquences d'infections successives par les deux virus de Dengue et de Zika. Les arbovirus s'expandent rapidement à travers le globe depuis ces dernières années, avec la co-présence sur de nombreux territoires subtropicaux de la dengue et de la fièvre Zika en particulier en Amérique du sud [144]. Bien que le virus Zika ne soit pas présent dans le SOOI, il pourrait émerger un jour. Or la présence concomitante de ces deux flavivirus enclenche une nouvelle problématique de santé en cas de seconde infection. Les virus Dengue et Zika sont très proche phylogénétiquement [145]. La possibilité de multi-infections impliquent des possibilités de reconnaissances croisées par les anticorps entre les 4 sérotypes de DENV et le ZIKA pouvant possiblement aggraver l'infection plutôt que protéger l'individu. Des études de la réactivité croisée ont suggéré qu'une primo-infection par la dengue pourrait avoir un impact positif sur une infection par Zika [146]. Il a été montré que les risques de développer une facilitation d'infection par les anticorps dit ADE (antibody dependant enhancement) avec les deux virus est possible et doit être investiguer [147].

A l'UMR PIMIT, je pourrai envisager d'étudier ces infections des virus du Zika et de la dengue *via* un modèle de rongeurs. Pour les infections nous disposons d'isolats des virus épidémique DENV et ZIKV, ainsi que des clones moléculaires correspondants produits par l'UMR PIMIT. L'avantage des clones est de travailler avec une seule séquence consensus issus du séquençage des souches isolées chez les patients. En terme de faisabilité la manipulation expérimentale du virus de la dengue nécessitant un laboratoire de sécurité biologique (LSB) de niveau 3, l'UMR PIMIT dispose au CYROI d'un complexe technologique regroupant plusieurs LSB-3 nommé PLATIN-OI, qui a été financé par la Région Réunion au profit de l'Université de la Réunion. Le PLATIN-OI permet de mener à bien les expériences d'infection virales sur cellules et petits rongeurs. La mise en place dans ses conditions permettrait d'infecter successivement les animaux avec les 2 virus et de mesurer les conséquences de la présence des anticorps de l'un sur l'infection de l'autre. Dans l'étude je propose d'infecter les souris dans un premier temps avec DENV car il est déjà présent la zone OI, puis avec le ZIKV, si une épidémie survient et de regarder la survie, l'inflammation et la réponse immunitaire (Figure 22).



**Figure 22.** Schéma de l'étude de la réponse à une infection par ZIKV consécutive à une primoinfection par DENV réunionnaises avec l'analyse de différents marqueurs post-infectieux.

## F. Projet de recherche LEPTO-SWIO, étude des leptospiroses de l'océan Indien et de leur potentiel pathogène

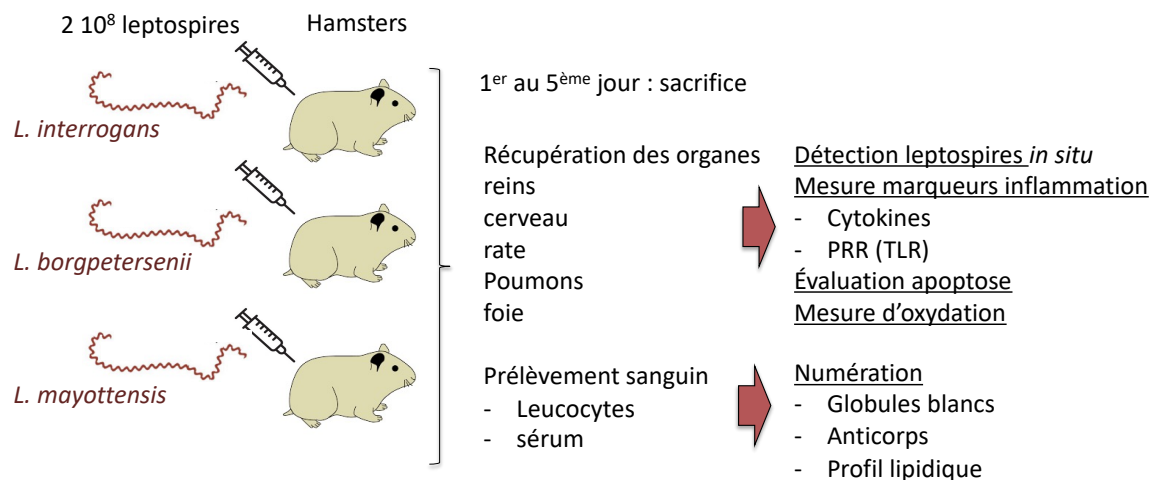
Je propose également une étude sur la pathogénicité des leptospires de la zone du SOOI sur modèle animal du fait de ma participation antérieure au projet leptospirose de l'UMR PIMIT. Je souhaite orienter l'étude des leptospiroses présentes dans la zone OI sur un aspect moléculaire par la détection et la caractérisation de marqueurs spécifiques de l'immunité, de l'inflammation, de la mort cellulaire et du stress oxydant.

Je souhaite donc mener une étude sur la pathogénicité des leptospiroses des îles du sud-ouest de l'océan Indien issues de la faune sauvage sur les modèles rongeurs amorcée dans la cadre de la thèse de Colette Cordonin et que j'ai exposé plus haut. Le modèle dit 'sensible' le hamster doré de Syrie a permis de distinguer des réactivités vraiment différentes entre les trois souches de leptospiroses pathogènes *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, et *L. mayottensis*. Certains tissus dont le foie et les poumons se sont retrouvés endommagés. Afin de trouver des réponses sur le fonctionnement partiellement élucidé de la réponse tissulaire à l'infection, je propose sur ce même modèle animal de poursuivre les investigations afin de décrypter les voies de défenses cellulaires.

Les leptospires pathogènes déclenchent chez certaines personnes des symptômes bénins (forte fièvre, mal de tête, vomissement, jaunice, rash, douleurs musculaires et abdominales, diarrhée) qui peuvent évoluer en forme sévère dite de Weil (lésions des reins et du foie, méningite) [148]. Sans traitement la leptospirose peut mener à des détresses respiratoires et à la mort.

Ce sont des bactéries extracellulaires gram négatives, mobiles grâce à leurs flagelles périplasmique, elles disposent de deux chromosomes de 4,3 et 0,35 Mpb de long ainsi que de deux plasmides pLiSL1 et pLiSL2 [149]. Dans la membrane externe sont enchâssés de nombreux LPS (lipopolysaccharides), ainsi que des lipoprotéines responsables de l'activation de l'immunité innée et aquirse [150]. Cependant chez l'Homme certaines leptospires pathogènes ont développé de nombreux moyens d'échappement pour contourner les défenses que sont l'opsonisation qui consiste à repérer et marquer les pathogènes par des opsonines (C3b du complément, anticorps) pour la phagocytose et leur destruction lysozymale après phagocytose par les macrophages et les neutrophiles. Certaines bactéries sont donc persistantes et sont capables d'endommager fortement les tissus et leurs protéines membranaires y sont fortement impliquées [151].

L'immunité innée de l'hôte reconnaît les MAMPs (microbial-associated molecular patterns) par les PRRs (pattern recognition receptors) de la famille des TLRs (toll-like receptors) et des NODR (NOD receptors). La *leptospira interrogans* est reconnue par les cellules immunitaires au moyen des récepteurs TLR2 et NOD2 [152]. Les neutrophiles sont activés par les leptospires par l'intermédiaire des TLR2 amenant à une forte réponse pro-inflammatoire avec une sécrétion massive d'IL8 et une augmentation du chimiotactisme [153]. L'immunité innée donc fortement sollicitée ne réussit pas forcément à lutter contre les leptospires sans une aide médicamenteuse de type antibiotiques. Je propose de tester ses défenses immunitaires chez le modèle Hamster en les infectant avec les 3 souches isolées par l'UMR PIMIT car présentes dans la zone OI (figure 23). L'étude de ces leptospires, issues de la faune qui peuvent se retrouver en contact et contaminer l'Homme, permettra d'affiner les connaissances sur leur potentiel pathogène au niveau cellulaire et moléculaire par la mesure de la décharge cytokinique et les réactivités des leucocytes. De plus dans le cas de leptospiroses sévères chez l'Homme, le profil lipidique est fortement altéré, les triglycérides et le cholestérol sanguins seront également quantifiés (Figure 20) [154][155].



**Figure 23.** Schéma du projet LEPTO-SWIO impliquant l'infection i.p. de hamsters dorés de Syrie avec les souches de leptospires isolés chez le rat *L. interrogans*, la chauve-souris *L. borgpetersenii* et le tenrec *L. mayottensis* suivi après sacrifice de l'analyse de différents marqueurs d'atération tissulaire.

## G. Conclusion

Le projet DENGUE-SWIO permettra de mieux définir les marqueurs pronostiques et prédictifs des formes graves de la dengue en relation avec la souche épidémique DENV-2 Run-18. Les outils moléculaires développés comme la protéine recombinante NS1 de DENV-2 Run-18 pourront s'avérer utiles comme réactifs biologiques pour le développement de trousse de diagnostic de la dengue qui soient plus sensibles et spécifiques. Les connaissances acquises et les outils développés pourront être adaptés à d'autres souches de DENV émergentes dont notamment le DENV-1 qui sévit majoritairement depuis 2020 sur l'île. Les données acquises sur les leptospiroses circulantes de SWIO permettront d'appréhender leur virulence de par leur mode d'action et l'activation du système immunitaire de l'hôte infecté.

L'UMR PIMIT a pour intérêt d'étudier les pathogènes de la zone qui sévissent pour la plupart également dans de nombreuses parties du globe surtout dans les sub-régions tropicales. Il est majeur d'approfondir les études physiopathologiques de ces organismes dont la dynamique varie et évolue mettant les humains en situation d'hôte favorable. Avoir des outils et des méthodes d'étude de ces pathogènes sur site est à mon sens essentiel pour la réactivité de la recherche. Le projet de recherche que je vous ai présenté servira lors de prochaines recherches à l'étude efficace de pathogènes émergeant ou ré-émergeant dans la zone.

## H. Références Bibliographiques

1. Roche, M. Etude Cinétique et Mécanismes de l'activité Antioxydante Des Phénols de l'olive Dans Différents Systèmes Modèles. Inhibition de La Peroxydation de l'acide Linoléique Lié à La Sérum Albumine. *thèse es science* 2005.
2. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S-2085S.
3. Fitó, M.; Covas, M.I.; Lamuela-Raventós, R.M.; Vila, J.; Torrents, J.; de la Torre, C.; Marrugat, J. Protective Effect of Olive Oil and Its Phenolic Compounds against Low Density Lipoprotein Oxidation. *Lipids* **2000**, *35*, 633–638, doi:10.1007/s11745-000-0567-1.
4. Fiorentino, A.; Gentili, A.; Isidori, M.; Monaco, P.; Nardelli, A.; Parrella, A.; Temussi, F. Environmental Effects Caused by Olive Mill Wastewaters: Toxicity Comparison of Low-Molecular-Weight Phenol Components. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1005–1009, doi:10.1021/jf020887d.
5. Garcia I. G. Pena P. R. J. Venceslada J. L. B. Martin A. M. Santos M. A. M. Gomez E. R. Removal of Phenol Compounds from Olive Mill Wastewater Using Phanerochete *Chrysosporium*, *Aspergillus Terreus* and *Geotrichum Candidum*. *Process Biochem.* 2000, 751–758.
6. Tuck, K.L.; Hayball, P.J. Major Phenolic Compounds in Olive Oil: Metabolism and Health Effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2002**, *13*, 636–644, doi:10.1016/S0955-2863(02)00229-2.
7. Visioli, F.; Bellomo, G.; Galli, C. Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, *247*, 60–64, doi:10.1006/bbrc.1998.8735.
8. Fogliano V. Ritieni A. Monti S. M. Galoo M. Medaglia D. D. Ambrosino M. L. Sacchi R Antioxidant Activity of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds in a Micellar System. *J. Sci. Food Agric.* . 199AD, 1803–1808.
9. Petitpas, I.; Grüne, T.; Bhattacharya, A.A.; Curry, S. Crystal Structures of Human Serum Albumin Complexed with Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Molecular Biology* **2001**, *314*, 955–960, doi:10.1006/jmbi.2000.5208.
10. Kálmán, J.; Juhász, A.; Rakonczay, Z.; Ábrahám, G.; Zana, M.; Boda, K.; Farkas, T.; Penke, B.; Janka, Z. Increased Serum Butyrylcholinesterase Activity in Type IIb Hyperlipidaemic Patients. *Life Sciences* **2004**, *75*, 1195–1204, doi:10.1016/j.lfs.2004.02.019.
11. Dufour C. Dangles O. Flavonoid Serum Albumin Complexation Determination of Binding Constants and Binding Site by Fluorescence Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 164–173.
12. Lomascolo A, Cayol J.L, Roche M, Guo L, Robert J.L, Record E, Lesage-Meessen L, Ollivier B, Sigoillot J.C and Asther M. Molecular Clustering of *Pycnoporus* Strains from



Various Geographic Origins and Isolation of Monokaryotic Strains for Laccase Hyperproduction. *Mycological Research* 2002.

13. Roche, M.; Dufour, C.; Mora, N.; Dangles, O. Antioxidant Activity of Olive Phenols: Mechanistic Investigation and Characterization of Oxidation Products by Mass Spectrometry. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 423, doi:10.1039/b416101g.

14. Roche, M.; Dufour, C.; Loonis, M.; Reist, M.; Carrupt, P.-A.; Dangles, O. Olive Phenols Efficiently Inhibit the Oxidation of Serum Albumin-Bound Linoleic Acid and Butyrylcholine Esterase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2009**, *1790*, 240–248, doi:10.1016/j.bbagen.2009.01.007.

15. Scharbarg, E.; Wargny, M.; Leclère, B.; Plunian, P.; Velkovski-Rouyer, M.; De Visme, S.; Hanf, M.; Krempf, M.; Nobécourt, E. The SURCOUF Study: Design and Baseline Characteristics of a Prospective Population-Based Cohort on Diabetes Care in France. *Annales d'Endocrinologie* **2019**, *80*, 136–137, doi:10.1016/j.ando.2018.11.005.

16. Rondeau, P.; Singh, N.R.; Caillens, H.; Tallet, F.; Bourdon, E. Oxidative Stresses Induced by Glycoxidized Human or Bovine Serum Albumin on Human Monocytes. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, *45*, 799–812, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.004.

17. Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the Year 2000 and Projections for 2030. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 1047–1053, doi:10.2337/diacare.27.5.1047.

18. Roche, M.; Rondeau, P.; Singh, N.R.; Tarnus, E.; Bourdon, E. The Antioxidant Properties of Serum Albumin. *FEBS Letters* **2008**, *582*, 1783–1787, doi:10.1016/j.febslet.2008.04.057.

19. Koli, R.; Erlund, I.; Jula, A.; Marniemi, J.; Mattila, P.; Alfthan, G. Bioavailability of Various Polyphenols from a Diet Containing Moderate Amounts of Berries †. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3927–3932, doi:10.1021/jf9024823.

20. Matsuda, M.; Shimomura, I. Increased Oxidative Stress in Obesity: Implications for Metabolic Syndrome, Diabetes, Hypertension, Dyslipidemia, Atherosclerosis, and Cancer. *Obesity Research & Clinical Practice* **2013**, *7*, e330–e341, doi:10.1016/j.orcp.2013.05.004.

21. Richardson MA, Berg DT, Johnston PA, McClure D, Grinnell BW. Human Liposarcoma Cell Line, SW872, Secretes Cholesteryl Ester Transfer Protein in Response to Cholesterol. *J Lipid Res.* 1996, 1162–6.

22. Roche, M.; Tarnus, E.; Rondeau, P.; Bourdon, E. Effects of Nutritional Antioxidants on AAPH- or AGEs-Induced Oxidative Stress in Human SW872 Liposarcoma Cells. *Cell Biol Toxicol* **2009**, *25*, 635–644, doi:10.1007/s10565-008-9118-2.

23. Tarnus, E.; Wassef, H.; Carmel, J.-F.; Rondeau, P.; Roche, M.; Davignon, J.; Bernier, L.; Bourdon, E. Apolipoprotein E Limits Oxidative Stress-Induced Cell Dysfunctions in Human Adipocytes. *FEBS Letters* **2009**, *583*, 2042–2048, doi:10.1016/j.febslet.2009.05.016.

24. Spagnol, C.M.; Assis, R.P.; Brunetti, I.L.; Isaac, V.L.B.; Salgado, H.R.N.; Corrêa, M.A. In Vitro Methods to Determine the Antioxidant Activity of Caffeic Acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2019**, *219*, 358–366, doi:10.1016/j.saa.2019.04.025.

25. Woude, H. *Mechanisms of Toxic Action of the Flavonoid Quercetin and Its Phase II Metabolites*; Books Wageningen Universiteit; ISBN 90-8504-349-2.

26. Di Pede, G.; Bresciani, L.; Calani, L.; Petrangolini, G.; Riva, A.; Allegrini, P.; Del Rio, D.; Mena, P. The Human Microbial Metabolism of Quercetin in Different Formulations: An In Vitro Evaluation. *Foods* **2020**, *9*, 1121, doi:10.3390/foods9081121.

27. Zhu, L.; Chen, Q.; Zhang, L.; Hu, S.; Zheng, W.; Wang, C.; Bai, Y.; Pan, Y.; Konishi, T.; Guan, J.; et al. CLIC4 Regulates Radioresistance of Nasopharyngeal Carcinoma by INOS after  $\gamma$ -Rays but Not Carbon Ions Irradiation. *Am J Cancer Res* **2020**, *10*, 1400–1415.

28. Baer, A.R.; Cheeseman, C.I.; Thomson, A.B. The Assessment of Recovery of the

- Intestine after Acute Radiation Injury. *Radiat Res* **1987**, *109*, 319–329.
29. Lacoste-Collin, L.; Jozan, S.; Pereda, V.; Courtade-Saïdi, M. Influence of A Continuous Very Low Dose of Gamma-Rays on Cell Proliferation, Apoptosis and Oxidative Stress. *Dose Response* **2015**, *13*, doi:10.2203/dose-response.14-010.Lacoste-Collin.
  30. Somosy, Z.; Horváth, G.; Telbisz, Á.; Réz, G.; Pálfia, Z. Morphological Aspects of Ionizing Radiation Response of Small Intestine. *Micron* **2002**, *33*, 167–178, doi:10.1016/S0968-4328(01)00013-0.
  31. Lee, H.-J.; Cha, J.-Y. Recent Insights into the Role of ChREBP in Intestinal Fructose Absorption and Metabolism. *BMB Rep* **2018**, *51*, 429–436.
  32. Blumenthal, R. D.; Lew, W.; Reising, A.; Soyne, D.; Osorio, L.; Ying, Z.; Goldenberg, D. M. Anti-Oxidant Vitamins Reduce Normal Tissue Toxicity Induced by Radio- Immunotherapy. *Int. J. Cancer* **2000**, 276–280.
  33. Haton, C.; François, A.; Vandamme, M.; Wysocki, J.; Griffiths, N.M.; Benderitter, M. Imbalance of the Antioxidant Network of Mouse Small Intestinal Mucosa after Radiation Exposure. *Radiation Research* **2007**, *167*, 445–453, doi:10.1667/RR0581.1.
  34. Roche, M.; Neti, P.V.S.V.; Kemp, F.W.; Azzam, E.I.; Ferraris, R.P.; Howell, R.W. High Levels of Dietary Supplement Vitamins A, C and E Are Absorbed in the Small Intestine and Protect Nutrient Transport Against Chronic Gamma Irradiation. *Radiation Research* **2015**, *184*, 470, doi:10.1667/RR14043.1.
  35. Roche, M.; Neti, P.V.S.V.; Kemp, F.W.; Agrawal, A.; Attanasio, A.; Douard, V.; Muduli, A.; Azzam, E.I.; Norkus, E.; Brimacombe, M.; et al. Radiation-Induced Reductions in Transporter mRNA Levels Parallel Reductions in Intestinal Sugar Transport. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2010**, *298*, R173–R182, doi:10.1152/ajpregu.00612.2009.
  36. Ferraris, R.P.; Casirola, D.M.; Vinnakota, R.R. Dietary Carbohydrate Enhances Intestinal Sugar Transport in Diabetic Mice. *Diabetes* **1993**, *42*, 1579–1587, doi:10.2337/diab.42.11.1579.
  37. Roche, M.; Kemp, F.W.; Agrawal, A.; Attanasio, A.; Neti, P.V.S.V.; Howell, R.W.; Ferraris, R.P. Marked Changes in Endogenous Antioxidant Expression Precede Vitamin A-, C-, and E-Protectable, Radiation-Induced Reductions in Small Intestinal Nutrient Transport. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *50*, 55–65, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.689.
  38. Abdel-Magied, N.; Elkady, A.A. Possible Curative Role of Curcumin and Silymarin against Nephrotoxicity Induced by Gamma-Rays in Rats. *Exp Mol Pathol* **2019**, *111*, 104299, doi:10.1016/j.yexmp.2019.104299.
  39. Borgherini, G.; Poubeau, P.; Staikowsky, F.; Lory, M.; Le Moullec, N.; Becquart, J.P.; Wengling, C.; Michault, A.; Paganin, F. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients. *Clin Infect Dis* **2007**, *44*, 1401–1407, doi:10.1086/517537.
  40. DRASS Infos Réunion Evolution Sur 10 Ans de La Mortalité et de Ces Causes à La Réunion. 2006.
  41. Gould, E.; Pettersson, J.; Higgs, S.; Charrel, R.; de Lamballerie, X. Emerging Arboviruses: Why Today? *One Health* **2017**, *4*, 1–13, doi:10.1016/j.onehlt.2017.06.001.
  42. Carbaugh, D.L.; Lazear, H.M. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. *J Virol* **2020**, *94*, e00104-20, /jvi/94/11/JVI.00104-20.atom, doi:10.1128/JVI.00104-20.
  43. Kumar, B.; Miller, K.; Charon, N.W.; Legleiter, J. Periplasmic Flagella in *Borrelia burgdorferi* Function to Maintain Cellular Integrity upon External Stress. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184648, doi:10.1371/journal.pone.0184648.
  44. Heaton, N.S.; Sachs, D.; Chen, C.-J.; Hai, R.; Palese, P. Genome-Wide Mutagenesis

- of Influenza Virus Reveals Unique Plasticity of the Hemagglutinin and NS1 Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 20248–20253, doi:10.1073/pnas.1320524110.
45. Bodin, N.; Lesperance, D.; Albert, R.; Hollanda, S.; Michaud, P.; Degroote, M.; Churlaud, C.; Bustamante, P. Trace Elements in Oceanic Pelagic Communities in the Western Indian Ocean. *Chemosphere* **2017**, *174*, 354–362, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.01.099.
  46. Chandler, J.D.; Hu, X.; Ko, E.-J.; Park, S.; Fernandes, J.; Lee, Y.-T.; Orr, M.L.; Hao, L.; Smith, M.R.; Neujahr, D.C.; et al. Low-Dose Cadmium Potentiates Lung Inflammatory Response to 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus in Mice. *Environment International* **2019**, *127*, 720–729, doi:10.1016/j.envint.2019.03.054.
  47. Kääriäinen, L.; Takkinen, K.; Keränen, S.; Söderlund, H. Replication of the Genome of Alphaviruses. *J Cell Sci Suppl* **1987**, *7*, 231–250.
  48. Hernandez, R.; Brown, D.T.; Paredes, A. Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera. *Advances in Virology* **2014**, *2014*, 1–24, doi:10.1155/2014/259382.
  49. Haraguchi, Y.; Sakurai, H.; Hussain, S.; Anner, B.M.; Hoshino, H. Inhibition of HIV-1 Infection by Zinc Group Metal Compounds. *Antiviral Research* **1999**, *43*, 123–133, doi:10.1016/S0166-3542(99)00040-6.
  50. Seth, P.; Husain, M.M.; Gupta, P.; Schoneboom, B.A.; Grieder, F.B.; Mani, H.; Maheshwari, R.K. Early Onset of Virus Infection and Up-Regulation of Cytokines in Mice Treated with Cadmium and Manganese. *BioMetals* **2003**, *16*, 359–368, doi:10.1023/A:1020682716212.
  51. Suzuki, M.; Simizu, B.; Yabe, S.; Oya, A.; Seto, H. Effect of Cadmium on Japanese Encephalitis Virus Infection in Mice 1. Acute and Single-Dose Exposure Experiment. *Toxicology Letters* **1981**, *9*, 231–235, doi:10.1016/0378-4274(81)90155-7.
  52. Frumence, E.; Roche, M.; Guiraud, P. Cadmium Reduces the Efficiency of Sindbis Virus Replication in Human Cells and Promotes Their Survival by Inhibiting Apoptosis. *Biochemistry and Biophysics Reports* **2016**, *8*, 151–156, doi:10.1016/j.bbrep.2016.08.023.
  53. Cao-Lormeau, V.-M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome Outbreak Associated with Zika Virus Infection in French Polynesia: A Case-Control Study. *The Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539, doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6.
  54. Acosta-Ampudia, Y.; Monsalve, D.M.; Castillo-Medina, L.F.; Rodríguez, Y.; Pacheco, Y.; Halstead, S.; Willison, H.J.; Anaya, J.-M.; Ramírez-Santana, C. Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 116, doi:10.3389/fnmol.2018.00116.
  55. Foy, B.D.; Kobylinski, K.C.; Foy, J.L.C.; Blitvich, B.J.; Travassos da Rosa, A.; Haddow, A.D.; Lanciotti, R.S.; Tesh, R.B. Probable Non-Vector-Borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 880–882, doi:10.3201/eid1705.101939.
  56. Nicastrì, E.; Castilletti, C.; Liuzzi, G.; Iannetta, M.; Capobianchi, M.R.; Ippolito, G. Persistent Detection of Zika Virus RNA in Semen for Six Months after Symptom Onset in a Traveller Returning from Haiti to Italy, February 2016. *Euro Surveill.* **2016**, *21*, 30314, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.32.30314.
  57. Calvet, G.; Aguiar, R.S.; Melo, A.S.O.; Sampaio, S.A.; de Filippis, I.; Fabri, A.; Araujo, E.S.M.; de Sequeira, P.C.; de Mendonça, M.C.L.; de Oliveira, L.; et al. Detection and Sequencing of Zika Virus from Amniotic Fluid of Fetuses with Microcephaly in Brazil: A Case Study. *The Lancet Infectious Diseases* **2016**, *16*, 653–660, doi:10.1016/S1473-3099(16)00095-5.
  58. Frumence, E.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; El-Kalamouni, C.; Nativel, B.; Rondeau, P.; Missé, D.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Desprès, P. The South Pacific Epidemic

- Strain of Zika Virus Replicates Efficiently in Human Epithelial A549 Cells Leading to IFN- $\beta$  Production and Apoptosis Induction. *Virology* **2016**, *493*, 217–226, doi:10.1016/j.virol.2016.03.006.
59. Giry, C.; Roquebert, B.; Li-Pat-Yuen, G.; Gasque, P.; Jaffar-Bandjee, M.-C. Simultaneous Detection of Chikungunya Virus, Dengue Virus and Human Pathogenic *Leptospira* Genomes Using a Multiplex TaqMan® Assay. *BMC Microbiol* **2017**, *17*, 105, doi:10.1186/s12866-017-1019-1.
60. Lindenbach, B.D.; Rice, C.M. Molecular biology of flaviviruses. In *Advances in Virus Research*; Elsevier, 2003; Vol. 59, pp. 23–61 ISBN 978-0-12-039859-1.
61. Scaturro, P.; Cortese, M.; Chatel-Chaix, L.; Fischl, W.; Bartenschlager, R. Dengue Virus Non-Structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathog* **2015**, *11*, e1005277, doi:10.1371/journal.ppat.1005277.
62. Youn, S.; Li, T.; McCune, B.T.; Edeling, M.A.; Fremont, D.H.; Cristea, I.M.; Diamond, M.S. Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of West Nile Virus. *Journal of Virology* **2012**, *86*, 7360–7371, doi:10.1128/JVI.00157-12.
63. Noisakran, S.; Dechtawewat, T.; Avirutnan, P.; Kinoshita, T.; Siripanyaphinyo, U.; Puttikhunt, C.; Kasinrerak, W.; Malasit, P.; Sittisombut, N. Association of Dengue Virus NS1 Protein with Lipid Rafts. *Journal of General Virology* **2008**, *89*, 2492–2500, doi:10.1099/vir.0.83620-0.
64. Gutsche, I.; Coulibaly, F.; Voss, J.E.; Salmon, J.; d'Alayer, J.; Ermonval, M.; Larquet, E.; Charneau, P.; Krey, T.; Megret, F.; et al. Secreted Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is an Atypical Barrel-Shaped High-Density Lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 8003–8008, doi:10.1073/pnas.1017338108.
65. Libraty, D.H.; Young, P.R.; Pickering, D.; Endy, T.P.; Kalayanarooj, S.; Green, S.; Vaughn, D.W.; Nisalak, A.; Ennis, F.A.; Rothman, A.L. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *J INFECT DIS* **2002**, *186*, 1165–1168, doi:10.1086/343813.
66. Parnavitane, S.A.; Gomes, L.; Kamaladasa, A.; Adikari, T.N.; Wickramasinghe, N.; Jeewandara, C.; Shyamali, N.L.A.; Ogg, G.S.; Malavige, G.N. Dengue NS1 Antigen as a Marker of Severe Clinical Disease. *BMC Infect Dis* **2014**, *14*, 570, doi:10.1186/s12879-014-0570-8.
67. Duong, V.; Ly, S.; Lorn Try, P.; Tuiskunen, A.; Ong, S.; Chroeng, N.; Lundkvist, A.; Leparc-Goffart, I.; Deubel, V.; Vong, S.; et al. Clinical and Virological Factors Influencing the Performance of a NS1 Antigen-Capture Assay and Potential Use as a Marker of Dengue Disease Severity. *PLoS Negl Trop Dis* **2011**, *5*, e1244, doi:10.1371/journal.pntd.0001244.
68. Watanabe, S.; Tan, K.H.; Rathore, A.P.S.; Rozen-Gagnon, K.; Shuai, W.; Ruedl, C.; Vasudevan, S.G. The Magnitude of Dengue Virus NS1 Protein Secretion Is Strain Dependent and Does Not Correlate with Severe Pathologies in the Mouse Infection Model. *J. Virol.* **2012**, *86*, 5508, doi:10.1128/JVI.07081-11.
69. Watterson, D.; Modhiran, N.; Young, P.R. The Many Faces of the Flavivirus NS1 Protein Offer a Multitude of Options for Inhibitor Design. *Antiviral Research* **2016**, *130*, 7–18, doi:10.1016/j.antiviral.2016.02.014.
70. Conde, J.N.; da Silva, E.M.; Allonso, D.; Coelho, D.R.; Andrade, I. da S.; de Medeiros, L.N.; Menezes, J.L.; Barbosa, A.S.; Mohana-Borges, R. Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. *J. Virol.* **2016**, *90*, 9570–9581, doi:10.1128/JVI.00912-16.
71. Avirutnan, P.; Hauhart, R.E.; Somnuke, P.; Blom, A.M.; Diamond, M.S.; Atkinson, J.P. Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates

- Complement Activation. *J Immunol* **2011**, *187*, 424–433, doi:10.4049/jimmunol.1100750.
72. Puerta-Guardo, H.; Glasner, D.R.; Harris, E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog* **2016**, *12*, e1005738, doi:10.1371/journal.ppat.1005738.
73. Tadmalkar, N.; Prasad, S.; Gangodkar, S.; Ghosh, K.; Basu, A. Dengue Virus NS1 Exposure Affects von Willebrand Factor Profile and Platelet Adhesion Properties of Cultured Vascular Endothelial Cells. *Indian J Hematol Blood Transfus* **2019**, *35*, 502–506, doi:10.1007/s12288-018-1058-2.
74. Adikari, T.N.; Gomes, L.; Wickramasinghe, N.; Salimi, M.; Wijesiriwardana, N.; Kamaladasa, A.; Shyamali, N.L.A.; Ogg, G.S.; Malavige, G.N. Dengue NS1 Antigen Contributes to Disease Severity by Inducing Interleukin (IL)-10 by Monocytes: Dengue NS1 Antigen Contribution. *Clin Exp Immunol* **2016**, *184*, 90–100, doi:10.1111/cei.12747.
75. Viranaicken, W.; Ndebo, A.; Bos, S.; Souque, P.; Gadea, G.; El-Kalamouni, C.; Krejbich-Trotot, P.; Charneau, P.; Desprès, P.; Roche, M. Recombinant Zika NS1 Protein Secreted from Vero Cells Is Efficient for Inducing Production of Immune Serum Directed against NS1 Dimer. *IJMS* **2017**, *19*, 38, doi:10.3390/ijms19010038.
76. Bosch, I.; de Puig, H.; Hiley, M.; Carré-Camps, M.; Perdomo-Celis, F.; Narváez, C.F.; Salgado, D.M.; Senthooor, D.; O’Grady, M.; Phillips, E.; et al. Rapid Antigen Tests for Dengue Virus Serotypes and Zika Virus in Patient Serum. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, ean1589, doi:10.1126/scitranslmed.aan1589.
77. Santé publique France Epidémie de Dengue à La Réunion L’épidémie Continue Dans l’ouest et Le Sud et s’étend Dans Le Nord Point Épidémiologique 2018.
78. Pascalis, H.; Turpin, J.; Roche, M.; Krejbich, P.; Gadea, G.; Nten, C.A.; Desprès, P.; Mavingui, P. The Epidemic of Dengue Virus Type-2 Cosmopolitan Genotype on Reunion Island Relates to Its Active Circulation in the Southwestern Indian Ocean Neighboring Islands. *Heliyon* **2019**, *5*, e01455, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01455.
79. Pascalis, H.; Biscornet, L.; Toty, C.; Hafsia, S.; Roche, M.; Desprès, P.; Atyame Nten, C.; Bibi, J.; Louange, M.; Gedeon, J.; et al. Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Epidemic Strains from Reunion Island and the Seychelles. *Microbiol Resour Announc* **2020**, *9*, MRA.01443-19, e01443-19, doi:10.1128/MRA.01443-19.
80. Ogire, E.; Diaz, O.; Vidalain, P.-O.; Lotteau, V.; Desprès, P.; Roche, M. Instability of the NS1 Glycoprotein from La Reunion 2018 Dengue 2 Virus (Cosmopolitan-1 Genotype) in Huh7 Cells Is Due to Lysine Residues on Positions 272 and 324. *IJMS* **2021**, *22*, 1951, doi:10.3390/ijms22041951.
81. Soe, H.J.; Manikam, R.; Raju, C.S.; Khan, M.A.; Sekaran, S.D. Correlation of Host Inflammatory Cytokines and Immune-Related Metabolites, but Not Viral NS1 Protein, with Disease Severity of Dengue Virus Infection. *PLoS One* **2020**, *15*, e0237141, doi:10.1371/journal.pone.0237141.
82. Costa, F.; Hagan, J.E.; Calcagno, J.; Kane, M.; Torgerson, P.; Martinez-Silveira, M.S.; Stein, C.; Abela-Ridder, B.; Ko, A.I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* **2015**, *9*, e0003898, doi:10.1371/journal.pntd.0003898.
83. Picardeau, M. Virulence of the Zoonotic Agent of Leptospirosis: Still Terra Incognita? *Nat Rev Microbiol* **2017**, *15*, 297–307, doi:10.1038/nrmicro.2017.5.
84. Haake, D.A.; Levett, P.N. Leptospirosis in Humans. In *Leptospira and Leptospirosis*; Adler, B., Ed.; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015; Vol. 387, pp. 65–97 ISBN 978-3-662-45058-1.
85. Guernier, V.; Lagadec, E.; Cordonin, C.; Le Minter, G.; Gomard, Y.; Pagès, F.; Jaffar-Bandjee, M.-C.; Michault, A.; Tortosa, P.; Dellagi, K. Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame? *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10*,

e0004733, doi:10.1371/journal.pntd.0004733.

86. Ristow, P.; Bourhy, P.; Kerneis, S.; Schmitt, C.; Prevost, M.-C.; Lilenbaum, W.; Picardeau, M. Biofilm Formation by Saprophytic and Pathogenic Leptospire. *Microbiology (Reading)* **2008**, *154*, 1309–1317, doi:10.1099/mic.0.2007/014746-0.
87. Bourhy, P.; Collet, L.; Brisse, S.; Picardeau, M. *Leptospira Mayottensis* Sp. Nov., a Pathogenic Species of the Genus *Leptospira* Isolated from Humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2014**, *64*, 4061–4067, doi:10.1099/ij.s.0.066597-0.
88. Subiros, M.; Collet, L.; Pagès, F.; Aboubacar, A.; Ruello, M.; Bourhy, P. Outbreak of Leptospirosis in an Endemic French Territory, Mayotte, 2016. *2017*, 529–536.
89. Cordonin, C.; Turpin, M.; Bascands, J.-L.; Dellagi, K.; Mavingui, P.; Tortosa, P.; Roche, M. Three *Leptospira* Strains From Western Indian Ocean Wildlife Show Highly Distinct Virulence Phenotypes Through Hamster Experimental Infection. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 382, doi:10.3389/fmicb.2019.00382.
90. Cordonin, C.; Turpin, M.; Bringart, M.; Bascands, J.-L.; Flores, O.; Dellagi, K.; Mavingui, P.; Roche, M.; Tortosa, P. Pathogenic *Leptospira* and Their Animal Reservoirs: Testing Host Specificity through Experimental Infection. *Sci Rep* **2020**, *10*, 7239, doi:10.1038/s41598-020-64172-4.
91. Zaid, A.; Burt, F.J.; Liu, X.; Poo, Y.S.; Zandi, K.; Suhrbier, A.; Weaver, S.C.; Teixeira, M.M.; Mahalingam, S. Arthritogenic Alphaviruses: Epidemiological and Clinical Perspective on Emerging Arboviruses. *Lancet Infect Dis* **2020**, doi:10.1016/S1473-3099(20)30491-6.
92. Legros, V.; Jeannin, P.; Burlaud-Gaillard, J.; Chaze, T.; Gianetto, Q.G.; Butler-Browne, G.; Mouly, V.; Zoladek, J.; Afonso, P.V.; González, M.-N.; et al. Differentiation-Dependent Susceptibility of Human Muscle Cells to Zika Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* **2020**, *14*, e0008282, doi:10.1371/journal.pntd.0008282.
93. Petrova, E.; Gracias, S.; Beauclair, G.; Tangy, F.; Jouvenet, N. Uncovering Flavivirus Host Dependency Factors through a Genome-Wide Gain-of-Function Screen. *Viruses* **2019**, *11*, doi:10.3390/v11010068.
94. Prasad, D.; Bhargavanshi, A. Clinical Profile, Liver Dysfunction and Outcome of Dengue Infection in Children: A Prospective Observational Study. *Pediatric Infectious Disease Journal* **2020**, *39*, 97–101, doi:10.1097/INF.0000000000002519.
95. Dalugama, C.; Gawarammana, I.B. Lessons Learnt from Managing a Case of Dengue Hemorrhagic Fever Complicated with Acute Liver Failure and Acute Kidney Injury: A Case Report. *J Med Case Reports* **2018**, *12*, 215, doi:10.1186/s13256-018-1766-0.
96. Leroy E. *La Dengue: Symptômes, Traitement, Prévention, Où En Est-On?*; BoD-Books on Demand; 2017;
97. HAS Haute Autorité de Santé Place Du Vaccin Dengvaxia® Dans La Stratégie de Lutte Contre La Dengue Dans Les Départements Français d’Outre-Mer- Mayotte et Territoires Français d’Amérique 2019.
98. Santé Publique France Dengue à La Réunion : Inter Épidémie Point de Situation Au 2 Août 2020 2020.
99. Chuah, K.H.; Ng, C.W.K.; Zabri, K.; Wong, C.L. Unusual Presentation of Severe Dengue: Dengue Maculopathy. *Med J Malaysia* **2017**, *72*, 73–74.
100. Santé Publique France Dengue à La Réunion : Epidémie En Cours Point de Situation Au 27 Avril 2021 2021.
101. Pancharoen, C.; Kulwichit, W.; Tantawichien, T.; Thisyakorn, U.; Thisyakorn, C. Dengue Infection: A Global Concern. *J Med Assoc Thai* **2002**, *85 Suppl 1*, S25-33.
102. Flamand M, Desprès P. La Dengue. In *médecine/sciences*; 2002; Vol. 18(8–9), pp. 816–8.
103. Verhagen, L.M.; de Groot, R. Dengue in Children. *J Infect* **2014**, *69 Suppl 1*, S77-86, doi:10.1016/j.jinf.2014.07.020.

104. Gubler, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev* **1998**, *11*, 480–496.
105. Despres P. Sur le risque de propagation de la dengue et du chikungunya en Europe du Sud. In *Les feuillets de biologie*; 2012; Vol. 304, pp. 39–51.
106. Katzelnick, L.C.; Gresh, L.; Halloran, M.E.; Mercado, J.C.; Kuan, G.; Gordon, A.; Balmaseda, A.; Harris, E. Antibody-Dependent Enhancement of Severe Dengue Disease in Humans. *Science* **2017**, *358*, 929–932, doi:10.1126/science.aan6836.
107. Tirado, S.M.C.; Yoon, K.-J. Antibody-Dependent Enhancement of Virus Infection and Disease. *Viral Immunology* **2003**, *16*, 69–86, doi:10.1089/088282403763635465.
108. Ubol, S.; Phuklia, W.; Kalayanarooj, S.; Modhiran, N. Mechanisms of Immune Evasion Induced by a Complex of Dengue Virus and Preexisting Enhancing Antibodies. *J INFECT DIS* **2010**, *201*, 923–935, doi:10.1086/651018.
109. Guy, B.; Jackson, N. Dengue Vaccine: Hypotheses to Understand CYD-TDV-Induced Protection. *Nat Rev Microbiol* **2016**, *14*, 45–54, doi:10.1038/nrmicro.2015.2.
110. Begum, F.; Das, S.; Mukherjee, D.; Mal, S.; Ray, U. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. *Viruses* **2019**, *11*, 1136, doi:10.3390/v11121136.
111. Flipse, J.; Torres, S.; Dioso-Toro, M.; van der Ende-Metselaar, H.; Herrera-Rodriguez, J.; Urcuqui-Inchima, S.; Huckriede, A.; Rodenhuis-Zybert, I.A.; Smit, J.M. Dengue Tropism for Macrophages and Dendritic Cells: The Host Cell Effect. *Journal of General Virology* **2016**, *97*, 1531–1536, doi:10.1099/jgv.0.000474.
112. Martina, B.E.E.; Koraka, P.; Osterhaus, A.D.M.E. Dengue Virus Pathogenesis: An Integrated View. *CMR* **2009**, *22*, 564–581, doi:10.1128/CMR.00035-09.
113. Chen, L.; Magliano, D.J.; Zimmet, P.Z. The Worldwide Epidemiology of Type 2 Diabetes Mellitus—Present and Future Perspectives. *Nat Rev Endocrinol* **2012**, *8*, 228–236, doi:10.1038/nrendo.2011.183.
114. Mandereau-Bruno, L. Prévalence Du Diabète Traité Pharmacologiquement (Tous Types) En France En 2015. Disparités Territoriales et Socio-Économiques. *Santé Publique France* 2017.
115. Shu, P.-Y.; Wei, H.-Y.; Hung, M.-N. Characteristics and Risk Factors for Fatality in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever, Taiwan, 2014. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **2016**, *95*, 322–327, doi:10.4269/ajtmh.15-0905.
116. Tsalamandris, S.; First Cardiology Clinic, Hippokration General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, Athens, Greece; Antonopoulos, A.S.; First Cardiology Clinic, Hippokration General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, Athens, Greece; Oikonomou, E.; First Cardiology Clinic, Hippokration General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, Athens, Greece; Papamikroulis, G.-A.; First Cardiology Clinic, Hippokration General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, Athens, Greece; Vogiatzi, G.; First Cardiology Clinic, Hippokration General Hospital, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, Athens, Greece; et al. The Role of Inflammation in Diabetes: Current Concepts and Future Perspectives. *European Cardiology Review* **2019**, *14*, 50, doi:10.15420/ecr.2018.33.1.
117. Dobi, A.; Bravo, S.B.; Veeren, B.; Paradela-Dobarro, B.; Álvarez, E.; Meilhac, O.; Viranaicken, W.; Baret, P.; Devin, A.; Rondeau, P. Advanced Glycation End-Products Disrupt Human Endothelial Cells Redox Homeostasis: New Insights into Reactive Oxygen Species Production. *Free Radical Research* **2019**, *53*, 150–169, doi:10.1080/10715762.2018.1529866.
118. Póvoa, T.F.; Alves, A.M.B.; Oliveira, C.A.B.; Nuovo, G.J.; Chagas, V.L.A.; Paes, M.V. The Pathology of Severe Dengue in Multiple Organs of Human Fatal Cases: Histopathology, Ultrastructure and Virus Replication. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e83386,

doi:10.1371/journal.pone.0083386.

119. Cui, L.; Pang, J.; Lee, Y.H.; Ooi, E.E.; Ong, C.N.; Leo, Y.S.; Tannenbaum, S.R. Serum Metabolome Changes in Adult Patients with Severe Dengue in the Critical and Recovery Phases of Dengue Infection. *PLoS Negl Trop Dis* **2018**, *12*, e0006217, doi:10.1371/journal.pntd.0006217.
120. Martín-Acebes, M.A.; Vázquez-Calvo, Á.; Saiz, J.-C. Lipids and Flaviviruses, Present and Future Perspectives for the Control of Dengue, Zika, and West Nile Viruses. *Progress in Lipid Research* **2016**, *64*, 123–137, doi:10.1016/j.plipres.2016.09.005.
121. Fernandes-Siqueira, L.O.; Zeidler, J.D.; Sousa, B.G.; Ferreira, T.; Da Poian, A.T. Anaplerotic Role of Glucose in the Oxidation of Endogenous Fatty Acids during Dengue Virus Infection. *mSphere* **2018**, *3*, e00458-17, doi:10.1128/mSphere.00458-17.
122. Nguyen, T.L.; Nguyen, T.H.; Tieu, N.T. The Impact of Dengue Haemorrhagic Fever on Liver Function. *Research in Virology* **1997**, *148*, 273–277, doi:10.1016/S0923-2516(97)88364-1.
123. Torrentes-Carvalho, A.; Azeredo, E.L.; Reis, S.R.; Miranda, A.S.; Gandini, M.; Barbosa, L.S.; Kubelka, C.F. Dengue-2 Infection and the Induction of Apoptosis in Human Primary Monocytes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 1091–1099, doi:10.1590/S0074-02762009000800005.
124. Beltrán, D.; López-Vergès, S. NK Cells during Dengue Disease and Their Recognition of Dengue Virus-Infected Cells. *Front Immunol* **2014**, *5*, 192, doi:10.3389/fimmu.2014.00192.
125. Noisakran, S.; Chokephaibulkit, K.; Songprakhon, P.; Onlamoon, N.; Hsiao, H.-M.; Villinger, F.; Ansari, A.; Perng, G.C. A Re-Evaluation of the Mechanisms Leading to Dengue Hemorrhagic Fever. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, *1171*, E24–E35, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05050.x.
126. Hottz, E.D.; Oliveira, M.F.; Nunes, P.C.G.; Nogueira, R.M.R.; Valls-de-Souza, R.; Da Poian, A.T.; Weyrich, A.S.; Zimmerman, G.A.; Bozza, P.T.; Bozza, F.A. Dengue Induces Platelet Activation, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death through Mechanisms That Involve DC-SIGN and Caspases. *J Thromb Haemost* **2013**, *11*, 951–962, doi:10.1111/jth.12178.
127. Wirtz, T.H.; Tillmann, S.; Strüßmann, T.; Kraemer, S.; Heemskerk, J.W.M.; Grottke, O.; Gawaz, M.; von Hundelshausen, P.; Bernhagen, J. Platelet-Derived MIF: A Novel Platelet Chemokine with Distinct Recruitment Properties. *Atherosclerosis* **2015**, *239*, 1–10, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.039.
128. Assunção-Miranda, I.; Amaral, F.A.; Bozza, F.A.; Fagundes, C.T.; Sousa, L.P.; Souza, D.G.; Pacheco, P.; Barbosa-Lima, G.; Gomes, R.N.; Bozza, P.T.; et al. Contribution of Macrophage Migration Inhibitory Factor to the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *FASEB j.* **2010**, *24*, 218–228, doi:10.1096/fj.09-139469.
129. Kanlaya, R.; Pattanakitsakul, S.; Sinchaikul, S.; Chen, S.-T.; Thongboonkerd, V. Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein Complexes in Human Endothelial Cells Induced by Dengue Virus Infection and Mimicry of Leukocyte Transendothelial Migration. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 2551–2562, doi:10.1021/pr900060g.
130. Modhiran, N.; Watterson, D.; Muller, D.A.; Panetta, A.K.; Sester, D.P.; Liu, L.; Hume, D.A.; Stacey, K.J.; Young, P.R. Dengue Virus NS1 Protein Activates Cells via Toll-like Receptor 4 and Disrupts Endothelial Cell Monolayer Integrity. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 304ra142–304ra142, doi:10.1126/scitranslmed.aaa3863.
131. Chao, C.-H.; Wu, W.-C.; Lai, Y.-C.; Tsai, P.-J.; Perng, G.-C.; Lin, Y.-S.; Yeh, T.-M. Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Activates Platelets via Toll-like Receptor 4, Leading to Thrombocytopenia and Hemorrhage. *PLoS Pathog* **2019**, *15*, e1007625, doi:10.1371/journal.ppat.1007625.



132. Wan, S.-W.; Yang, Y.-W.; Chu, Y.-T.; Lin, C.-F.; Chang, C.-P.; Yeh, T.-M.; Anderson, R.; Lin, Y.-S. Anti-Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Antibodies Contribute to Platelet Phagocytosis by Macrophages. *Thromb Haemost* **2016**, *115*, 646–656, doi:10.1160/TH15-06-0498.
133. Lee, P.X.; Ting, D.H.R.; Boey, C.P.H.; Tan, E.T.X.; Chia, J.Z.H.; Idris, F.; Oo, Y.; Ong, L.C.; Chua, Y.L.; Hapuarachchi, C.; et al. Relative Contribution of Nonstructural Protein 1 in Dengue Pathogenesis. *Journal of Experimental Medicine* **2020**, *217*, e20191548, doi:10.1084/jem.20191548.
134. Alcon-LePoder, S.; Drouet, M.-T.; Roux, P.; Frenkiel, M.-P.; Arborio, M.; Durand-Schneider, A.-M.; Maurice, M.; Le Blanc, I.; Gruenberg, J.; Flamand, M. The Secreted Form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is Endocytosed by Hepatocytes and Accumulates in Late Endosomes: Implications for Viral Infectivity. *JVI* **2005**, *79*, 11403–11411, doi:10.1128/JVI.79.17.11403-11411.2005.
135. Cunningham, S.C.; Alexander, I.E. AAV-Mediated Gene Delivery to the Mouse Liver. *Methods Mol Biol* **2019**, *1937*, 213–219, doi:10.1007/978-1-4939-9065-8\_12.
136. Vilà, L.; Elias, I.; Roca, C.; Ribera, A.; Ferré, T.; Casellas, A.; Lage, R.; Franckhauser, S.; Bosch, F. AAV8-Mediated Sirt1 Gene Transfer to the Liver Prevents High Carbohydrate Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **2014**, *1*, 14039, doi:10.1038/mtm.2014.39.
137. Arcambal, A.; Taïlé, J.; Couret, D.; Planesse, C.; Veeren, B.; Diotel, N.; Gauvin-Bialecki, A.; Meilhac, O.; Gonthier, M.-P. Protective Effects of Antioxidant Polyphenols against Hyperglycemia-Mediated Alterations in Cerebral Endothelial Cells and a Mouse Stroke Model. *Mol Nutr Food Res* **2020**, *64*, e1900779, doi:10.1002/mnfr.201900779.
138. Le Garf, S. Approche Immunométabolique Du Traitement de l'obésité Par Une Activation de La Voie PPAR $\beta/\delta$  Ou Un Apport En Acide  $\alpha$ -Lipoïque Dans Une Étude Translationnelle 2020.
139. Chiu, Y.-L.; Tsai, W.-C.; Hung, R.-W.; Chen, I.-Y.; Shu, K.-H.; Pan, S.-Y.; Yang, F.-J.; Ting, T.-T.; Jiang, J.-Y.; Peng, Y.-S.; et al. Emergence of T Cell Immunosenescence in Diabetic Chronic Kidney Disease. *Immun Ageing* **2020**, *17*, 31, doi:10.1186/s12979-020-00200-1.
140. Hsieh, T.-H.; Tsai, T.-T.; Chen, C.-L.; Shen, T.-J.; Jhan, M.-K.; Tseng, P.-C.; Lin, C.-F. Senescence in Monocytes Facilitates Dengue Virus Infection by Increasing Infectivity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 375, doi:10.3389/fcimb.2020.00375.
141. Lee, K.; Robbins, P.D.; Camell, C.D. Intersection of Immunometabolism and Immunosenescence during Aging. *Current Opinion in Pharmacology* **2021**, *57*, 107–116, doi:10.1016/j.coph.2021.01.003.
142. Jhang, J.-J.; Yen, G.-C. The Role of Nrf2 in NLRP3 Inflammasome Activation. *Cell Mol Immunol* **2017**, *14*, 1011–1012, doi:10.1038/cmi.2017.114.
143. Pei, D.; Dai, J.; Kuang, Y.; Wang, H.; Ren, L.; Shao, J.; Zuo, B.; Li, S.; Jiang, Z.; Li, M. Effect of Influenza A Virus Non-Structural Protein 1(NS1) on a Mouse Model of Diabetes Mellitus Induced by Streptozotocin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, *419*, 120–125, doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.146.
144. Patterson, J.; Sammon, M.; Garg, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *WestJEM* **2016**, *17*, 671–679, doi:10.5811/westjem.2016.9.30904.
145. Higuera, A.; Ramírez, J.D. Molecular Epidemiology of Dengue, Yellow Fever, Zika and Chikungunya Arboviruses: An Update. *Acta Tropica* **2019**, *190*, 99–111, doi:10.1016/j.actatropica.2018.11.010.
146. Culshaw, A.; Mongkolsapaya, J.; Screaton, G.R. The Immunopathology of Dengue and Zika Virus Infections. *Current Opinion in Immunology* **2017**, *48*, 1–6,

doi:10.1016/j.coi.2017.07.001.

147. Langerak, T.; Mumtaz, N.; Tolk, V.I.; van Gorp, E.C.M.; Martina, B.E.; Rockx, B.; Koopmans, M.P.G. The Possible Role of Cross-Reactive Dengue Virus Antibodies in Zika Virus Pathogenesis. *PLoS Pathog* **2019**, *15*, e1007640, doi:10.1371/journal.ppat.1007640.
148. Noda, A.A.; Grillová, L.; Mariet, J.-F.; Paiffer, N.B.; Ruiz, Y.C.; Rodríguez, I.; Echevarría, E.; Obregón, A.M.; Lienhard, R.; Picardeau, M. A First Insight into the Genomic Diversity of Leptospira Strains Isolated from Patients in Cuba. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0229673, doi:10.1371/journal.pone.0229673.
149. Jorge, S.; Kremer, F.S.; Oliveira, N.R. de; Navarro, G. de O.S.V.; Guimarães, A.M.; Sanchez, C.D.; Woloski, R.D. dos S.; Ridieri, K.F.; Campos, V.F.; Pinto, L. da S.; et al. Whole-Genome Sequencing of Leptospira Interrogans from Southern Brazil: Genetic Features of a Highly Virulent Strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, 80–86, doi:10.1590/0074-02760170130.
150. Haake, D.A.; Matsunaga, J. Leptospira: A Spirochaete with a Hybrid Outer Membrane: Leptospiral Outer Membrane. *Molecular Microbiology* **2010**, no-no, doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x.
151. Yamaguchi, T.; Higa, N.; Okura, N.; Matsumoto, A.; Hermawan, I.; Yamashiro, T.; Suzuki, T.; Toma, C. Characterizing Interactions of Leptospira Interrogans with Proximal Renal Tubule Epithelial Cells. *BMC Microbiol* **2018**, *18*, 64, doi:10.1186/s12866-018-1206-8.
152. Santecchia, I.; Vernel-Pauillac, F.; Rasid, O.; Quintin, J.; Gomes-Solecki, M.; Boneca, I.G.; Werts, C. Innate Immune Memory through TLR2 and NOD2 Contributes to the Control of Leptospira Interrogans Infection. *PLoS Pathog* **2019**, *15*, e1007811, doi:10.1371/journal.ppat.1007811.
153. Charo, N.; Scharrig, E.; Ferrer, M.F.; Sanjuan, N.; Carrera Silva, E.A.; Schattner, M.; Gómez, R.M. Leptospira Species Promote a Pro-inflammatory Phenotype in Human Neutrophils. *Cellular Microbiology* **2019**, *21*, doi:10.1111/cmi.12990.
154. Liberopoulos, E.; Apostolou, F.; Elisaf, M. Serum Lipid Profile in Patients with Severe Leptospirosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2004**, *19*, 1328–1329, doi:10.1093/ndt/gfh054.
155. Gazi, I.F.; Apostolou, F.A.; Liberopoulos, E.N.; Filippatos, T.D.; Tellis, C.C.; Elisaf, M.S.; Tselepis, A.D. Leptospirosis Is Associated with Markedly Increased Triglycerides and Small Dense Low-Density Lipoprotein and Decreased High-Density Lipoprotein. *Lipids* **2011**, *46*, 953–960, doi:10.1007/s11745-011-3580-y.

## I. Annexes : Articles choisis



## Olive phenols efficiently inhibit the oxidation of serum albumin-bound linoleic acid and butyrylcholine esterase

Marjolaine Roche<sup>a,\*</sup>, Claire Dufour<sup>a,\*</sup>, Michèle Loonis<sup>a</sup>, Marianne Reist<sup>b</sup>,  
Pierre-Alain Carrupt<sup>b</sup>, Olivier Dangles<sup>a</sup>

<sup>a</sup> UMR408 Safety and Quality of Plant Products, INRA, University of Avignon, Domaine St Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon, France  
<sup>b</sup> University of Geneva - Section of pharmacy - LCT - Pharmacochimie, Quai Ernest-Ansermet 30, CH-1211 Geneva 4, Switzerland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 September 2008  
Received in revised form 15 January 2009  
Accepted 19 January 2009  
Available online 7 February 2009

#### Keywords:

Antioxidant  
Olive phenols  
Serum albumin  
Butyrylcholine esterase  
Lipid peroxidation  
Binding site

### ABSTRACT

**Background:** Olive phenols are widely consumed in the Mediterranean diet and can be detected in human plasma. Here, the capacity of olive phenols and plasma metabolites to inhibit lipid and protein oxidations is investigated in two plasma models.

**Methods:** The accumulation of lipid oxidation products issued from the oxidation of linoleic acid bound to human serum albumin (HSA) by AAPH-derived peroxy radicals is evaluated in the presence and absence of phenolic antioxidants. Phenol binding to HSA is addressed by quenching of the Trp214 fluorescence and displacement of probes (quercetin, dansylsarcosine and dansylamide). Next, the esterase activity of HSA-bound butyrylcholine esterase (BChE) is used as a marker of protein oxidative degradation.

**Results:** Hydroxytyrosol, oleuropein, caffeic and chlorogenic acids inhibit lipid peroxidation as well as HSA-bound BChE as efficiently as the potent flavonol quercetin. Hydroxycinnamic derivatives bind noncompetitively HSA subdomain IIA whereas no clear site could be identified for hydroxytyrosol derivatives.

**General significance:** In both models, olive phenols and their metabolites are much more efficient inhibitors of lipid and protein oxidations compared to vitamins C and E. Low postprandial concentrations of olive phenols may help to preserve the integrity of functional proteins and delay the appearance of toxic lipid oxidation products.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Oxidative modification of proteins and polyunsaturated fatty acids (PUFA) play a key role in the development of cardiovascular and neurodegenerative diseases [1–4]. These deleterious oxidation processes involve reactive oxygen and nitrogen species (RONS) such as superoxide, nitric oxide and peroxynitrite that can form from circulating blood leukocytes in response to various inflammatory stimuli [5–6]. Fortunately, protection of endogenous biomolecules is afforded by antioxidant enzymes and a broad range of nonenzymatic antioxidants such as urate, glutathione, vitamins C and E and dietary phenols [7]. Consistently, epidemiological data suggest that the so-called Mediterranean diet, typically rich in antioxidants from vegetables, fruits, cereals and olive oil, shows significant protective health effects [8]. Olive oil and olives are rich in oleic acid, a monounsaturated fatty acid, and a variety of phenolic antioxidants

such as tocopherols, caffeic acid as well as the more typical tyrosol, hydroxytyrosol and their elenolic esters [9,10]. Interestingly, more than 50% of tyrosol and hydroxytyrosol were found to be absorbed through the intestine after ingestion of olive oil by humans [11–13] and only partially excreted in the urine under their native forms or as glucuronides of the native and catechol-O-methylated forms [14]. On the other hand, caffeic acid is recovered in plasma unchanged or metabolized by methylation, hydrogenation, glucuronidation and sulfation [15,16]. Regarding possible health effects, ingestion by humans of extra virgin olive oil significantly decreased inflammatory markers in plasma [17]. Furthermore, hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effects were observed after oral administration of olive phenols to rats and rabbits [18,19]. Olive phenols also decrease levels of reactive oxygen species in macrophages, melanoma and endothelial cells, thus preventing protein damage and lipid peroxidation [20–22]. Part of these activities may involve their strong capacity to scavenge free radicals and inhibit lipid peroxidation [23,24]. In particular, plasma low-density lipoproteins were shown to be protected from oxidation after absorption of a meal rich in olive phenols [25].

Human serum albumin (HSA) is the most abundant protein in serum and a potent plasma antioxidant [26,27]. Albumin dimers have been proposed to be markers of oxidative stress following plasma

**Abbreviations:** HSA, human serum albumin; BChE, butyrylcholine esterase; PUFA, polyunsaturated fatty acid; HODE, hydroxyoctadecadienoic acid; HPODE, hydroperoxyoctadecadienoic acid; KODE, oxooctadecadienoic acid; AAPH, 2,2'-azo-bis(2-methylpropionamide dihydrochloride)

\* Corresponding author. Tel.: +33 432 72 25 15; fax: +33 432 72 24 92.  
E-mail address: [Claire.Dufour@avignon.inra.fr](mailto:Claire.Dufour@avignon.inra.fr) (C. Dufour).

exposure to peroxides [28]. HSA plays an important role in the transport of endogenous and exogenous ligands, especially fatty acids [29], xenobiotics such as drugs [26] and dietary components including polyphenols [30–33]. Recently, we developed a physiologically-relevant model of antioxidant activity in the plasma based on the ability of dietary antioxidants to inhibit the peroxidation of HSA-bound linoleic acid [34,35].

The plasma protein butyrylcholine esterase (BChE) belongs to the ubiquitous polymorphic family of choline esterases [36]. This enzyme, which is typically extracted in association with HSA [37], catalyzes the hydrolysis of a variety of esters including succinylcholine, a muscular relaxant, cocaine and heroin. BChE seems to be implicated in lipoprotein metabolism since a strong choline esterase activity was detected in the serum of hyperlipidaemic patients [38]. HSA-bound BChE was shown to be protected against oxidation by several naturally occurring phenols [39].

The present study is aimed at determining the capacity of olive phenols to inhibit the oxidation of HSA-bound linoleic acid and butyrylcholine esterase as potential lipid and protein targets of RONS in plasma. The antioxidants selected are tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropein and caffeic acid as the major olive phenols, dihydrocaffeic acid and ferulic acid as caffeic acid metabolites in the intestine and plasma, respectively. The antioxidant potential of chlorogenic acid is addressed not only because it is the main dietary source of caffeic acid but also in view of its demonstrated plasma availability [40]. The flavonol quercetin, L-ascorbate,  $\alpha$ -tocopherol and *n*-hexadecylcaffeate, a chemically synthesized amphiphilic derivative of caffeic acid [24], are also investigated for comparison.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Hydroxytyrosol (HT) and *n*-hexadecylcaffeate were synthesized as previously described [25]. Dansylsarcosine (DNSS), dansylamide (DNSA), caffeic acid, chlorogenic acid, dihydrocaffeic acid, *p*-coumaric acid, ( $\pm$ )  $\alpha$ -tocopherol, quercetin, L-ascorbic acid, 2,2'-azo-bis(2-methylpropanamide dihydrochloride) (AAPH), moxsislyte, linoleic acid (LH), 13(S)-hydroperoxy-(9Z,11E)-octadecadienoic acid, 13(S)-hydroxy-(9Z,11E)-octadecadienoic acid, human serum albumin (fatty acid-free, A-1887 and fraction V, A-1653) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ferulic acid, tyrosol and oleuropein were purchased from Extrasynthèse (Genay, France). BCECF (2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). All reagents were of the highest purity available (95–99%) and were used without purification. All solvents used were analytical grade.

### 2.2. Inhibition of the peroxidation of HSA-bound linoleic acid

HSA (fatty acid free) was dissolved in a 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 100 mM NaCl buffer at pH 7.4 (Millipore Q-Plus water) previously eluted on Chelex 100 (0.4 mequiv/mL – Bio-Rad) to remove contaminating metal traces. To 3 mL of 0.5 mM HSA was added under stirring 30  $\mu$ L of a freshly prepared 200 mM solution of linoleic acid in MeOH. After 10 min of homogenization, 30  $\mu$ L of a 5 mM solution of antioxidant in MeOH was added followed 1 min later by 42 mg of AAPH. The reaction mixture was stirred in an oven (225 rpm) at 37 °C for 10 h. Aliquots (200  $\mu$ L) were removed every hour for lipid analysis and every 10 min for antioxidant analysis then placed immediately on ice. Protein removal was achieved by acidification with 10  $\mu$ L of 1 M HCl, addition of 400  $\mu$ L of a 500  $\mu$ M solution of L-ascorbic acid in THF/MeCN (2:3), then centrifugation at 10,000 g during 3 min. For HPLC analyses, 30  $\mu$ L of the supernatant were immediately injected. All experiments were run in triplicates.

### 2.3. Analyses of lipid peroxidation products

HPLC analyses were carried out on a Hewlett-Packard 1100 apparatus coupled to a UV-Vis diode array detector. An Alltima C18 reverse phase column (150 mm  $\times$  4.6 mm, pre-column of 4.6  $\times$  7.5 mm, particle size 5  $\mu$ m, Alltech) was used for the chromatographic separations at 35 °C. The solvent system was a gradient of A (0.05% aqueous HCO<sub>2</sub>H) and B (MeCN) with 5% B at 0 min, 20% B at 4 min, 50% B at 13 min, 60% B at 23 min, 73% B at 38 min and 100% B at 45 min with a flow rate of 1 mL/min. UV detection was set at 234 nm (HPODE and HODE), 280 nm (KODE) or 210 nm (linoleic acid LH). Calibration curves provided the following conversion factors (defined as concentration ( $\mu$ M) = peak area (mAU/min)  $\times$  Cf): Cf<sub>210 nm</sub> (LH) = 1.6, Cf<sub>234 nm</sub> (HPODE) = 10, Cf<sub>234 nm</sub> (HODE) = 10 and Cf<sub>280 nm</sub> (KODE) = 2 [41]. Cf values of HPODE and HODE were obtained with 13(S)-hydroperoxy-(9Z,11E)-octadecadienoic acid and 13(S)-hydroxy-(9Z,11E)-octadecadienoic acid, respectively. Cf of KODE was obtained using a mixture of 4 synthesized isomers.

### 2.4. Antioxidant consumption

The decay of the antioxidants was followed with the same HPLC conditions as above except for the gradient which was 5% B at 0 min, 20% B at 4 min, 50% B at 13 min and 100% B at 15 min. The solvents were a solution of 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM hexadecyltrimethylammonium bromide and 1 mM EDTA at pH 5 for L-ascorbic acid. and isocratic MeOH for  $\alpha$ -tocopherol.

### 2.5. Fluorescence spectroscopy

#### 2.5.1. Tryptophan fluorescence

To 2 mL of 75  $\mu$ M HSA in a pH 7.4 buffer (50 mM phosphate – 100 mM NaCl) were added via syringe aliquots of 7.5 mM phenol solutions in MeOH. The fluorescence spectra were monitored at 25 °C with a Xenius spectrofluorometer (SAFAS, France) by excitation of the tryptophan residue at 295 nm. The excitation and emission slit widths were set at 10 nm.

#### 2.5.2. Marker displacement

To 2 mL of 75  $\mu$ M HSA in the above pH 7.4 buffer were added 20  $\mu$ L of 7.5 mM marker solutions in MeOH. After equilibration, aliquots of 30 mM phenol solutions in MeOH were then added and the fluorescence spectra were monitored at 25 °C by excitation of either HSA-bound quercetin at 450 nm or HSA-bound DNSS or DNSA at 360 nm [30].

Fluorescence intensities were corrected from the inner filter effect of the phenolic ligand according to the following relation [42]:

$$F_{\text{corr.}} = F_{\text{meas.}} \cdot \epsilon c (l_2 - l_1) \ln 10 / (10^{-\epsilon l_1 c} - 10^{-\epsilon l_2 c})$$

Where  $F_{\text{corr.}}$  and  $F_{\text{meas.}}$  are respectively the corrected and measured fluorescence intensities,  $\epsilon$  is the molar absorption coefficient of the added phenol at the excitation wavelength,  $l_1$  and  $l_2$  are the lower and upper distances from the bottom cell where light is transmitted to the photomultiplier and  $c$  is the phenol concentration. In this system,  $l_1$  and  $l_2$  were evaluated as 0.45 and 0.85 cm, respectively.

The respective molar absorption coefficients were evaluated in the buffer by UV-Vis spectroscopy. They were calculated as the slope of the absorbance vs. concentration plot for at least 5 incremental aliquots ( $n=2-3$ ). Couples of  $\epsilon$  are given in M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 295 and 360 nm, respectively: caffeic acid (14,100, 900), chlorogenic acid (14,000, 5750), ferulic acid (14,470, 600), dihydrocaffeic acid (495, NA), quercetin (9400, NA), oleuropein (690, NA) and hydroxytyrosol (420, NA).

## 2.6. Inhibition of butyrylcholine esterase oxidation [39]

Fluorescence analyses were carried out on a SAFAS flx apparatus containing a ten-cell holder (optical pathlength: 1 cm). The temperature was controlled by a water-thermostated bath. To 3.4 mL of a pH 7.4 phosphate buffer (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , ionic strength set at the human blood value of 174 mM by KCl) were added 400  $\mu\text{L}$  of a 250  $\mu\text{M}$  solution of HSA (fraction V) and 40  $\mu\text{L}$  of an antioxidant solution in MeOH (except for *n*-hexadecylcaffeate dissolved in MeOH/DMSO (1/1)) to a final concentration of 0.1–100  $\mu\text{M}$ . The solution was incubated for 10 min at 40 °C under stirring (150 rpm). Then, 100  $\mu\text{L}$  of a freshly prepared 80 mM solution of AAPH in phosphate buffer were added and the solution was incubated for 120 min at 40 °C under stirring (150 rpm). Then, the incubated solution was placed in a quartz cell and 15  $\mu\text{L}$  of a 19.2  $\mu\text{M}$  solution of BCECF in water followed by 30  $\mu\text{L}$  of a freshly prepared 0.1 M solution of moxisylyte in water were added. After brief manual stirring, the fluorescence measurement was started at 37 °C over 15 min (excitation wavelengths: 442 nm and 503 nm, emission wavelength: 530 nm). The percentage of remaining activity  $P_{\text{RA}}$  was defined as  $100 \times (p/p_{\text{control}})$ ,  $p_{\text{control}}$  being the slope of the  $I_{\text{BCECF}}$  vs. time plot without antioxidant and AAPH, and  $p$  the slope of the  $I_{\text{BCECF}}$  vs. time plot with the antioxidant and AAPH (slopes evaluated in the linear portion of the curves between 4 and 12 min).  $P_{\text{RA}}$  was plotted as a function of  $\log C$  ( $C$ : antioxidant concentration, 8 values selected around the  $\text{EC}_{50}$ ) to extract  $p\text{EC}_{50} = -\log\text{EC}_{50}$ .

## 2.7. Data analysis

The Prism V3.0 program (GraphPad Software, San Diego, USA) was used in the curve-fitting procedures using a sigmoid equation for the calculation of  $\text{EC}_{50}$  values.

## 3. Results

In both antioxidant tests, a constant flow of hydrophilic peroxy radicals is produced via the thermal decomposition of the diazo compound AAPH. The capacity of olive phenols and other antioxidants (Fig. 1) to protect HSA-bound linoleic acid (LH) and butyrylcholine esterase (BChE) against oxidation was evaluated.

### 3.1. Inhibition of the peroxidation of HSA-bound linoleic acid by olive phenols

The peroxidation of HSA-bound linoleic acid (C18:2) leads to a mixture of hydroperoxyoctadecadienoic (HPODE), hydroxyoctadeca-

dienoic (HODE) and oxooctadecadienoic (KODE) acids. Within each family, a mixture of four (9/13) regio- and (*Z/E*) diastereoisomers could be evidenced by mass spectrometry and NMR [42]. After 4 h, additional products resulting from the cleavage of the hydrocarbon chain could be detected (data not shown).

In the absence of antioxidant, a short lag phase of ca. 1 h was observed in the accumulation of HPODE, HODE and KODE (Fig. 2). Then, the rate of formation of the oxidation products reached a maximal value and eventually decreased. The stronger trend toward saturation was achieved for HPODE, which emerged as the main products of the early phase of peroxidation and as likely precursors of HODE and KODE.

Lipid peroxidation was followed by HPLC for 10 h with different hydroxytyrosol concentrations (5–100  $\mu\text{M}$ ). The lowest antioxidant concentration showing significant inhibition was 10  $\mu\text{M}$ . In the presence of 50  $\mu\text{M}$  hydroxytyrosol, no consumption of linoleic acid was detectable during the first 2 h (Fig. 2). Peroxidation then set in with a profile similar to that observed in the absence of antioxidants although the rates of HPODE, HODE and KODE formation remained lower than the maximal rates without antioxidant. In addition, the HODE and KODE concentrations at 10 h were found to be decreased by, respectively, 17% and 28%.

For naturally occurring phenols having a 1,2-dihydroxybenzene (catechol) moiety, the lag phase in HPODE formation ( $T_{\text{lag}}$ ) is 2–3 times as long as the period required for total antioxidant consumption ( $T_a$ ) (Table 1), which shows that some of their oxidation products still retain a capacity to inhibit the peroxidation of linoleic acid in agreement with our previous observations [34,35]. This phenomenon reaches a maximum with quercetin, which is most rapidly consumed (shortest  $T_a$ ) and however emerges as the most efficient inhibitor (longest  $T_{\text{lag}}$ ). The small phenols hydroxytyrosol and caffeic acid display roughly the same efficiency as their more hydrophilic conjugates oleuropein and chlorogenic acid showing that the bulkiness of these hydrophilic substituents does not hinder the antioxidant activity. It just seems that the oxidation products of caffeic acid are better inhibitors than those derived from chlorogenic acid. Unlike catechols, tyrosol and  $\alpha$ -tocopherol come up as modest inhibitors, which moreover are not totally consumed after lipid peroxidation has resumed ( $T_{\text{lag}} < T_a$ ). Remarkably, the amphiphilic *n*-hexadecylcaffeate is both less efficient and less rapidly consumed than caffeic acid. Its consumption coincides with the outburst of peroxidation as if its oxidation products (formed during the lag phase) had no residual antioxidant activity. Finally, the hydrophilic *L*-ascorbate is rapidly consumed and exerts the weakest protection against lipid peroxidation.

Possible synergies between antioxidants were also checked. Combining *L*-ascorbate (50  $\mu\text{M}$ ) and hydroxytyrosol or caffeic acid

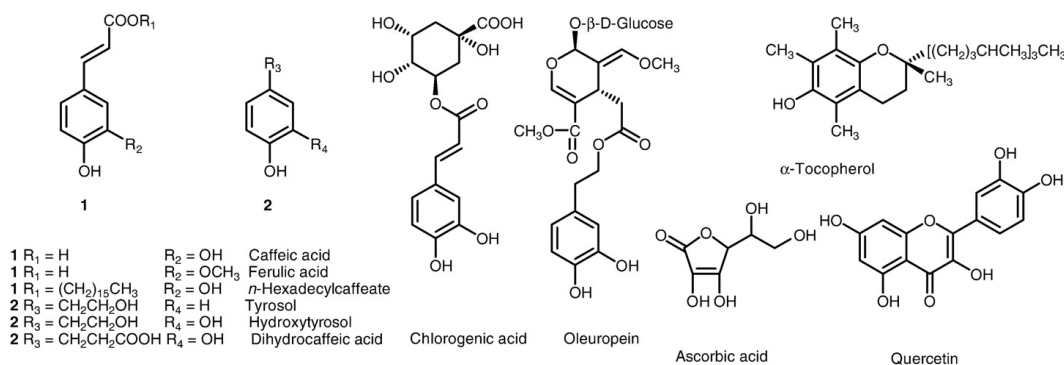
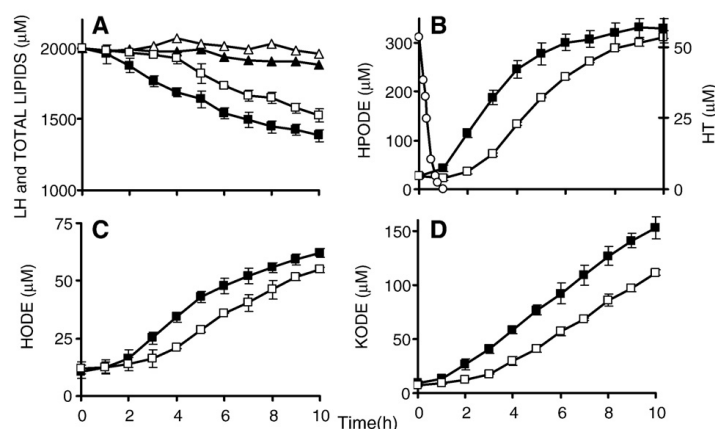


Fig. 1. Chemical structures of the selected antioxidants.



**Fig. 2.** Oxidation of HSA-bound linoleic acid at 37 °C. Open symbols: inhibition by hydroxytyrosol (HT), close symbols: control without antioxidant. (A) Time dependence of total lipids (▲,▲) and linoleic acid (■,□). (B) HPODE accumulation (■,□) and HT consumption (○). (C) HODE accumulation. (D) KODE accumulation. Initial concentrations: 0.5 mM HSA, 2 mM LH, 50 mM AAPH, 50 μM HT.

(1 μM) in concentrations close to the circulating concentrations did not allow to detect the possible regeneration of the phenolic antioxidants by L-ascorbate. Moreover, 25 μM of hydroxytyrosol combined with 25 μM of caffeic acid gave an intermediate  $T_{lag}$  meaning additive antioxidant effects (data not shown).

The antioxidants can be classified from the HPODE concentration accumulated in the presence of a fixed antioxidant concentration and after a given peroxidation period (Fig. 3A): quercetin > caffeic acid = oleuropein = chlorogenic acid = hydroxytyrosol = dihydrocaffeic acid > n-hexadecylcaffeate = tyrosol = ferulic acid = α-tocopherol > L-ascorbate. The same order was established from their capacity to delay the KODE production (Fig. 3B).

### 3.2. Binding of olive phenols to HSA

The binding of olive phenols to HSA was investigated by fluorescence spectroscopy. The fluorescence of HSA single tryptophan (Trp214) was monitored at 340 nm (ex. 295 nm) upon addition of increasing olive phenol concentrations. At a phenol/HSA ratio of 1, chlorogenic, caffeic and ferulic acids promoted a strong quenching of

the Trp214 fluorescence as observed for quercetin [30] (Fig. 4). By contrast, oleuropein, hydroxytyrosol and dihydrocaffeic acid did not modify the hydrophobic environment of Trp214, thus indicating no binding to the pocket accommodating the three hydroxycinnamic acids. Because the various phenols absorb light at the excitation wavelength, a correction for the inner filter effect was applied after evaluation of the respective molar absorption coefficients. Trp214 is part of the so-called subdomain IIA which is known to bind flavonoids [30–31] and drugs such as warfarin [26].

**Table 1**  
Inhibition of the peroxidation of HSA-bound linoleic acid (initial concentrations: 0.5 mM HSA, 2 mM LH, 50 mM AAPH, 50 μM antioxidant)

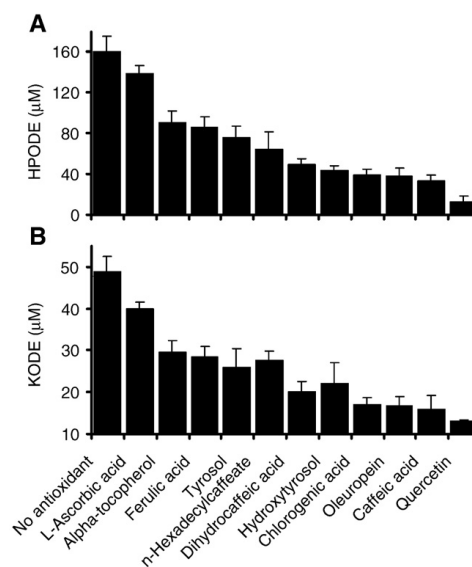
Antioxidant	$T_{lag}$ (min) <sup>a</sup>	$T_a$ (min) <sup>b</sup>	$R_p^{max}$ (μM/min) <sup>c</sup>	$R_a$ (μM/min) <sup>d</sup>
Quercetin	163 (±3)	50	0.92 (±0.06)	1.11 (±0.02)
Caffeic acid	153 (±11)	60	0.95 (±0.06)	0.81 (±0.03)
Chlorogenic acid	141 (±4)	60	0.91 (±0.14)	0.89 (±0.02)
Oleuropein	142 (±9)	60	0.83 (±0.01)	0.80 (±0.01)
Hydroxytyrosol	141 (±2)	50	0.92 (±0.02)	1.33 (±0.11)
Dihydrocaffeic acid	131 (±1)	60	0.86 (0.10)	0.91 (0.01)
n-Hexadecylcaffeate	118 (±10)	120	1.01 (±0.05)	0.41 (±0.01)
Ferulic acid	110 (±8)	80	1.19 (±0.08)	0.61 (±0.04)
Tyrosol	86 (±1)	240	0.78 (±0.08)	0.26 (±0.01)
α-Tocopherol	88 (±2)	180	0.92 (±0.07)	0.39 (±0.02)
L-Ascorbate	68 (±7)	40	1.12 (±0.01)	1.03 (±0.03)
Control	56 (±2)	–	1.08 (±0.09)	–

<sup>a</sup> Lag phase of the [HPODE] vs. time curve; n=2–4.

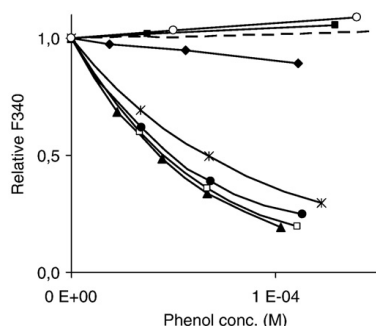
<sup>b</sup> Period required for complete consumption of the antioxidant (estimated error from duplicates = ±10 min).

<sup>c</sup> Maximal peroxidation rate, calculated from t=3 to 5 h (from t=1 to 3 h for the control) of the [HPODE] vs. time curve. Values are means (SD), n=2–4.

<sup>d</sup> Rate of antioxidant consumption.

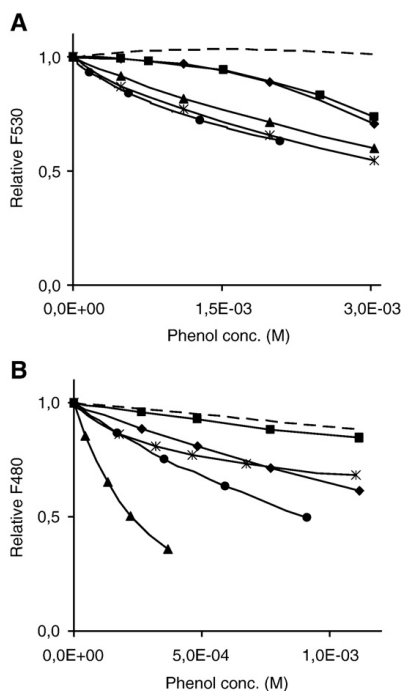


**Fig. 3.** Inhibition of the oxidation of HSA-bound linoleic acid by the selected antioxidants. (A) concentrations of HPODE accumulated after 3 h. (B) concentrations of KODE accumulated after 4 h (antioxidant concentration = 50 μM).



**Fig. 4.** Quenching of HSA Trp fluorescence by the selected phenols. Dihydrocaffeic acid (○), hydroxytyrosol (■), oleuropein (◆), caffeic acid (cross), ferulic acid (●), quercetin (□), chlorogenic acid (▲) and MeOH (dashed line). HSA concentration = 75 μM. *n* = 2 (mean dev. < 10%).

The binding site location for olive phenols was also investigated by displacement of probes bound to HSA. DNSA and quercetin were selected as markers of subdomain IIA and DNSS of subdomain IIIA [43–44]. In a first series of experiments, olive phenols were added to albumin and quercetin held in equimolar concentrations (75 μM) (Fig. 5A). With a mean binding constant of  $125 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  [30–31], 72% of quercetin is bound to HSA. For an olive phenol/albumin ratio of 20, the decrease of the fluorescence intensity of HSA-bound quercetin at



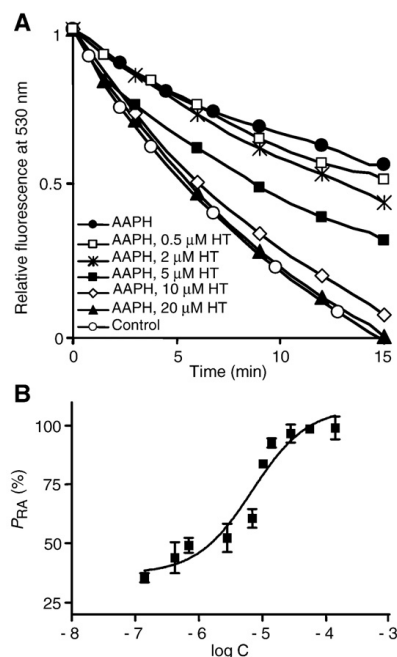
**Fig. 5.** Influence of selected phenols on the fluorescence of HSA-bound quercetin (A) and dansylsarcosine (B). Hydroxytyrosol (■), oleuropein (◆), caffeic acid (cross), ferulic acid (●), chlorogenic acid (▲) and MeOH (dashed line). HSA and marker concentrations = 75 μM. *n* = 2 (mean dev. < 10%).

530 nm (excitation at 450 nm) was less than 30% for ferulic, caffeic and chlorogenic acids and around 10% for hydroxytyrosol and oleuropein. Although the three hydroxycinnamic acids are more modest HSA ligands than quercetin [33], their inability to displace quercetin from its binding site suggests that their interaction with HSA does not take place in competition with quercetin and rather points to the formation of ternary complexes and subsequent weak conformational changes of HSA. This may also be the case for HT and its elenolic derivative oleuropein as evidenced by the fluorescence patterns displayed at higher albumin–ligand molar ratios.

When olive phenols were added to DNSS/HSA complexes ( $K_b = 1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  [44], 73% bound), the fluorescence was more strongly quenched than with the quercetin probe (Fig. 5B). Chlorogenic acid efficiently displaces DNSS, ranked in the literature as a subdomain IIIA probe, leading to a fluorescence quenching of 50% for a chlorogenic acid/HSA ratio of 3. By contrast, hydroxytyrosol had no effect on the DNSS–HSA fluorescence. Unexpectedly, similar fluorescence quenching patterns were observed for DNSA, which is considered a subdomain IIA probe (data not shown). Thus, it can be proposed that either olive phenols bind without selectivity to both subdomains IIA and IIIA or that DNSS and DNSA are in fact markers for a same subdomain. Low-affinity binding sites for dansyl probes have also been proposed [44] as observed for ANS (1-anilino-8-naphtalenesulfonamide), a structurally related probe which binds both subdomain IIIA ( $K_b = 8.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) and subdomain IIA ( $K_b = 7.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) [45].

### 3.3. Inhibition of the oxidation of HSA-bound butyrylcholine esterase

The experiments were conducted in the presence of moxisylyte, an ester substrate of BChE, and the pH-sensitive fluorescent indicator



**Fig. 6.** Inhibition of the oxidative degradation of HSA-bound BChE by hydroxytyrosol (HT). A: Time dependence of the BCECF fluorescence intensity at 530 nm in the presence of different HT concentrations (C) at 40 °C. B: Plot of the percentage of remaining BChE activity as a function of log C.

**Table 2**  
Inhibition of the oxidation of HSA-bound BChE (initial concentrations: 25  $\mu\text{M}$  HSA, 2 mM AAPH, 72 nM BCECF, 750  $\mu\text{M}$  moxisylyte)

Compound	pEC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>
Quercetin	5.61 ( $\pm 0.12$ )	2.5 [1.4–4.3]
Dihydrocaffeic acid	5.48 ( $\pm 0.09$ )	3.3 [2.1–5.1]
Chlorogenic acid	5.46 ( $\pm 0.13$ )	3.5 [1.9–6.6]
Caffeic acid	5.32 ( $\pm 0.10$ )	4.8 [3.0–7.5]
Oleuropein	5.31 ( $\pm 0.15$ )	4.9 [2.4–10.0]
n-Hexadecylcaffeate	5.31 ( $\pm 0.27$ )	4.9 [1.3–19.1]
Ferulic acid	5.27 ( $\pm 0.10$ )	5.4 [3.5–8.5]
Hydroxytyrosol	5.16 ( $\pm 0.11$ )	6.9 [4.1–11.7]
L-Ascorbate	4.46 ( $\pm 0.10$ )	35 [21.5–56.9]
Tyrosol	<3.84	>140 [nd]

<sup>a</sup> pEC<sub>50</sub> =  $-\log\text{EC}_{50}$ , values are means (SD)  $n=4$ .

<sup>b</sup> Confidence interval of EC<sub>50</sub> is valid at 95%.

BCECF [39]. The pH drop induced by moxisylyte hydrolysis quenches the fluorescence of BCECF. In the presence of AAPH, the oxidative degradation of BChE strongly attenuates the quenching of BCECF fluorescence. Intermediate situations are observed in the presence of an antioxidant (Fig. 6). Over the typical period of the enzymatic experiments, both moxisylyte and BCECF did not undergo significant oxidative degradation (data not shown). Ferulic acid and the antioxidants having a catechol moiety are the most efficient at inhibiting the oxidative degradation of BChE ( $\text{EC}_{50} < 10 \mu\text{M}$ ) (Table 2). The differences between them are not statistically significant. Ascorbate and tyrosol are both much less active, a likely consequence of the poor stability of the former and the weak reducing potential of the latter.

#### 4. Discussion

After oral absorption, olive phenols are recovered (mostly as conjugates) into the human blood stream [11–14] where they could develop interesting antioxidant activities (in addition to more specific effects following distribution to other tissues). The blood plasma contains important biomolecules that are sensitive to oxidative stress such as polyunsaturated fatty acids and proteins. Moreover, the major plasma protein serum albumin (0.53–0.68 mM in adult blood) is the transporter of free fatty acids and a wide range of xenobiotics [26]. HSA displays three repetitive binding domains named I, II, and III, in which long-chain fatty acids are asymmetrically distributed over up to 7 binding sites [29]. HSA-bound fatty acids circulate in blood plasma at a concentration near 1 mM. Among them, PUFA are essential lipids that are sensitive to oxidation processes leading to potentially toxic hydroperoxides and aldehydes via highly oxidizing intermediates such as oxyl and peroxy radicals [46]. In plasma, such PUFA oxidation products could mediate oxidative modifications of HSA (carbonylation, loss of Lys residues) [47,48]. In this work, olive phenols and other common antioxidants are tested for their capacity to inhibit the oxidative degradation of linoleic acid and butyrylcholine esterase in the presence of human serum albumin.

Linoleic acid, the most abundant PUFA *in vivo*, was selected as the first potential target of ROS in plasma. The linoleic acid/HSA molar ratio was set at 4:1 so as to mimic metabolic conditions reached during strenuous exercise and in diabetes (normal physiological ratio 2:1) [26]. The protection by antioxidants of HSA-bound linoleic acid against hydrophilic peroxy radicals generated in the aqueous phase must be governed by the two following factors:

- the intrinsic reactivity of the antioxidant at reducing peroxy radicals. H-atom or electron transfer from the antioxidant to the peroxy radicals is largely governed by the stability of the radical derived from the antioxidant. For phenolic antioxidants, it is well known that semiquinone radicals derived from catechol (1,2-dihydroxybenzene) nuclei are stabilized by a combination of

electronic and intramolecular hydrogen bonding effects. Consequently, antioxidants having a catechol group typically come up as more efficient than analogs having a single phenolic OH group.

- the affinity of the antioxidant for HSA (measurement by the binding constant  $K_b$ ) and its availability to the peroxy radicals. Dietary flavonoids such as quercetin that are partially absorbed from the gastro-intestinal tract are detected in plasma as HSA-bound conjugates [49]. Up to now, binding constants to HSA were not available for the true circulating polyphenol conjugates. For commercially available polyphenols (aglycones, glycosides) and chemically synthesized models of conjugates (flavonoid sulfates),  $K_b$  values have been evaluated in the range  $10^4$ – $10^5 \text{ M}^{-1}$  [30–33]. This moderate to low affinity is sufficient to ensure that quercetin and the hydroxycinnamic acids investigated in this work are predominantly bound to HSA given the high HSA/ligand molar ratio used, which is expected to be even higher in the plasma conditions. Because data dealing with the affinity of hydroxytyrosol derivatives towards HSA are lacking, an insight was brought into the location and affinity of these small ligands. Ferulic acid, caffeic acid and its quinic ester chlorogenic acid all quenched Trp214 fluorescence as efficiently as quercetin suggesting binding in subdomain IIA or in proximity of the interdomain IIA/IIIA. By contrast, dihydrocaffeic acid, HT and oleuropein showed no quenching and thus do not display a high-affinity binding site in these regions. Displacement studies were next conducted to refine the location of olive phenols. The three hydroxycinnamic acids are slightly weaker HSA ligands than quercetin ( $K_b$  (ferulic acid/HSA) =  $2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_b$  (chlorogenic acid/HSA) =  $4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) [33]. However, if they bind to HSA in competition with quercetin, their affinity for HSA would be sufficient to totally quench the fluorescence of HSA-bound quercetin given the high ligand/quercetin molar ratios used. This is by far not the case and rather points to noncompetitive binding. Unexpected results were obtained in the displacement of specific probes for subdomains IIA (DNSA) and IIIA (DNSS) in that similar fluorescence patterns were observed. Again, the three hydroxycinnamic acids deeply affected the binding of the dansyl ligands to HSA whereas the small-sized hydroxytyrosol showed no effect. Multiple binding sites may be suggested for hydroxycinnamic acids whereas no clear site could be identified for hydroxytyrosol and oleuropein.

A detailed investigation has shown that quercetin bound to HSA ( $K_b \approx 125 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) is oxidized as rapidly as free quercetin under the flow of peroxy radicals produced by the thermal decomposition of AAPH as if the HSA matrix exerted no screening between the peroxy radicals generated in the aqueous phase and quercetin in its binding cavity within subdomain IIA [35]. This observation suggests long-range electron transfer processes operating between the periphery of the protein (the primary sites of radical attack) and the quercetin binding site. The lag phase observed in the peroxidation of HSA-bound linoleic acid has been interpreted as the period needed for AAPH-derived peroxy radicals to oxidize some peripheral HSA residues thereby triggering a minimal conformational change that leads to LH molecules being more exposed to the protein-borne radicals. After quercetin, the most efficient peroxidation inhibitors are caffeic acid, chlorogenic acid and the typical olive antioxidants hydroxytyrosol and oleuropein. Among these four hydrophilic antioxidants, only the two first are known to be (weak) HSA ligands. Hence, hydrophilic antioxidants with a catechol group clearly emerge as the best peroxidation inhibitors as if their activity was governed by their intrinsic H-donating properties more than by their binding to HSA. Moreover, the presence of a large hydrophilic sub-unit that could be



expected to alter the binding to HSA (caffeic acid vs chlorogenic acid, hydroxytyrosol vs oleuropein) does not significantly affect the antioxidant efficiency.

After the lag phase, the peroxidation rate quickly increases to reach 80 to 90% of that of the uninhibited peroxidation ( $R_p^{\max} \approx 1.08 \mu\text{M min}^{-1}$ , Table 1). This value is much lower than the initiation rate, i.e. the flow of AAPH-derived peroxy radicals in the aqueous phase (based on the literature [35],  $R_i \approx 14 \mu\text{M min}^{-1}$  in our conditions). Hence, even when the peroxidation rate is maximal, linoleic acid is largely protected from the attacking peroxy radicals by the HSA matrix. From the quasi-linear decay of the antioxidant concentration, the rate of antioxidant consumption ( $R_a$ ) can also be estimated (Table 1). Potent antioxidants are rapidly consumed with  $R_a$  values in the range 0.8–1.3  $\mu\text{M min}^{-1}$  (period required for complete consumption of the antioxidant  $T_a$  in the range 50–60 min). By contrast,  $\alpha$ -tocopherol and tyrosol, which are poor peroxidation inhibitors, are both more stable ( $R_a < 0.4 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $T_a > 180$  min). Once more, the rates of antioxidant consumption are much lower than the initiation rate as a consequence of the competition between the antioxidant and other H-donating species during the lag phase. These species include not only some exposed reducing residues of HSA but also some oxidation products of the antioxidants in which the catechol nuclei are regenerated as a consequence of radical recombination (dimerization, disproportionation) or water addition on quinone or quinonemethide intermediates [24]. It is also noteworthy that the distribution of caffeic acid oxidation products (mainly dimers with biaryl or biarylether linkages [24]) is unaffected by the HSA matrix (data not shown). Those observations could be more consistent with an inhibition mechanism involving the unbound fraction in the aqueous phase. Remarkably,  $\alpha$ -tocopherol, normally a potent inhibitor of lipid peroxidation, comes up as a poor antioxidant in this model. Its good solubility in the medium (despite its hydrophobic character) may be taken as a clue of its binding to HSA, which could substantially mask its activity. It can also be added that  $\alpha$ -tocopherol is especially potent at inhibiting lipid peroxidation in systems where propagation can take place (chain-breaking inhibition by scavenging of lipid peroxy radicals). However, the encounter between lipid peroxy radicals ( $\text{LOO}^\bullet$ ) and linoleic acid molecules (LH) is an unlikely event in this model where each LH molecule is tightly sequestered within its binding pocket. Finally, L-ascorbate is unique in that it is rapidly consumed while providing only a marginal protection of linoleic acid. These observations are consistent with the high instability of L-ascorbate in the medium reflecting its fast autoxidation rather than its efficient scavenging of peroxy radicals.

A simple kinetic model can be developed to obtain a semi-quantitative picture of the sequence of oxidative events taking place within the HSA–linoleic acid complex in the absence or presence of an antioxidant. In our system, a large concentration of diazo initiator AAPH ensures a constant flow of hydrophilic peroxy radicals  $\text{ROO}^\bullet$  (rate  $R_i$ ) that abstract H atoms from the antioxidant (AH), lipid (LH), or oxidizable protein residues (PH) [Eqs. (1–3)]:



The steady-state hypothesis for  $\text{ROO}^\bullet$  is expressed as [Eq. (4)]:

$$R_i = [\text{ROO}^\bullet](k_{\text{AH}}[\text{AH}] + k_{\text{LH}}[\text{LH}] + k_{\text{PH}}[\text{PH}]) \quad (4)$$

From these relationships, the chemical rates for the consumption of AH and LH are readily deduced [Eqs. (5–6)]:

$$R_{\text{AH}} = -\frac{d}{dt}[\text{AH}] = k_{\text{AH}}[\text{AH}][\text{ROO}^\bullet] = \frac{R_i}{1 + r_{\text{LH}}[\text{LH}]/[\text{AH}] + C_{\text{PH}}/[\text{AH}]} \quad (5)$$

With  $r_{\text{LH}} = k_{\text{LH}}/k_{\text{AH}}$ ,  $C_{\text{PH}} = k_{\text{PH}}[\text{PH}]/k_{\text{AH}}$

$$R_{\text{LH}} = -\frac{d}{dt}[\text{LH}] = k_{\text{LH}}[\text{LH}][\text{ROO}^\bullet] = R_{\text{AH}}r_{\text{LH}} \frac{[\text{LH}]}{[\text{AH}]} \quad (6)$$

In fact, an antioxidant of stoichiometry  $n$  can be modelled as  $n$  identical AH sub-units that all transfer a single H-atom with rate constant  $k_{\text{AH}}$ . We may also write:  $[\text{AH}] = nC_a$ ,  $R_{\text{AH}} = nR_a$ ,  $C_a$  being the true antioxidant concentration (typically, 50  $\mu\text{M}$ ) and  $R_a$  the true rate of antioxidant consumption (estimated by HPLC titrations). Hence, we have:

$$R_a = \frac{R_i}{n + r_{\text{LH}}[\text{LH}]/C_a + C_{\text{PH}}/C_a} \quad (7)$$

In fact, the antioxidant is consumed during the lag phase, i.e. when LH consumption is negligible. Hence, Eq. (7) can be simplified as follows:

$$R_a = \frac{R_i}{n + C_{\text{PH}}/C_a} \quad (8)$$

After the lag phase, LH consumption is maximized as the consequence of the consumption of the antioxidant and some specific HSA residues (responsible for the lag phase observed in uninhibited peroxidation). Hence, only the bulk of oxidizable HSA residues are left to compete with linoleic acid for the attacking peroxy radicals:

$$R_{\text{LH}}^{\max} = \frac{R_i}{1 + C_{\text{PH}}^{\text{bulk}}/r_{\text{LH}}[\text{LH}]} = \frac{R_i}{1 + \text{AE}_{\text{PH}}^{\text{bulk}} \frac{[\text{PH}^{\text{bulk}}]}{[\text{LH}]}} \quad (9)$$

with  $\text{AE}_{\text{PH}}^{\text{bulk}} = k_{\text{PH}}^{\text{bulk}}/k_{\text{LH}}$ .

If only the oxidation of the antioxidant and specific HSA residues are considered during the lag phase, we may write:

$$R_i = \frac{[\text{PH}^{\text{SP}}]}{T_{\text{lag}}} + nC_a = \frac{[\text{PH}^{\text{SP}}]}{T_{\text{lag}}^0} \quad (10)$$

Taking  $R_i = 14 \mu\text{M min}^{-1}$ ,  $T_{\text{lag}}^0 = 60$  min (no antioxidant), we obtain:  $[\text{PH}^{\text{SP}}] = 0.84$  mM, i.e. 1.7 residues per HSA molecule. For potent antioxidants (50  $\mu\text{M}$ ),  $T_{\text{lag}} \approx 150$  min. Thus, we have:  $n \approx 25$ , which is unrealistic. Consequently, we must assume that PH residues from the bulk already contribute. Taking a more reasonable  $n$  value of 4 [24], we obtain from Eq. (10):  $[\text{PH}] = 1.9$  mM, i.e. almost 4 residues per HSA molecule.

For potent antioxidants during the lag phase, we also have:  $R_a \approx 1 \mu\text{M min}^{-1}$ .

From Eq. (8), we thus deduce:  $C_{\text{PH}} = k_{\text{PH}}[\text{PH}]/k_{\text{AH}} \approx 10C_a = 0.5$  mM. Hence,  $k_{\text{AH}}/k_{\text{PH}} \approx 4$ .

Finally, we have:  $R_p^{\max} \approx 1 \mu\text{M min}^{-1}$ . Taking  $[\text{LH}] = 1.8$  mM at  $R_p^{\max}$ , we deduce from Eq. (9):  $\text{AE}_{\text{PH}}^{\text{bulk}} [\text{PH}^{\text{bulk}}] = 23$  mM. Taking 1.9 mM as an approximate value for  $[\text{PH}^{\text{bulk}}]$ , we may write:  $\text{AE}_{\text{PH}} = k_{\text{PH}}/k_{\text{LH}} \approx 12$ .

Although very crude, these calculations provide a deeper insight in the mechanisms at work. In summary:

- Uninhibited peroxidation starts after a minimal oxidation of HSA at 1–2 critical residues during the lag phase.
- In the presence of potent antioxidants, the lag phase is much longer and likely involves additional HSA residues. However, the oxidation of the antioxidant is faster than that taking place on the protein.
- After the lag phase, peroxidation of linoleic acid is significant but remains slow because of its competition with oxidation at several HSA residues (ca. 4), which as a whole is one order of magnitude faster. Potential targets of radical attack on HSA are Trp-214, Cys-34, Tyr (18 residues), His (16 residues) and Met (6 residues) [27,50,51].

Finally, olive phenols are able to inhibit the oxidation of butyrylcholine esterase co-extracted with HSA (Table 2) [39]. EC<sub>50</sub> values of all phenolic antioxidants except tyrosol lie in the range 2.5–6.9 μM. This poor discrimination between the antioxidants despite their structural diversity and variable affinity for HSA once more suggests that a strong H-donating capacity is the main factor for a potent inhibition, which in most cases is likely to operate via direct scavenging of the AAPH-derived peroxy radicals by the unbound antioxidant fraction in the aqueous phase.

## 5. Conclusion

The biological significance of the antioxidant activity of dietary phenols has been strongly questioned based on their relatively low bioavailability and extensive conjugation after intestinal absorption (a process that may lower the reducing activity of phenolic nuclei). Anyway, the inhibition of lipid and protein oxidation remains an important challenge in terms of preserving important nutrients and avoiding the formation of potentially toxic hydroperoxides and carbonyl compounds. A deeper insight in the chemical mechanisms sustaining the antioxidant activity of dietary phenols in biologically-relevant systems involving lipids and proteins brought some unexpected results. Catechol-bearing dietary phenols, whether strongly or weakly bound to serum albumin (e.g., quercetin and hydroxytyrosol), are much more efficient at inhibiting lipid and protein peroxidation than recognized antioxidants such as vitamins C and E. Finally, although the postprandial plasma concentration of dietary phenols is much lower than the circulating concentrations of α-tocopherol and ascorbate, dietary phenols could help protect HSA itself against oxidative modifications, thereby maintaining its function as a transport protein and a plasma antioxidant.

## Acknowledgements

M. Roche is grateful to the General Council of the PACA region and to INRA for financial support and AFIDOL for their interest in this study.

## References

- Z. Serdar, K. Aslan, M. Dirican, E. Sarandöl, D. Yesilburca, A. Serdar, Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease, *Clin. Biochem.* 39 (2006) 794–803.
- G. Spiteller, Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 362–387.
- D.A. Butterfield, C.M. Lauderback, Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β-peptide-associated free radical oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 32 (2002) 1050–1060.
- A. Tappel, A. Tappel, Oxidant free radical initiated chain polymerization of protein and other biomolecules and its relationship to diseases, *Med. Hypothesis* 63 (2004) 98–99.
- D.L. Gilbert, C.A. Colton, *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*, Kluwer Academic, New-York, 1999.
- M.M. Elahi, B.M. Matata, Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease, *Arch. Biochem. Biophys.* 450 (2006) 78–88.
- B. Frei, R. Stocker, B.N. Ames, Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (1988) 9748–9752.
- R.W. Owen, A. Giacosa, W.S.E. Hull, et al., Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants, *Lancet Oncol.* 1 (2000) 107–112.
- R. Limiroli, R. Consonni, A. Ranalli, G. Bianchi, L. Zetta, 1H-NMR study of phenolics in the vegetation water of three cultivars of *olea europaea*: similarities and differences, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2040–2048.
- A. García, M. Brenes, P. García, C. Romero, A. Garrido, Phenolic content of commercial olive oils, *Eur. Food Res. Technol.* 216 (2003) 520–525.
- M.N. Viissers, P.L. Zock, A.J. Roodenburg, R. Leenen, M.B. Katan, Olive oil phenols are absorbed in humans, *J. Nutr.* 132 (2002) 409–417.
- F. Visioli, C. Galli, F. Bornet, et al., Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans, *FEBS Lett.* 468 (2000) 159–160.
- E. Miró-Casas, M.I. Covas, M. Fitó, M. Farré-Albadalejo, J. Marrugat, R. de la Torre, Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans, *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (2003) 186–190.
- E. Miró-Casas, R. de la Torre, Capillary GC–MS quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake, *Anal. Biochem.* 294 (2001) 63–72.
- P. Cremin, S. Kasim-Karakas, A. Waterhouse, A. L. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1747–1750.
- A.R. Rechner, J.P.E. Spencer, G. Kuhnle, U. Hahn, C. Rice-Evans, Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1213–1222.
- P. Bogani, C. Galli, M. Villa, F. Visioli, Postprandial, anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil, *Atherosclerosis* 190 (2007) 181–186.
- I. Fki, M. Bouaziz, Z. Sahnoun, S. Sayadi, Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 5362–5370.
- M. Gonzalez-Santiago, E. Martin-Bautista, J.J. Carrero, et al., One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipidemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development, *Atherosclerosis* 188 (2006) 35–42.
- C.L. Léger, N. Kadiri-Hassani, B. Descomps, Decreased superoxide anion production in cultured human promonocyte cells (THP-1) due to polyphenol mixtures from olive oil processing wastewaters, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5061–5067.
- S. D'Angelo, D. Ingrosso, V. Migliardi, et al., Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (2005) 908–919.
- J.S. Perona, R. Cabello-Moruno, V. Ruiz-Gutiérrez, The role of olive oil components in the modulation of endothelial function, *J. Nutr. Biochem.* 17 (2006) 429–445.
- O. Bouzid, D. Navarro, M. Roche, et al., Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product, *Process Biochem.* 40 (2005) 1855–1862.
- M. Roche, C. Dufour, N. Mora, O. Dangles, Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterisation of oxidation products by mass spectrometry, *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 423–430.
- M.I. Covas, K. de la Torre, M. Farré-Albadalejo, et al., Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 608–616.
- T. Peters, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Biomedical Applications*, Academic Press, San Diego, 1996.
- E. Bourdon, N. Loreau, L. Lagrost, D. Blache, Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin, *Free Radic. Biol. Med.* 39 (2005) 15–20.
- Y. Ogasawara, T. Namai, T. Togawa, K. Ishii, Formation of albumin dimers induced by exposure to peroxides in human plasma: a possible biomarker for oxidative stress, *Biochim. Biophys. Acta* 340 (2006) 353–358.
- I. Petipias, T. Grüne, A.A. Bhattacharya, S. Curry, Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, *J. Mol. Biol.* 314 (2001) 955–960.
- C. Dufour, O. Dangles, Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding site by fluorescence spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 172 (2005) 164–173.
- F. Zsila, Z. Bikadi, M. Simonyi, Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 447–456.
- M. Jiang, M.-X. Xie, D. Zheng, Y. Liu, X.-Y. Li, X. Chen, Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin, *J. Mol. Struct.* 692 (2004) 71–80.
- J. Kang, Y. Liu, M.-X. Xie, S. Li, M. Jiang, Y.-D. Wang, Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid, *Biochim. Biophys. Acta* 1674 (2004) 205–214.
- C. Dufour, M. Loonis, Flavonoids and their oxidation products efficiently protect albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2007) 958–965.
- C. Dufour, M. Loonis, O. Dangles, Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 241–252.
- H. Soreq, S. Seidman, P.A. Dreyfus, D. Zevin-Sonkin, H. Zakut, Expression and tissue-specific assembly of human butyrylcholine esterase in microinjected *Xenopus laevis* oocytes, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 10608–10613.
- N. Chapuis, C. Brühlmann, M. Reist, P.-A. Carrupt, J.M. Mayer, B. Testa, The esterase-like activity of serum albumin may be due to cholinesterase contamination, *Pharm. Res.* 18 (2001) 1435–1439.
- J. Kálmán, A. Juhász, Z. Rakonczay, et al., Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients, *Life Sci.* 75 (2004) 1195–1204.
- A. Salvi, C. Brühlmann, E. Migliavacca, P.-A. Carrupt, K. Hostettmann, B. Testa, Protein protection by antioxidants: development of a convenient assay and structure-activity relationships of natural polyphenols, *Helv. Chim. Acta* 85 (2002) 867–881.
- M. Monteiro, A. Farah, D. Perrone, L.C. Trugo, C. Donangelo, Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans, *J. Nutr.* 137 (2007) 2196–2201.
- C. Dufour, M. Loonis, Regio- and stereoselective oxidation of linoleic acid bound to serum albumin: identification by ESI-mass spectrometry and NMR of the oxidation products, *Chem. Phys. Lipids* 138 (2005) 60–68.
- D.E. Epps, T.J. Raub, V. Caiola, Determination of the affinity of drugs toward serum albumin by measurement of the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein, *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999) 41–48.

- [43] G. Sudlow, D.J. Birkett, D.N. Wade, Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.* 12 (1976) 1052–1061.
- [44] D.E. Epps, T.J. Raub, F.J. Kezdy, A general, wide-range spectrofluorometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum albumin, *Anal. Biochem.* 227 (1995) 342–350.
- [45] L.A. Bagatolli, S.C. Kivatinitz, G.D. Fidelio, Interaction of small ligands with human serum albumin IIIA subdomain. How to determine the affinity constant using easy steady state fluorescent method, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 1131–1132.
- [46] E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito, N. Noguchi, Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 338 (2005) 668–676.
- [47] W. Liu, J.-Y. Wang, Modifications of protein by polyunsaturated fatty acid ester peroxidation products, *Biochim. Biophys. Acta* 1752 (2005) 93–98.
- [48] H.H.F. Refsgaard, L. Tsai, R. Stadtman, Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 611–616.
- [49] C. Manach, C. Morand, V. Crespy, et al., Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties, *FEBS Lett.* 426 (1998) 331–336.
- [50] P. Filipe, P. Moriere, L.K. Patterson, et al., Mechanisms of flavonoid repair reactions with amino acid radicals in models of biological systems: a pulse radiolysis study in micelles and human serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1572 (2002) 150–162.
- [51] J.A. Silvester, G.S. Timmins, M.J. Davis, Photodynamically generated bovine serum albumin radicals: evidence for damage transfer and oxidation at cysteine and tryptophan residues, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 754–766.

## Effects of nutritional antioxidants on AAPH- or AGEs-induced oxidative stress in human SW872 liposarcoma cells

Marjolaine Roche · Evelyne Tarnus ·  
Philippe Rondeau · Emmanuel Bourdon

Received: 13 July 2008 / Accepted: 27 December 2008  
© Springer Science + Business Media B.V. 2009

**Abstract** High levels of oxidative stress were reported in obesity-linked type 2 diabetes and were associated with elevated formation of advanced glycation end products (AGEs). Many studies have focused on the effect of antioxidants on vascular and circulating cells such as macrophages. However, despite the major role of adipocytes in the etiology of diabetes, little is known about the effect of natural antioxidants on adipocyte response to oxidative stress. The present study reports the differential protective effects of plant nutrients toward adipose cells subjected to oxidative stress. Caffeic acid, quercetin, L-ascorbic acid, and  $\alpha$ -tocopherol were tested on SW872 liposarcoma cells subjected to a free radical generator or to AGEs. Proliferation, viability, free radical formation, and superoxide dismutase expression were assessed in treated cells. Caffeic acid and quercetin appeared as the most potent antioxidant nutrients. Our findings clearly show a novel antioxidant role for caffeic acid and quercetin at the adipose tissue level. These new data confirm the beneficial role of phytotherapy as an interesting alternative mean for the development of novel therapeutical and nutritional strategy to prevent metabolic disorders inherent to obesity-linked diabetes.

**Keywords** AGEs · Antioxidant · Oxidative stress · SW872 · Liposarcoma cells

### Abbreviations

AAPH	2,2' Azobis 2-amidinopropane
AGE	Advanced glycation end products
BSA	Bovine serum albumin
BSA <sub>G100</sub>	BSA glycated by incubation with 100 mmol/l of glucose
Cu/Zn-SOD	Copper/Zinc superoxide dismutase
DCFH-DA	Dichlorofluorescein diacetate
FCS	Fetal calf serum
LDH	Lactate dehydrogenase
MTT	Dimethylthiazol diphenyl tetrazolium
NF $\kappa$ B	Nuclear factor Kappa B
Mn-SOD	Manganese superoxide dismutase
PBS	Phosphate-buffered saline
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
ROS	Reactive oxygen species


### Introduction

It is now well established that free radicals and reactive oxygen species (ROS) contribute to the development of several age-related diseases by inducing oxidative stress and oxidative damages (Droge 2002). The incidence of diabetes is increasing, with a worldwide prevalence estimated to double by 2030,

Marjolaine Roche and Evelyne Tarnus contributed equally to this work and should be considered as co-first authors.

M. Roche · E. Tarnus · P. Rondeau · E. Bourdon (✉)  
Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire (LBGM), Université de La Réunion,  
15, avenue René Cassin-BP 7151-97715,  
Saint Denis Messag Cedex 09, La Réunion, France  
e-mail: emmanuel.bourdon@univ-reunion.fr

Published online: 19 January 2009

 Springer

primarily because of sedentary lifestyle and obesity (Wild et al. 2004). A strong link between obesity and diabetes is now well established with more than 70% of people with diabetes being overweight. This disease, which is characterized by hyperglycemia and insulin resistance, is closely associated with severe complications. Indeed, diabetes increases the risk of developing cardiovascular diseases, which represent the leading cause of mortality in western countries (Shoelson et al. 2006). Recently, a causal role was shown for ROS in multiple forms of insulin resistance, which was also associated with elevated formation of advanced glycation end products (AGEs; Houstis et al. 2006).

Adipocytes are known to express and secrete a variety of active molecules, so-called adipokines, which can regulate many biological processes such as insulin sensitivity, appetite, immunity, and reproduction. It is now well established that dysregulation of adipocyte functions by oxidative stress constitutes a key process leading to type 2 diabetes. It is thus not surprising that many diabetic therapies target adipose tissue (TZD, physical activity, etc; Mayerson et al. 2002; Rahimi et al. 2005).

Plant nutrients like caffeic acid, quercetin, L-ascorbic acid, and  $\alpha$ -tocopherol have interesting antioxidant activities contributing to the beneficial effects of Mediterranean diet on human health (Dragsted 2003). Recent data have shown that natural antioxidant therapies improve health conditions of diabetic patients. Many studies have focused on the effect of these antioxidants on vascular and circulating cells such as macrophages. However, despite the major role of adipocytes in the etiology of diabetes, little is known about the effect of natural antioxidant on adipocyte response to oxidative stress.

In this study, using two different models of diabetes-like oxidative stress, we investigate the potential protective effect of common nutritional antioxidant compounds on human SW872 adipocytes submitted to oxidative stress. The SW872 cell line was often used in previous studies as human adipocyte cell model (Izem and Morton 2007; Singh et al. 2007; Vassiliou and McPherson 2004; Wassef et al. 2004). SW872 cells have the advantages of being of human origin and of not requiring any incubation cocktail to differentiate into mature adipocytes (Wassef et al. 2004). Proliferation, viability, free

radical formation, and superoxide dismutase (SOD) expression were assessed in treated SW872 cells.

## Materials and methods

### Materials

Caffeic acid (C-0625), L-ascorbic acid (A-5960),  $\alpha$ -tocopherol (T-3251), and quercetin (Q-0125) were obtained from Sigma (Saint-Louis, MO, USA) and were dissolved in sterile dimethyl sulfoxide (DMSO, D-4540) before treatment of cells. 2,2'-Azobis (2-methylamidinopropane) or AAPH (440914) was provided from Sigma. Bovine serum albumin (BSA<sub>G100</sub>) is an AGE prepared as previously described (Chesne et al. 2006) by incubating 0.5 mM BSA with 100 mM of glucose in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 under sterile conditions, and nitrogen gas atmosphere, in capped vials for 3 weeks at 37°C. The proteins were dialyzed against PBS, pH 7.4 and sterile-filtered with 0.2  $\mu$ m Millipore filter. Endotoxin content as assessed by in vitro toxicology assay kit (E-TOXATE, Sigma) was below detectable level (0.03 endotoxin unit/mL). Structural and functional impairments of BSA<sub>G100</sub> were fully characterized in previous studies (Chesne et al. 2006; Rondeau et al. 2007; Singh et al. 2007).

### Cell culture of SW872

Human SW872 liposarcoma cells (ATCC HTB-92) were obtained from Dr. Lise Bernier's laboratory (Clinical Research Institute of Montreal) and was cultivated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 10% fetal calf serum (FCS), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL), and amphotericin B (0.5  $\mu$ g/mL). Cells were grown in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. For all the experiments, cells were plated in triplicate for each condition, at 10<sup>4</sup> cells/200  $\mu$ L per well in sterile 96-well plate (for cytotoxicity analyses and ROS assays) and at 2.10<sup>5</sup> cells/mL per well in sterile six-well plate (RNA extraction). After 24 h of incubation, culture medium was replaced by a solution containing 1,700  $\mu$ L of DMEM, 300  $\mu$ L of PBS (control) or BSA<sub>G100</sub> (12 mM) or AAPH (2 mM), and 20  $\mu$ L of DMSO (control) or different nutritional antioxidants dissolved in DMSO: caffeic acid (0 to 5 mM),

L-ascorbic acid (0 to 5 mM), for  $\alpha$ -tocopherol (0 to 200  $\mu$ M) and quercetin (0 to 1 mM). Cells were maintained in the humidified CO<sub>2</sub> incubator for 24, 48, and 72 h before further analysis.

#### Proliferation assay

The MTT assay, using the standard 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide MTT (Sigma), was chosen to evaluate the effect of nutritional antioxidants on SW872 cell proliferation (Mosmann 1983). The assay is based on the cleavage of yellow tetrazolium salt (MTT dye) into purple formazan by metabolically active cells, which can be photometrically quantified. An increase in the number of living cells results in an increase in total metabolic activity, which leads to a higher purple color formation. Twenty-four hours after cell treatment, 20  $\mu$ L of the MTT dye (5 mg/mL) was added into each well for 4 h. The medium was then discarded, 150  $\mu$ L of isopropanol was added into each well, and plates were agitated in the dark for 30 min to solubilize the dark blue formazan crystals. Plate was read using a microplate reader (Fluostar-BMG France) at 595 nm. A well with medium alone (no cell and no reagent) was used for background correction. SW872 cells incubated in DMSO-containing medium were used as controls. Proliferation rate was expressed as percentage of the corresponding control cells treated with only 1% (v/v) DMSO.

#### Cytotoxicity: lactate dehydrogenase assay

To determine any toxic effect of the nutritional antioxidants on SW872 cells viability, the lactate dehydrogenase (LDH) assay was performed (Legrand et al. 1992). The assay is based on a measure of LDH released by dead cells in the culture medium. After incubation of SW872 cells for 24, 48, and 72 h, media and cells were collected. Cells were lysed using 120  $\mu$ L of LDH assay lysis at 37°C for 45 min. Cell lysates were then centrifuged at 250 $\times$ g for 45 min and supernatants were collected. Culture media (100  $\mu$ L) and 100  $\mu$ L of cell lysates were used to measure the LDH activity (Sigma #TOX7) according to the manufacturer's instructions. The reaction was performed in a 96-well plate, and absorbances at 492 and 690 nm (control) were read using a microplate reader (Fluostar-BMG France). Results were expressed as LDH release (activity in the medium/total activity).

#### Determination of ROS production

Thirty minutes before the end of incubation of SW872 cells with the different treatments, cells were incubated with 10  $\mu$ M DCFH-DA at 37°C (Interchim). Cells were then washed with DMEM medium, and the fluorescence of the oxidized form of DCF was measured in a microplate reader at 492 nm (excitation) and 520 nm (emission). Results were expressed as percentage of fluorescence compared to control cells (SW872 cells incubated with DMSO).

#### Gene expression of Mn-SOD and Cu/Zn-SOD

Total RNAs were extracted from SW872 cells using Trizol (Invitrogen) according to manufacturer's recommendations and quantified using a spectrophotometer. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed on the complementary deoxyribonucleic acid for Mn-SOD, Cu/Zn-SOD and housekeeping gene 18S using the ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Forest City, CA, USA). The primer sequences were as follows:

- Mn-SOD [primers: forward—5'-TGCAAGGAA-CAACAGGCCTTAT-3' and reverse—5'-AGTAAGCGTGCTCCACACAT-3'];
- Cu/Zn-SOD [primers: forward—5'-TGGTGGTCCATGAAAAAGCA-3' and reverse—5'-TCCAGCGTTTCCTGTCTTTGTA-3'];
- 18S [primers: forward—5'-TGTTACCATGAGGCTGAGATC-3' and reverse—5'-TGGTTGCCTGGGAAAATCC-3'].

The PCR was performed using SYBRgreen Master Mix Reagent. Thermal cycling proceeded with 40 cycles (initial activation step: 10 min, 95°C, 40 cycles of 15 s 95°C, 1 min 59°C). The amount of RNA was calculated with relative standard curves for RNA of Mn-SOD, Cu/Zn-SOD and 18S. Normalization to 18S was conducted to account for variability in concentration of total RNA.

#### Statistical analysis

Data were expressed as the means  $\pm$  standard deviation (SD) from at least three experiments. Statistical significances were determined using one-way analysis of variance (ANOVA; followed by the

Tukey test) for multiple comparisons, with a  $P$  value of less than 0.05 required for significance or by two-way ANOVA.

## Results

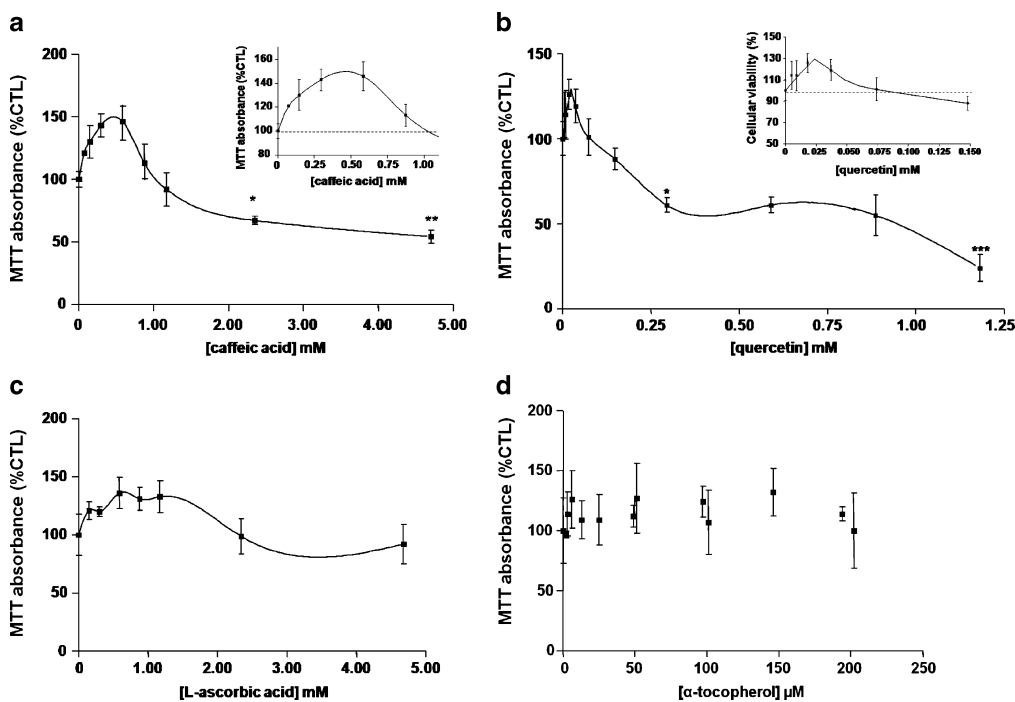
Effects of antioxidants on SW872 cell proliferation and viability

The cytotoxicity effects of caffeic acid, quercetin, L-ascorbic acid, and  $\alpha$ -tocopherol were assayed by measuring the cell proliferation and viability.

SW872 cells were treated with increasing concentrations of different antioxidants for 24 h. As shown in Fig. 1a and b, caffeic acid and quercetin significantly decrease SW872 proliferation at very high concentrations ( $-46\%$ ,  $P<0.001$ , for 4.7 mM,  $-76\%$ ,

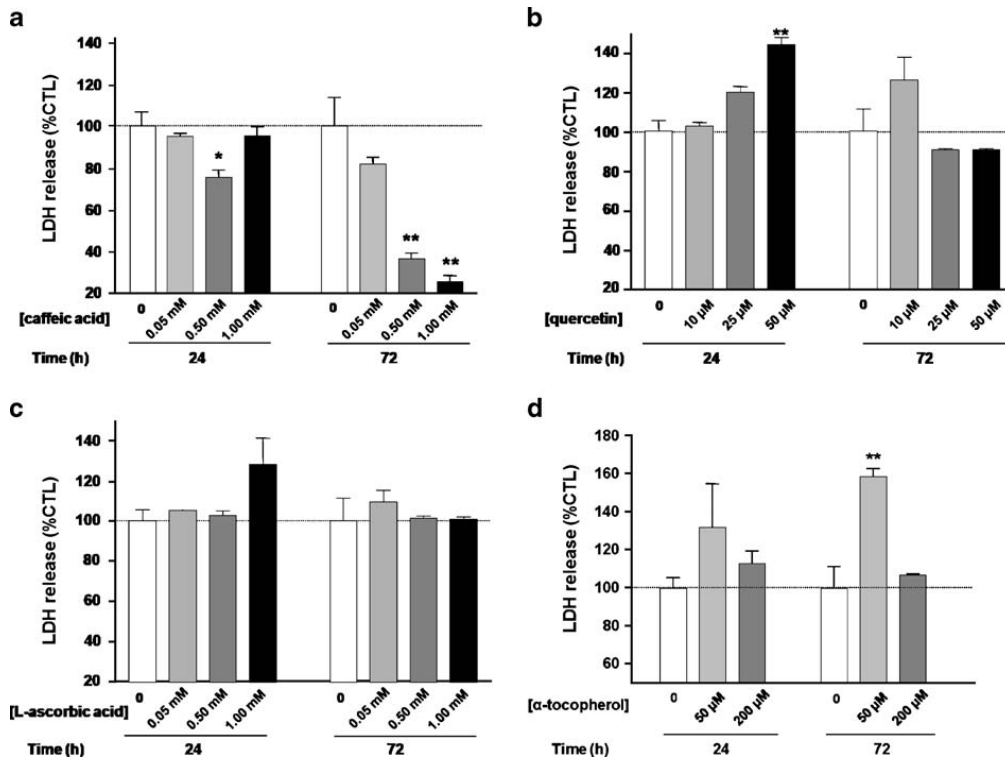
$P<0.0001$  for 1.2 mM, respectively). By contrast, no change in MTT absorbance was observed in cells incubated with L-ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol.

In parallel, cell viability was determined by measuring the LDH activity released in the culture medium of SW872 cells incubated for 24 and 72 h in the presence of increasing concentrations of antioxidants. As shown in Fig. 2, only cells incubated in the presence of 50  $\mu$ M quercetin for 24 h or 50  $\mu$ M  $\alpha$ -tocopherol for 72 h exhibited enhanced LDH activity release. Caffeic acid and L-ascorbic acid did not increase LDH release. Surprisingly, a longer incubation time with 0.5 and 1 mM of caffeic acid strongly reduced the release of LDH activity ( $-60\%$ ,  $P<0.001$ ,  $-70\%$ ,  $P<0.001$ , respectively; Fig. 2a). These tendencies were in accordance with the previous MTT results and reflect the beneficial biological and protective properties of caffeic acid.



**Fig. 1** Antioxidant effects on SW872 cells proliferation. The relative proliferation rate of SW872 cells incubated 24 h with increasing concentration of caffeic acid (a), quercetin (b), L-ascorbic acid (c), and  $\alpha$ -tocopherol (d) were determined with the MTT assay. Proliferation rate was expressed as percentage

of the corresponding control cells treated with only 1% ( $v/v$ ) DMSO. Data were expressed as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ), and statistical analyses were performed using one-way ANOVA for multiple comparisons. Effect of antioxidant on cell viability (vs. control): \*\*\* $P<0.001$ , \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$



**Fig. 2** Time course and concentration effects of antioxidants on SW872 cells viability. Effect of caffeic acid (a), quercetin (b), L-ascorbic acid (c), and  $\alpha$ -tocopherol (d) on the release of LDH in SW872 cells medium. Results were expressed in percentage of LDH released in the medium relative to the total

LDH activity present (medium plus cell lysates) and compared with control. Data were expressed as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ), and statistical analyses were performed using one-way ANOVA for multiple comparisons. Effect of antioxidant on cell viability (vs. control): \*\*\* $P<0.001$ , \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$

#### Effect of antioxidants in ROS cells production

The protective effect of antioxidants on cells is thought to reside in their ability to reduce the level of intracellular ROS generation. To test whether caffeic acid, L-ascorbic acid, quercetin, and  $\alpha$ -tocopherol, at non-toxic concentrations, could reduce the intracellular oxidative stress, intracellular ROS generation was measured in treated SW872 cells using the dichloro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. After its internalization by the cell, DCFH-DA is hydrolyzed, oxidized by various oxidants and emits fluorescence.

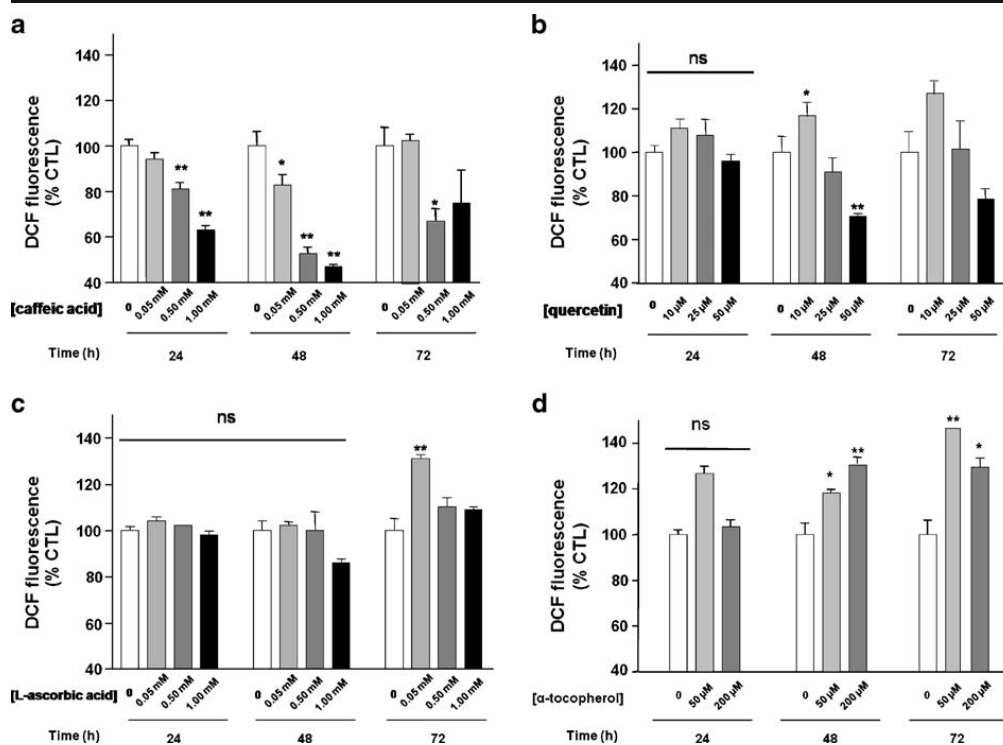
As observed in Fig. 3a, cells incubated in the presence of caffeic acid for 24, 48, and 72 h showed a reduced DCF fluorescence compared to control cells treated with DMSO only. The DCF fluorescence was

not affected in cells treated with quercetin, L-ascorbic acid, and  $\alpha$ -tocopherol for 24 h, but was significantly reduced in cells incubated for 48 h in the presence of 50  $\mu$ M quercetin ( $\sim 23\%$ ,  $P<0.001$ ). Surprisingly, after 72 h of incubation, L-ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol enhanced intracellular ROS level, showing some pro-oxidative properties.

#### Effect of antioxidants on AGEs- and AAPH-induced oxidative stress

To compare the protective effects of the four antioxidants, SW872 cells were initially pretreated with different oxidative stress generators (PBS, AAPH, and glycated albumin) and then incubated for 48 h with 50  $\mu$ M of each antioxidant. AAPH is a soluble chemical that generates





**Fig. 3** ROS production in SW872 cells treated with antioxidants. Analysis of DCF fluorescence of SW872 cells incubated 24, 48, and 72 h with suitable concentrations of antioxidant: caffeic acid (a), quercetin (b), L-ascorbic acid (c), and  $\alpha$ -tocopherol (d) after initial exposure with PBS (15% v/v). All fluorescence intensities were

expressed in percentage of control (cells incubated PBS 15% (v/v)). Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ), and statistical analyses were performed using one-way ANOVA for multiple comparisons. Effect of antioxidant on ROS accumulation (vs. control): \*\*\* $P<0.001$ , \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$ , <sup>ns</sup> $P>0.05$

peroxyl radicals in the culture medium (Yoshida et al. 2004). We recently showed that glycated albumin increased intracellular oxidative stress in adipocytes leading to an increase in oxidation of cellular proteins (Rondeau et al. 2008; Singh et al. 2007).

As shown in Fig. 4, caffeic acid and quercetin exert an antioxidant effect on SW872 treated with BSA<sub>G100</sub> or AAPH. By contrast, L-ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol confirmed their pro-oxidative properties, with an increase of ROS level (+3% to +21%;  $P<0.01$ ).

Caffeic acid inhibits manganese and copper/zinc SOD expressions

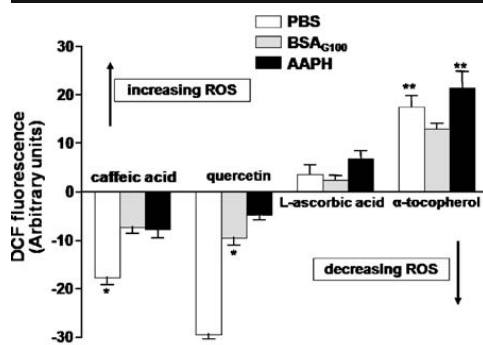
To determine the cellular mechanism by which caffeic acid suppresses intracellular oxidative stress, the influence of caffeic acid on Mn-SOD and Cu/Zn-

SOD mRNA expression in SW872 cells was tested. Mn-SOD, which is located in mitochondria, and Cu/Zn-SOD, which is located in the cytosol, catalyze the dismutation of the superoxide anion into hydrogen peroxide and are involved in cellular defenses against ROS-induced damages (Whittaker 2003).

As shown in Fig. 5, caffeic acid significantly reduced mRNA expression of Mn-SOD in SW872 cells treated with PBS, BSA<sub>G100</sub>, and AAPH. A significant reduction in Cu/Zn-SOD was also observed in cells treated with caffeic acid.

## Discussion

The present study reports the differential protective effects of nutrients toward adipose cells subjected to



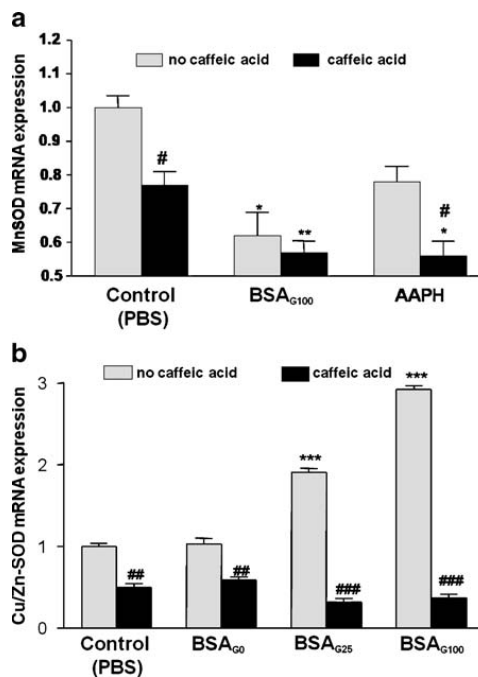
**Fig. 4** Effect of antioxidants on ROS level in SW872 cells pretreated with oxidative stress. After pretreatment with PBS 15% (v/v; white), BSA<sub>G100</sub> 12 mM (gray), or AAPH 2 mM (black), SW872 cells were incubated with 50  $\mu$ M of caffeic acid, quercetin, L-ascorbic acid, or  $\alpha$ -tocopherol for 48 h. DCF fluorescence was measured as described in the “Materials and methods” section. The level of intracellular ROS was expressed as percentage of ROS variation (diminution or augmentation) in comparison with untreated cells. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ), and statistical analyses were performed using one-way ANOVA for multiple comparisons. Effect of antioxidants on ROS accumulation (vs. control): \*\*\* $P<0.001$ , \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$

oxidative stress. Caffeic acid, quercetin, L-ascorbic acid, and  $\alpha$ -tocopherol were tested on SW872 liposarcoma cells subjected to a free radical generator or to AGEs. Proliferation, viability, free radical formation, and superoxide dismutase expression were assessed in treated cells. Our findings clearly show a novel antioxidant role for caffeic acid and quercetin at the adipocyte level.

For decades, adipocytes have been considered as a storage compartment. Emerging research efforts on adipose tissue have shown that adipocytes produce numerous regulatory factors involved in body homeostasis and that dysregulation of adipocyte functions by oxidative stress is a key process leading to obesity-related disorders (de Ferranti and Mozaffarian 2008). Many studies have focused on the effect of nutritional antioxidants on vascular and circulating cells such as macrophages. In spite of the determinant role of adipocytes in the etiology of obesity-related disorders, very little is known about the effect of natural antioxidant on adipocyte response to oxidative stress. The present study examined the efficiency of nutritional antioxidants to protect SW872 cells subjected to oxidative stress mediated by different models of

oxidative stress generators. Using AAPH and glycated albumin, which were shown to enhance oxidative stress in THP1 monocytes and SW872 adipocytes (Rondeau et al. 2008; Singh et al. 2007), we evidenced significant antioxidant activities for caffeic acid and quercetin at the adipocyte level.

Caffeic acid, a phenolic acid in cereals, and quercetin, a flavonoid in onions, constitute well-



**Fig. 5** Caffeic acid effect on Mn-SOD and Cu/Zn-SOD mRNA expression. After a pretreatment with PBS 15% (v/v), BSA<sub>G100</sub> 12 mM, or AAPH 2 mM, SW872 cells were incubated with 50  $\mu$ M of caffeic acid, for 24 h. Relative mean expression of Mn-SOD (a) in SW872 cells were determined as described in the “Materials and methods” section. Similarly and after a pretreatment with PBS 15% (v/v), BSA<sub>G0</sub>, BSA<sub>G25</sub>, or BSA<sub>G100</sub> 12 mM, SW872 cells were incubated with 50  $\mu$ M of caffeic acid, for 24 h. Relative mean expression of Cu/Zn-SOD (b) in SW872 cells were determined as described in the “Materials and methods” section. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n=2$  to 3), and statistical analysis were performed using one-way ANOVA for multiple comparisons. Effect of oxidative treatment (BSA<sub>G100</sub> or AAPH) on Mn-SOD or Cu/Zn-SOD mRNA expression (vs. PBS control): \*\*\* $P<0.001$ , \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$ . Effect of caffeic acid on Mn-SOD and Cu/Zn-SOD mRNA expression (vs. without caffeic acid): ### $P<0.001$ , ## $P<0.01$ , # $P<0.05$

known bioavailable polyphenols found in human plasma and urine (Erlund et al. 2002; Mennen et al. 2006; Olthof et al. 2001). Studies have clearly shown that caffeic acid was an effective antioxidant in different in vitro antioxidant assays (Gulcin 2006; Roche et al. 2005). Polyphenols, such as caffeic acid and quercetin, were shown to reduce the oxidative stress in tissues (Dragsted 2003) and in cardiomyocytes (Angeloni et al. 2007, 2008). Recent works report an anti-obesity effect of polyphenols on adipocyte cell lines from murine origin. These effects were mediated by AMPK and MAPK signaling pathways (Ahn et al. 2008; Yang et al. 2008).

L-Ascorbic acid, the vitamin C in citrus fruits, and  $\alpha$ -tocopherol, a component of vitamin E in sunflowers oil, are also present in the human blood circulation and help maintain a low-oxidant plasma level (Frei et al. 1989; Singh et al. 2005; Wilson 2005). In SW872 submitted to oxidative stress insults, pro-oxidant activities of both L-ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol were observed. Trace levels of transition metals can participate in the metal-catalyzed Haber–Weiss reaction. Generally, L-ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol are thought as reducing agents. They are able to reduce redox-active metals and thereby increase their pro-oxidant chemistry (Buettner and Jurkiewicz 1996; Osborn-Barnes and Akoh 2003). Oxidative damages in the intima of arterial wall were shown to be accelerated by L-ascorbic acid (Miyata et al. 1998).

The cellular mechanisms underlying caffeic acid inhibition of oxidative stress need to be identified. One possible mechanism could be the direct scavenging of ROS in the culture medium, which would mitigate the extracellular oxidative stress. However, the reduction in the intracellular level of ROS and the impact on SOD mRNA expression (Fig. 5) rise the possibility that caffeic acid directly affects cellular signaling. This is supported by our experimental conditions, where cells were first treated in the presence of the oxidative stress generator and then incubated with the antioxidants. This result is in full agreement with recent work showing that pretreatment of caffeic acid decreased the level of ROS induced by AGEs (Vasdev et al. 2007).

Receptors for AGEs, termed RAGE, are known to cause cellular dysfunctions in adipocytes by initiating intracellular signaling and enhancing ROS formation (Goldin et al. 2006). Recent data showed that the binding of AGEs on adipose cells could be mediated

by CD36 (Horiuchi et al. 2003, 2005; Kuniyasu et al. 2003). To our knowledge, CD36 expression level in SW872 cells has never been reported in the literature. Using immunocytochemistry and FACS techniques, we recently evidenced the expression of CD36 receptor in SW872 cells (unpublished results). Current investigations in our laboratory are led to identify how caffeic acid could affect CD36 signaling.

Quercetin treatment was also demonstrated to decrease the mRNA levels of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the brain of rotenone-stressed rats (Sanchez-Reus et al. 2007). The transcription nuclear factor NF $\kappa$ B has been linked to up-regulation of Mn-SOD (Bubici et al. 2004). We hypothesized that AGEs or AAPH-induced oxidative stresses in SW872 were, at least partially, counteracted by caffeic acid by a down-regulation of NF $\kappa$ B expression. Recently, we are testing this hypothesis in transfected SW872 cells with the use of NF $\kappa$ B reporter vector.

In conclusion, our results show that caffeic acid and quercetin are efficient to prevent oxidative stress in human adipocytes, while having no cytotoxicity effects. Here and for the first time, beneficial properties of polyphenols are evidenced in a model of obesity-linked metabolic disorder. These data bring new evidence that adipose tissue constitutes a preferential target for phytotherapy. Further studies are needed to achieve a better understanding of the cellular and molecular mechanisms of nutritional antioxidants.

**Acknowledgments** This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et de l'Outre Mer, le Conseil Régional de La Réunion, and the Université de La Réunion. Evelyne Tarnus was a recipient of a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## References

- Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;373:545–9. doi:10.1016/j.bbrc.2008.06.077.
- Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, Angelini S, Hrelia P, Hrelia S. Role of quercetin in modulating rat cardiomyocyte gene expression profile. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H1233–43. doi:10.1152/ajpheart.01091.2007.
- Angeloni C, Spencer JP, Leoncini E, Biagi PL, Hrelia S. Role of quercetin and its in vivo metabolites in protecting H9c2 cells against oxidative stress. *Biochimie.* 2007;89:73–82. doi:10.1016/j.biochi.2006.09.006.

- Bubic C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle*. 2004;3:1524–9.
- Buettner GR, Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res*. 1996;145:532–41. doi:10.2307/3579271.
- Chesne S, Rondeau P, Armenta S, Bourdon E. Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells. *Biochimie*. 2006;88:1467–77. doi:10.1016/j.biochi.2006.05.011.
- de Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem*. 2008;54:945–55. doi:10.1373/clinchem.2007.100156.
- Dragsted LO. Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J Vitam Nutr Res*. 2003;73:112–9. doi:10.1024/0300-9831.73.2.112.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47–95.
- Erlund I, Silaste ML, Alfthan G, Rantala M, Kesaniemi YA, Aro A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:891–8. doi:10.1038/sj.ejcn.1601409.
- Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:6377–81. doi:10.1073/pnas.86.16.6377.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114:597–605. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854.
- Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*. 2006;217:213–20. doi:10.1016/j.tox.2005.09.011.
- Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids*. 2003;25:283–92. doi:10.1007/s00726-003-0029-5.
- Horiuchi S, Unno Y, Usui H, Shikata K, Takaki K, Koito W, et al. Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:671–5. doi:10.1196/annals.1333.076.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006;440:944–8. doi:10.1038/nature04634.
- Izem L, Morton RE. Possible role for intracellular cholesteryl ester transfer protein in adipocyte lipid metabolism and storage. *J Biol Chem*. 2007;282:21856–65. doi:10.1074/jbc.M701075200.
- Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Lett*. 2003;537:85–90. doi:10.1016/S0014-5793(03)00096-6.
- Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiamont J, Martial A, Marc A, et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium. *J Biotechnol*. 1992;25:231–43. corrected. doi:10.1016/0168-1656(92)90158-6.
- Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, et al. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:797–802. doi:10.2337/diabetes.51.3.797.
- Mennen LI, Sapiinho D, Ito H, Bertrais S, Galan P, Hercberg S, et al. Urinary flavonoids and phenolic acids as biomarkers of intake for polyphenol-rich foods. *Br J Nutr*. 2006;96:191–8. doi:10.1079/BJN20061808.
- Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, et al. Generation of protein carbonyls by glycoxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett*. 1998;437:24–8. doi:10.1016/S0014-5793(98)01079-5.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr*. 2001;131:66–71.
- Osborn-Barnes HT, Akoh CC. Copper-catalyzed oxidation of a structured lipid-based emulsion containing alpha-tocopherol and citric acid: influence of pH and NaCl. *J Agric Food Chem*. 2003;51:6851–5. doi:10.1021/jf0261553.
- Rahimi R, Nikfar S, Larjani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother*. 2005;59:365–73. doi:10.1016/j.biopha.2005.07.002.
- Roche M, Dufour C, Mora N, Dangles O. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Org Biomol Chem*. 2005;3:423–30. doi:10.1039/b416101g.
- Rondeau P, Armenta S, Caillens H, Chesne S, Bourdon E. Assessment of temperature effects on beta-aggregation of native and glycated albumin by FTIR spectroscopy and PAGE: relations between structural changes and antioxidant properties. *Arch Biochem Biophys*. 2007;460:141–50. doi:10.1016/j.abb.2007.01.014.
- Rondeau P, Singh NR, Caillens H, Tallet F, Bourdon E. Oxidative stresses induced by glycoxidized human or bovine serum albumin on human monocytes. *Free Radic Biol Med* 2008;45:799–812.
- Sanchez-Reus MI, Gomez del Rio MA, Iglesias I, Elorza M, Slowing K, Benedi J. Standardized Hypericum perforatum reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenone-exposed rats. *Neuropharmacology*. 2007;52:606–16. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.09.003.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793–801. doi:10.1172/JCI29069.
- Singh NR, Rondeau P, Hoareau L, Bourdon E. Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic Res*. 2007;41:1078–88. doi:10.1080/10715760701487674.
- Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:151–74. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132446.
- Vasdev S, Gill V, Singal P. Role of advanced glycation end products in hypertension and atherosclerosis: therapeutic implications. *Cell Biochem Biophys*. 2007;49:48–63. doi:10.1007/s12013-007-0039-0.

- Vassiliou G, McPherson R. Role of cholesteryl ester transfer protein in selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by adipocytes. *J Lipid Res.* 2004;45:1683–93. doi:10.1194/jlr.M400051-JLR200.
- Wassef H, Bernier L, Davignon J, Cohn JS. Synthesis and secretion of apoC-I and apoE during maturation of human SW872 liposarcoma cells. *J Nutr.* 2004;134:2935–41.
- Whittaker JW. The irony of manganese superoxide dismutase. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:1318–21.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27:1047–53. doi:10.2337/diacare.27.5.1047.
- Wilson JX. Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:105–25. doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092647.
- Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, et al. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci.* 2008;82:1032–9. doi:10.1016/j.lfs.2008.03.003.
- Yoshida Y, Itoh N, Saito Y, Hayakawa M, Niki E. Application of water-soluble radical initiator, 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress. *Free Radic Res.* 2004;38:375–84. doi:10.1080/1071576042000191763.



Contents lists available at ScienceDirect

## Free Radical Biology &amp; Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/freeradbiomed](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed)

## Original Contribution

## Marked changes in endogenous antioxidant expression precede vitamin A-, C-, and E-protectable, radiation-induced reductions in small intestinal nutrient transport

Marjolaine Roche<sup>a</sup>, Francis W. Kemp<sup>b</sup>, Amit Agrawal<sup>a</sup>, Alicia Attanasio<sup>a</sup>, Prasad V.S.V. Neti<sup>c</sup>, Roger W. Howell<sup>c</sup>, Ronaldo P. Ferraris<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Pharmacology and Physiology, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ 07103, USA<sup>b</sup> Department of Preventive Medicine and Community Health, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ 07103, USA<sup>c</sup> Department of Radiology, New Jersey Medical School Cancer Center, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ 07103, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 July 2010

Revised 20 September 2010

Accepted 11 October 2010

Available online 21 October 2010

## Keywords:

Amino acids

Antioxidants

Catalase, Enzymes

Free radicals

Glutathione peroxidase

4-Hydroxynonenal

Intestinal mucosa

Oxidation

Peptides

Sugars

Superoxide dismutase

## ABSTRACT

Rapidly proliferating epithelial crypt cells of the small intestine are susceptible to radiation-induced oxidative stress, yet there is a dearth of data linking this stress to expression of antioxidant enzymes and to alterations in intestinal nutrient absorption. We previously showed that 5–14 days after acute  $\gamma$ -irradiation, intestinal sugar absorption decreased without change in antioxidant enzyme expression. In the present study, we measured antioxidant mRNA and protein expression in mouse intestines taken at early times postirradiation. Observed changes in antioxidant expression are characterized by a rapid decrease within 1 h postirradiation, followed by dramatic upregulation within 4 h and then downregulation a few days later. The cell type and location expressing the greatest changes in levels of the oxidative stress marker 4HNE and of antioxidant enzymes are, respectively, epithelial cells responsible for nutrient absorption and the crypt region comprising mainly undifferentiated cells. Consumption of a cocktail of antioxidant vitamins A, C, and E, before irradiation, prevents reductions in transport of intestinal sugars, amino acids, bile acids, and peptides. Ingestion of antioxidants may blunt radiation-induced decreases in nutrient transport, perhaps by reducing acute oxidative stress in crypt cells, thereby allowing the small intestine to retain its absorptive function when those cells migrate to the villus days after the insult.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

The gastrointestinal (GI) tract is the second most radiosensitive critical organ system in the body, preceded only by the hematopoietic system. The continuously regenerating epithelial cells in the mucosal lining of the small intestinal lumen are readily perturbed by radiation [1,2]. These cells are located mainly in the crypt and crypt/villus junction of the intestinal mucosa. It is well established that  $\gamma$ -rays generate free radicals and reactive oxygen species (e.g.,  $\text{H}_2\text{O}^+$ ,  $e^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}^+$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ) through the radiolysis of water, the major constituent of tissue, thereby indirectly damaging DNA and other biomolecules.

The small intestine has four tissue types: epithelial, muscle, nervous, and connective tissue. Epithelial cells comprise the mucosal layer that lines the luminal surface. High levels of radiation exposure

can cause intestinal epithelial denudation, and even higher doses can result in little or no subsequent regeneration, thereby affecting water, electrolyte, and nutrient uptake. Because the epithelial cells in the mucosal layer are responsible for digestive, absorptive, and barrier functions, acute radiation injury in humans contributes significantly to sugar malabsorption and diarrhea [3]. Secondary changes include infection, ulceration, and perforation. Early toxicity is mainly due to dysfunction of the mucosal epithelia [4]. Delayed or chronic radiation-induced toxicity typically involves all other tissue types and is a progressive condition with few therapeutic options and with substantial long-term morbidity and mortality. Severe delayed radiation enteritis is also serious, and about 10% of patients die as a direct result of radiation enteropathy. It is characterized by malabsorption, dysmotility, and transit abnormalities and features mucosal atrophy, intestinal fibrosis, and vascular sclerosis [4]. cDNA microarray analysis of the human ileum from patients with radiation enteritis revealed that genes involved in collagen synthesis, matrix metalloproteinase genes, and metalloproteinase inhibitor genes changed in expression, indicating morphological [5] changes being retained even several months after an acute 10-Gy insult. Early and delayed radiation enteritis were initially thought to be unrelated, but it is now known

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; GLM, general linear model; GI, gastrointestinal tract; LET, linear energy transfer; SOD, superoxide dismutase; 4HNE, 4-hydroxynonenal.

\* Corresponding author. Fax: +1 973 972 7950.

E-mail address: [ferraris@umdnj.edu](mailto:ferraris@umdnj.edu) (R.P. Ferraris).

0891-5849/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.689

that the severity of early events may determine the subsequent incidence and severity of chronic enteritis [6].

We recently studied intestinal sugar transport before overt radiation-induced damage to the intestinal epithelium [7]. Here, the effect of ionizing radiation on nutrient absorption was delayed as demonstrated by reductions in mouse intestinal glucose and fructose transport about 5–14 days after acute whole-body  $\gamma$ -irradiation with 7–10 Gy. Transporter mRNA levels decreased in a dose-dependent manner, paralleling reductions in nutrient transport. Although the morphological and functional effects of radiation are well known, the response of the endogenous antioxidant network in the small intestine is poorly characterized and has not been correlated with physiological responses. Our previous attempts could not detect radiation-induced changes in antioxidant enzyme expression at the same time that sugar absorption rates decreased [7].

In the present study, we tested the general hypothesis that changes in the expression of antioxidant enzymes occur before overt changes in mucosal morphology and function. This was achieved by testing a variety of interrelated hypotheses: (i) radiation alters the expression of antioxidant enzymes within hours postirradiation, even though overt symptoms of malabsorption occur many days later; (ii) changes in antioxidant expression should be greater in the crypt region, where most differentiating intestinal cells are located; (iii) radiation-induced changes in the levels of 4-hydroxynonenal (4HNE; a biomarker of oxidative stress [8]) are greater in the intestinal epithelia than in other tissues of the small intestine, and they occur at crypt–villus locations, similar to adaptive increases in antioxidant enzymes; (iv) consumption of a cocktail of antioxidant vitamins A, C, and E should protect the small intestine from the harmful effects of irradiation. A cocktail of these vitamins was chosen based on their previously demonstrated radioprotective capacity. Studies in our laboratory showed that vitamin A substantially mitigates the deleterious effects of chronic exposure to both low- and high-LET radiations in mouse testes [9]. Vitamin C mitigates radiation-induced damage even when administered after irradiation [10] and patients have benefited from taking vitamin C after abdominal radiotherapy [11]. Vitamin E has been reported to maintain jejunal, ileal, and colonic fluid absorption in irradiated rats [12]. Small intestinal crypt cell numbers, mucosal height, and goblet cell numbers were significantly protected from radiation effects by dietary vitamin E [13]. Cocktails of radioprotectors offer a means to further improve radioprotection. In fact, a combination of vitamins A, C, and E reduced bone marrow toxicity caused by radioimmunotherapy with  $^{131}\text{I}$ -labeled antibodies [14]. Vitamin C and E supplements reduced bleeding and diarrhea in patients with chronic radiation proctitis caused by pelvic irradiation [15]. Hence, vitamins A, C, and E have already been shown to protect the small intestine from radiation and therefore are excellent candidates for protecting against radiation-induced reductions in intestinal nutrient transport.

## Materials and methods

### Radiochemicals

D-Glucose, 3-O-methyl-D-glucose, L-carnosine, and taurocholic acid were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA); D-fructose was from Mallinckrodt (St. Louis, MO, USA); and L-proline was from Eastman (Kingsport, TN, USA). D- $^{14}\text{C}$ Glucose (31 MBq/ml) and L- $^3\text{H}$ glucose (37 MBq/ml) were purchased from Sigma; D- $^{14}\text{C}$ fructose (19 MBq/ml),  $^3\text{H}$ proline (37 MBq/ml), and  $^3\text{H}$ taurocholic acid (37 MBq/ml) were from ARC (St. Louis, MO, USA);  $^3\text{H}$ carnosine (37 MBq/ml) was from Moravik Biochemicals (Brea, CA, USA); and 3-O-methyl-D- $^{14}\text{C}$ glucose (3.7 MBq/ml) and [carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]inulin (37 MBq/ml) were from PerkinElmer (Waltham, MA, USA).

### Animals and irradiation

Swiss Webster adult male mice (average weight 37 g), 7–8 weeks of age, were purchased from Taconic Farms (Germantown, NY, USA). The experiments were conducted under a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey (Newark, NJ, USA). Mice were housed, one per cage, in sterilized, filtered, positive-air-flow cages with feed and water provided ad libitum. Pelleted AIN-76A rodent diet (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) was used for the control diet (Table 1). Cages were maintained in a climate-controlled room with a 12-h light/dark cycle in our Cancer Center Comparative Medicine Resource Center. As detailed in our earlier study [7], whole-body radiation absorbed doses were delivered acutely with a Mark I  $^{137}\text{Cs}$ -irradiator (661 keV  $\gamma$ -rays) operating at a calibrated dose rate of 1.14 Gy/min (JL Shepherd, San Fernando, CA, USA). Sham-irradiated mice (0 Gy) were placed in the irradiator for the time equivalent to the maximum  $^{137}\text{Cs}$  source exposure period without activating the source. All irradiations were performed at room temperature.

### Oxidative stress in irradiated animals

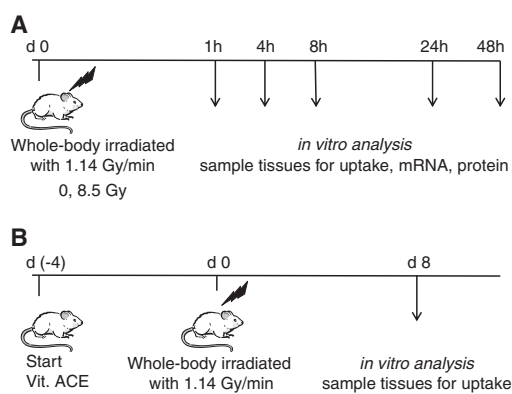
The study was divided into four trials done in series, with a total of 10–20 mice per trial (Fig. 1A). Mice were fed the control diet throughout the oxidative stress study. Whole-body doses of 8.5 Gy were delivered acutely and mice were randomly assigned to one of five groups. Groups were sacrificed at 1, 4, 8, 24, and 48 h postirradiation. Data from all trials were combined.

### Protection against radiation-induced reductions in nutrient transport with a cocktail of vitamins A, C, and E

The study was divided into six separate, sequential but identical trials with six mice per trial (Fig. 1B). Data from all trials were combined. Mice were maintained as described above. A  $2 \times 3$  factorial experimental design was followed with two diets and three radiation absorbed doses (0, 8.5, and 10 Gy) for a total of six groups. Group mean body weights were 34.4–37.7 g ( $n = 6$  per group). Mice were fed isocaloric diets, either AIN-76A or a modified AIN-76A rodent diet supplemented with 400 IU/g retinyl acetate (100 $\times$  control), 28.6 mg/g ascorbic acid phosphate (35% active), and 12.5 IU/g  $\alpha$ -tocopherol

**Table 1**  
Compositions of control diet and vitamins A, C, and E-supplemented diet

Composition	Control diet		ACE-enriched diet	
	% (g)	% (kcal)	% (g)	% (kcal)
Protein	20	21	19	21
Carbohydrates	66	68	63	68
Fat	5	12	5	12
AIN-76A ingredients	g	kcal	g	kcal
Casein, 80 mesh	200	800	200	800
DL-Methionine	3	12	3	12
Corn starch	150	600	150	600
Sucrose	500	2000	500	2000
Cellulose, BW200	50	0	50	0
Corn oil	50	450	50	450
Mineral mix, S10001	35	0	35	0
Vitamin mix, V10001	10	40	10	40
Choline bitartrate	2	0	2	0
Supplements				
Vitamin A acetate, 500,000 IU/g	0	0	0.8	0
Vitamin E acetate, 500 IU/g	0	0	25	0
Ascorbic acid phosphate (35% active)	0	0	28.6	0
Total	1000	3902	1054.4	3902



**Fig. 1.** Design of experiments wherein mice were acutely irradiated with low-LET  $\gamma$ -rays and sacrificed at various times postirradiation. (A) Mice were fed the control diet, irradiated, and sacrificed 1–48 h postirradiation. (B) Mice were fed the control diet or the diet supplemented with vitamins A, C, and E. Arrows refer to times postirradiation when mice were sacrificed. Day 8 was chosen for (B) based on a previous experiment tracking the time course of radiation-induced reductions in nutrient transport.

acetate (250 $\times$  control; Research Diets; Table 1). See the Discussion for the rationale of the dietary vitamin concentrations. This diet is referred to as the vitamin ACE-enriched diet.

All mice were acclimated for 10 days to the laboratory environment and the control rodent diet. After the 10-day acclimation period, the vitamin ACE-enriched diet was substituted for the control diet for the mice in the vitamin ACE group. This change provided a 4-day preirradiation ingestion of the vitamin-supplemented diet. Acute whole-body irradiation was carried out at absorbed doses of 8.5 or 10 Gy. Sham-irradiated mice (0 Gy) were placed in the irradiator, without activating the radiation source, for a duration equivalent to the time required to deliver the highest dose. Mouse weight and diet consumption were monitored before and after irradiation. The vitamin ACE-enriched diet was continued postirradiation until the animal was sacrificed.

#### Animal surgery

Mice were anesthetized with a cocktail containing 0.97% ketamine, 0.097% xylazine, 0.02% acepromazine in sterile water (5 ml/kg body wt). The small intestine was surgically removed 1, 4, 8, 24, or 48 h or 8 days postirradiation. The intestinal lumen was subsequently rinsed with an ice-cold Krebs Ringer bicarbonate solution (KRb1; 128 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 19 mM  $\text{NaHCO}_3$ , and 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.3–7.4) and immediately processed for determination of nutrient uptake and freezing for mRNA analyses, protein analyses, and sectioning for immunohistochemistry staining. After excision of the small intestine, the mouse was killed by intracardiac injection of 0.2 ml Euthasol (Virbac, Fort Worth, TX, USA).

#### Intestinal uptake rates

Uptake rates were determined in excised intestine as described earlier [7,16]. Briefly, several 1-cm segments of the duodenum and jejunum were individually mounted and everted on grooved steel rods (3-mm diameter). Because active transport of bile acids occurs only in the distal ileum, only this region was used for taurocholate

uptake. Rods with the everted intestinal segment were preincubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min in KRb1 buffer and bubbled with 95%  $\text{O}_2$ –5%  $\text{CO}_2$ .

For glucose uptake, the tissue was incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min in a freshly made oxygenated solution of KRb2 buffer (KRb1 buffer with 103 mM NaCl) containing 50 mM D-glucose, 380  $\mu\text{M}$  D- $^{14}\text{C}$ glucose, and 0.2  $\mu\text{M}$  L- $^3\text{H}$ glucose. Similarly, fructose uptake was measured after 2 min incubation in 50 mM D-fructose, 1.6  $\mu\text{M}$  D- $^{14}\text{C}$ fructose, and 0.2  $\mu\text{M}$  L- $^3\text{H}$ glucose. Uptake of the nonmetabolizable glucose analog 3-O-methyl-D-glucose was measured after 1 min incubation in 25 mM 3-O-methyl-D-glucose, 1.2  $\mu\text{M}$  D-3-O-methyl- $^{14}\text{C}$ glucose, and 0.2  $\mu\text{M}$  L- $^3\text{H}$ glucose. L- $^3\text{H}$ glucose was used to correct for adherent fluid and passive diffusion of glucose, fructose, and methyl-glucose. Finally, all sleeves were rinsed for 20 s in ice-cold KRb1 buffer with stirring.

For L-proline uptake, the segment was incubated in 50 mM L-proline, 0.2  $\mu\text{M}$  L- $^3\text{H}$ proline, and 20  $\mu\text{M}$  [*carboxyl- $^{14}\text{C}$* ]inulin; L-carnosine in 25 mM L-carnosine, 0.9  $\mu\text{M}$  L- $^3\text{H}$ carosine and 20  $\mu\text{M}$  [*carboxyl- $^{14}\text{C}$* ]inulin; and taurocholic acid in 0.6 mM taurocholic acid, 0.07  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]taurocholic acid, and 20  $\mu\text{M}$  [*carboxyl- $^{14}\text{C}$* ]inulin. In all cases, [*carboxyl- $^{14}\text{C}$* ]inulin was used to correct for adherent fluid.

Each 1-cm piece of intestine was transferred to a preweighed glass vial, weighed, and dissolved in 1 ml of Solvable (PerkinElmer) at 37  $^{\circ}\text{C}$  overnight. After tissue digestion, a 10-ml volume of Ecolume (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) was added to each vial and vortexed and  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  activity determined by dual-label counting with a manually calibrated LS 6500 multipurpose scintillation counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Quench curves were created using the LS 6500 software and counting samples with a range of tissue weights, each spiked with the same amount of  $^3\text{H}$  alone,  $^{14}\text{C}$  alone, or  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$ . Nutrient uptake is expressed as nmol/min/cm or nmol/min/mg of wet weight of intestine.

In the vitamin ACE experiment, glucose uptake was determined in the duodenum, jejunum, and ileum of each intestine, to estimate total intestinal glucose uptake. Uptake of all other nutrients was determined in the jejunum. Because almost all of the intestine was used for uptake measurements, levels of antioxidant expression could not be determined in the vitamin ACE experiment.

#### mRNA analysis

In the oxidative stress experiment, a 2-cm piece of jejunum was scraped to remove the mucosa, which was then immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and subjected to reverse transcriptase PCR using an iCycler thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and a SuperScript III reverse transcriptase kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cDNA obtained was subjected to real-time PCR for the SOD1, SOD2, catalase, glutathione peroxidase 1, and  $\beta$ -actin genes using the Mx3000P QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The real-time PCR was performed with Brilliant SYBR green QPCR master mix reagent (Stratagene). Earlier work showed  $\beta$ -actin expression to remain unaltered within the range of radiation doses used in this study, thereby serving as our housekeeping gene [7]. Thermal cycling proceeded with 40 cycles (initial activation step 10 min at 95  $^{\circ}\text{C}$ ; 40 cycles of 30 s at 95  $^{\circ}\text{C}$ , 1 min annealing temperature of primers, 30 s at 72  $^{\circ}\text{C}$ ; and terminal step 1 min at 95  $^{\circ}\text{C}$  and 30 s at 55  $^{\circ}\text{C}$ ). The amount of RNA was calculated with relative standard curves for RNA of the specific genes studied. Normalization to  $\beta$ -actin was conducted to account for variability in the concentration of total RNA. To examine for genomic contamination, the reaction was also carried out in samples that did not receive reverse transcriptase amplification reagents. A reverse transcriptase PCR was then carried out on total RNA, followed by three determinations by real-time PCR with the following primer sequences: (1) SOD1 (forward 5'-CAAGCGGTGAACCAAGTTGTGTGT-3', reverse 5'-TCACATTGCCAGGCTCTGGTCTCCAACAT-3'); SOD2 (forward 5'-



TGGAGAACCCAAAGGAGAGTTGCT-3', reverse 5'-TGTTGTCCTGC-AATGGGTCCTG-3'); (2) catalase (forward 5'-AGAGGAAACGCTGTGA-GAACA-3', reverse 5'-AGTCAGGGTGGACGTCAGTGAAT-3'); and (3) glutathione peroxidase 1 (forward 5'-TTCCCGTCAATCAGTTCG-GACA-3', reverse 5'-AGCCTCTCACCATTCACCTCGCA-3'); and (4)  $\beta$ -actin (forward 5'-TTGTTACCAACTGGGACGACATGG-3', reverse 5'-CTGGGGTGTGAAGGTCTCAACA-3'). These primers were designed to amplify only the mRNAs.

#### Western blot

A 2-cm piece was excised from the jejunum and scraped to separate the mucosa from muscle tissue, and the mucosa was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Frozen tissue ( $\sim 100$  mg) was homogenized in 1 ml of T-PER tissue protein extraction reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) with 10  $\mu\text{l}$  of cOmplete protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany), incubated on ice (10 min), and centrifuged (20 min) at 12,000 rpm at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was kept for protein quantification by the Bicinchoninic Acid CA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Samples were prepared with a Lane Marker Reducing Sample Buffer 5 $\times$  (Thermo Scientific) by boiling for 7 min. Samples and ladder kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad) were analyzed using a precast 12% Tris-HCl gel. The gel proteins were then transferred to a 0.45- $\mu\text{m}$ -pore nitrocellulose membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) using a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). The membrane was incubated in 5% nonfat milk in Tris-buffered saline-Tween 20 followed by overnight incubation with a primary antibody ( $4^{\circ}\text{C}$ ). After being washed, the membrane was incubated for 1 h with the secondary antibody. The primary antibodies were rabbit anti-mouse superoxide dismutase 1 (Millipore), rabbit anti-mouse superoxide dismutase 2 (Millipore), and goat anti-mouse catalase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). We were unable to find an anti-glutathione peroxidase 1 antibody that worked. The secondary antibodies were all horseradish peroxidase-conjugated antibodies: donkey anti-rabbit antibodies, sheep anti-mouse antibodies (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), and rabbit anti-goat antibodies (Millipore). Horseradish peroxidase was developed using a Western blotting detection kit (GE Healthcare) and autoradiography film (Denville Scientific, Metuchen, NJ, USA).

#### Preparation of intestinal mucosa for immunohistochemistry staining

Intestinal tissue (0.5 cm long) was fixed in 4% buffered paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned (6  $\mu\text{m}$  thick). Sections were deparaffinized and rehydrated, and epitope retrieval was achieved in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) in an autoclave. After initial incubation in 1% (for SOD1 sections) or 5% (for 4HNE sections) normal goat serum in PBS, sections were subsequently exposed to the primary antibody overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ .

Although there are no specific biomarkers for radiation-induced damage, oxidative stress arising from it has been detected by monitoring changes in levels of antioxidants, antioxidant enzymes, and biomarkers of oxidative stress such as 4HNE. 4HNE is a toxic unsaturated aldehyde formed during lipid peroxidation that can also bind to proteins to form carbonyls [8]. Thus we tracked the location of tissues that experienced radiation-induced oxidative stress with 4HNE.

Primary antibodies were rabbit anti-mouse SOD1 (1:1000 dilution in PBS) or rabbit anti-4HNE (1:200 dilution in PBS). Slides were rinsed with PBS and then incubated with a secondary antibody (Cy3-conjugated rabbit anti-goat IgG (1:200) or Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit (1:200)). Sytox green nucleic acid stain (1:300 dilution with deionized water) was applied to SOD1 sections and incubated for 15 min, followed by rinsing with distilled water. Coverslips were mounted to each slide using Vectashield mounting medium (Vector

Laboratories, Burlingame, CA, USA). Similar slides were prepared with the substitution of PBS for the primary antibody to check for nonspecific binding and extraneous excitation of the secondary antibody. Processing of tissues from different treatments was done using, where applicable, exactly the same solutions. Slides were viewed through a Zeiss LSM510 confocal microscope with argon laser (458, 488, 514 nm) and HeNe laser (543 nm) for simultaneous collection of two fluorescent signals. To facilitate comparison of images, acquisition of images was accomplished using exactly the same confocal settings (see Supplemental Fig. S3).

#### Statistics

Values are expressed as means  $\pm$  standard error. Two-way ANOVA or general linear model (GLM) analysis for unbalanced data was used to determine the statistical significance. Pairwise differences were evaluated subsequent to two-way ANOVA or GLM data by comparison of least-square means. Statistical evaluations were performed using StatView 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) and SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

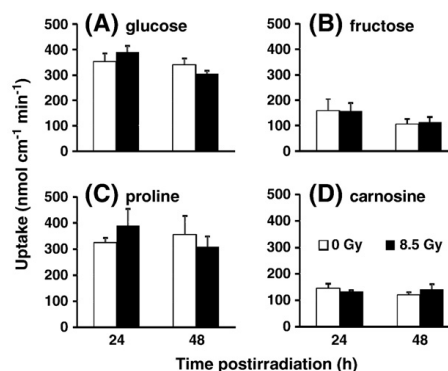
#### Results

##### Nutrient uptake at 24 and 48 h postirradiation

We have previously shown that radiation-induced decreases in intestinal sugar uptake and transporter mRNA levels were observed mainly 8–15 days after acute whole-body  $\gamma$ -irradiation with absorbed doses of 7–10 Gy [7]. We now find that there was little or no change in antioxidant mRNA expression in the intestinal mucosa during this time (Supplemental Fig. S1). Conversely, to demonstrate that the intestine was absorbing nutrients within 48 h postirradiation, when most changes in antioxidant expression described below occurred, we show that glucose uptake did not change significantly with dose or time postirradiation (Fig. 2A). Fructose, proline, and carnosine uptake (Figs. 2B–D) also did not change significantly with radiation dose ( $P > 0.80$  by two-way ANOVA for all nutrients) and time postirradiation ( $P > 0.17$  for all nutrients).

##### Time course of changes in mRNA expression of antioxidant enzymes

In contrast to the absence of radiation-induced reduction of nutrient transport at  $t < 48$  h, levels of the cytosolic antioxidant enzyme



**Fig. 2.** In vitro measurements of nutrient uptake rates in isolated jejunum of unirradiator and irradiated (8.5 Gy) mice 24 and 48 h postirradiation. (A) D-glucose, (B) D-fructose, (C) proline, and (D) carnosine uptake per centimeter. Results are means  $\pm$  SE ( $n = 6$ ). By two-way ANOVA, there were no significant effects of radiation or of time postirradiation on any nutrient uptake (see text for  $P$  values).

SOD1 mRNA varied with postirradiation time ( $P=0.02$  by two-way ANOVA) and dose (borderline,  $P=0.06$ ), with a highly significant interaction between postirradiation time and dose ( $P=0.01$ ; Fig. 3A). The statistically borderline dose dependence is based on the fact that mRNA abundance was not expected to and actually did not change significantly in unirradiated mice. The significant interaction indicated that the dependence of mRNA abundance on dose depended on postirradiation time (Fig. 3A). For example, SOD1 expression was similar for 0 and 8.5 Gy at both 4 and 48 h postirradiation. At 8 and 24 h, mucosal SOD1 mRNA abundance was two to four times greater in 8.5 Gy mice compared to the abundance in control mice sacrificed at the same time. In contrast, at 1 h postirradiation, the SOD1 mRNA abundance in unirradiated mice was several fold greater than in irradiated mice. It should be noted that because the RNA was extracted only from the mucosa, these radiation-induced changes reflected changes mainly in the intestinal absorptive cells.

Patterns of expression were similar for the other antioxidant enzymes. For mRNA levels of mitochondrial SOD2, their dependence on postirradiation time ( $P=0.11$ ) and dose ( $P=0.06$ ) was borderline but the interaction was quite robust ( $P=0.01$ ; Fig. 3B). For SOD2, differences were observed mainly at 4, 8, and 24 h, when expression increased by two to three times in irradiated mice. The mRNA abundance of catalase varied with postirradiation time ( $P=0.03$ ) but not dose ( $P=0.22$ ), and the interaction of these two variables was highly significant ( $P=0.007$ ; Fig. 3C). Catalase mRNA levels were greatest at 24 h postirradiation and decreased markedly by 48 h to levels observed at 1 h postirradiation. For glutathione peroxidase 1 (Fig. 3D), mRNA levels depended significantly on postirradiation time ( $P=0.007$ ) and dose ( $P=0.002$ ), and there was an interaction between dose and postirradiation time ( $P=0.0005$ ). Glutathione peroxidase 1 mRNA abundance peaked at 8 h to levels six times greater than control and then decreased gradually.

It is important to point out that mRNA levels of all antioxidant enzymes in unirradiated mice did not vary as a function of time ( $P>0.50$  by one-way ANOVA). This strongly supports consistency in sampling and analysis. Moreover, the levels of mRNA for all anti-

oxidant enzymes in irradiated mice were always much less ( $3\text{--}8\times$  decrease,  $P<0.02$ ) than in controls at 1 h. This indicates that the effect of acute whole-body irradiation on antioxidant enzyme expression was triphasic: (i) rapid decrease of steady-state levels of mRNA occurring in minutes, (ii) dramatic upregulation occurring within hours, and (iii) another downregulation occurring within a day or two after irradiation. Expression of antioxidant mRNA in irradiated mice was  $10\text{--}20\times$  less at 1 h compared to that at peak expression occurring 7–23 h later. Finally, like the findings at 48 h, it was determined that at 8 days postirradiation, mRNA expression levels of SOD1, SOD2, catalase, and glutathione peroxidase 1 were similar in irradiated and unirradiated mice (Supplemental Fig. S1).

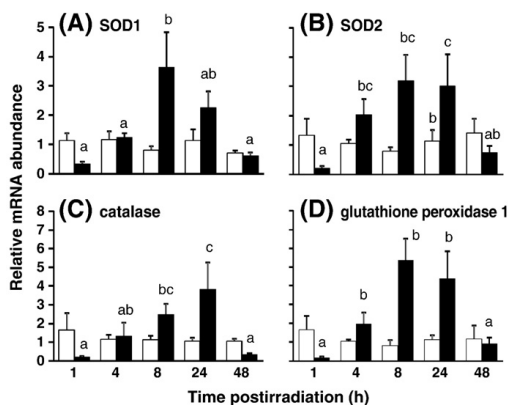
#### Abundance of antioxidant enzymes after acute irradiation

The pattern of radiation-induced changes in protein abundance of antioxidant enzymes was less pronounced but generally followed that for mRNA abundance (Fig. 4A). Like their mRNA abundance, intestinal SOD1, SOD2, and catalase protein levels in irradiated mice tended to peak 8–24 h postirradiation ( $P<0.10$  by one-way ANOVA), but generally by only about twofold compared to unirradiated mice (Fig. 4B). Because the protein homogenates were derived from mucosal scrapes, these changes reflect alterations in levels of antioxidant enzymes in the absorptive cells.

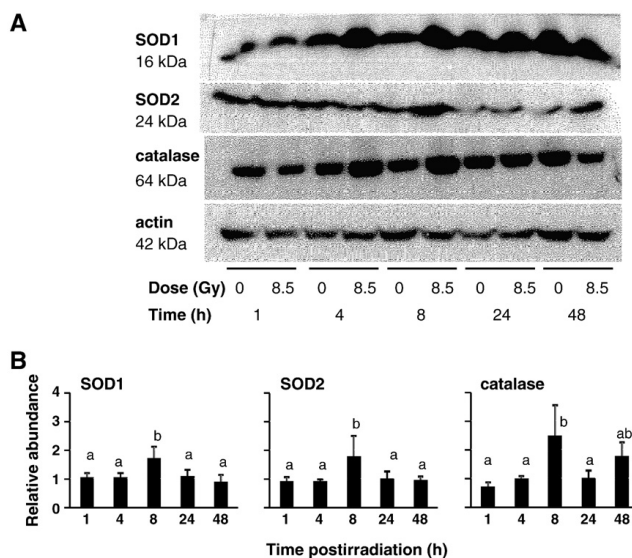
#### Levels and immunolocalization of 4HNE and SOD1

Levels of 4HNE were apparently greater in the small intestine of mice 8 h after acute whole-body irradiation with 8.5 Gy (Fig. 5). The 8-h time point was chosen because the greatest antioxidant enzyme response was observed at this time postirradiation. In unirradiated mice, there was little fluorescence evident in the absence of primary antibody (Fig. 5A), and there was little evidence of endogenous 4HNE when probed with anti-4HNE (Fig. 5B). Absence of primary antibody also produced little fluorescence in the intestine of irradiated mice (Fig. 5C). Levels of 4HNE were much greater in epithelial cells (e) lining the intestinal lumen as opposed to the submucosa (s) and muscle (m) layers underneath (Fig. 5D). Even when irradiated, there was negligible fluorescence with no antibodies or with only the primary antibody, thereby suggesting no endogenous fluorescence (Supplemental Figs. S2A and S2C). Different sets of unirradiated and irradiated mice showed similar results (Supplemental Figs. S2B and S2D).

Increases in the levels of SOD1 seemed much greater in the intestinal epithelial cells relative to the submucosa and muscle layers (Fig. 6). Intestines of unirradiated mice had low levels of SOD1 (Figs. 6A–D), with greatest concentrations in the crypt regions. Constitutive SOD1 expression seems to be mainly in the cytosol and appears to be higher in the crypt region (c), where cells are rapidly dividing, compared to upper villus regions (v). There is almost no fluorescence in the absence of SOD1 antibody (Figs. 6E–H). Intestines of mice 8 h after irradiation with 8.5 Gy seemed to show increases in levels of SOD1 (Figs. 6I–L)—these results confirm findings of Western blots (Fig. 4) obtained from different mice, which indicated greater SOD1 expression in irradiated mice. There was little SOD1 expression in the basal lamina right below the crypt. Most increases in SOD1 expression appeared to be in the crypt region (Supplemental Fig. S3). In the absence of SOD1 antibody, there was little fluorescence (Figs. 6M–P) in intestinal sections obtained from irradiated mice. The villus–crypt difference in fluorescence is markedly greater when the antibody is present than when it is absent (compare Figs. 6L and D to P and H), suggesting that the radiation-induced villus–crypt gradient in fluorescence without the antibody cannot fully explain the marked, radiation-induced difference in the villus–crypt fluorescence gradient with the antibody. Some compounds such as NADH exhibit autofluorescence [17], and radiation-induced perturbations in the levels of



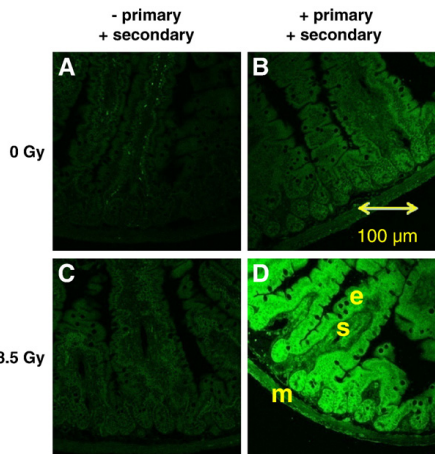
**Fig. 3.** Relative mRNA abundance of antioxidant enzymes in isolated jejunum of unirradiated (open bars) and irradiated (8.5 Gy, filled bars) mice. (A) SOD1, (B) SOD2, (C) catalase, and (D) glutathione peroxidase 1 as measured by real-time PCR. mRNA was collected from the mucosa of the proximal small intestine of mice fed control diet and sacrificed 1, 4, 8, 24, and 48 h postirradiation. Results are means  $\pm$  SE ( $n=6$ ). Filled bars with different superscripts are significantly different ( $P<0.05$  by one-way ANOVA). Thus, there is a marked decrease in the levels of mRNA at 1 h postirradiation, followed by a dramatic increase, and then a decline to levels similar to those of unirradiated mice. Open bars are similar throughout, indicating that expression in unirradiated mice did not change over time.



**Fig. 4.** (A) Effect of  $\gamma$ -irradiation on protein abundance of the antioxidant enzymes SOD1, SOD2, and catalase as determined by Western blotting of mucosal homogenates. Homogenates were obtained from the jejunum of mice fed the control diet and sacrificed 1, 4, 8, 24, and 48 h postirradiation. (B) Mean relative antioxidant enzyme protein levels based on densitometry scans of Western blots. Results are the ratios of the densities corresponding to 8.5 and 0 Gy from homogenates obtained from the same trial. Results are means  $\pm$  SE ( $n = 5$  for SOD1,  $n = 5$  for SOD2, and  $n = 4$  for catalase). Bars with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$  by one-way ANOVA).

these autofluorescent compounds in the crypt may be the source of the small villus-crypt gradient in endogenous autofluorescence shown in Fig. 6P. Although there was little change in the intensity of

nuclear staining upon irradiation (Figs. 6A, E, I, M), there were marked radiation-related changes in the intensity of SOD1 fluorescence (Figs. 6B, F, J, N and D, H, L, P). SOD1 levels in epithelial cells seemed greater than those in the submucosa and muscle (Figs. 6D and L).



**Fig. 5.** Immunolocalization of the oxidative stress biomarker 4HNE in the small intestine of mice 8 h after acute whole-body irradiation with 8.5 Gy. (A) Intestinal section from unirradiated mouse probed with a secondary (Alexa 488 goat anti-rabbit) antibody but no primary (rabbit anti-4HNE) antibody. (B) Section from unirradiated mouse probed with both primary and secondary antibodies. (C) Section from irradiated mouse probed with a secondary antibody only. (D) High levels of 4HNE were found in the intestine of irradiated mice probed with primary and secondary antibodies. Epithelial cells (e) lining the mucosa seemed to have greater amounts of 4HNE than the submucosal (s) or muscle (m) layers.

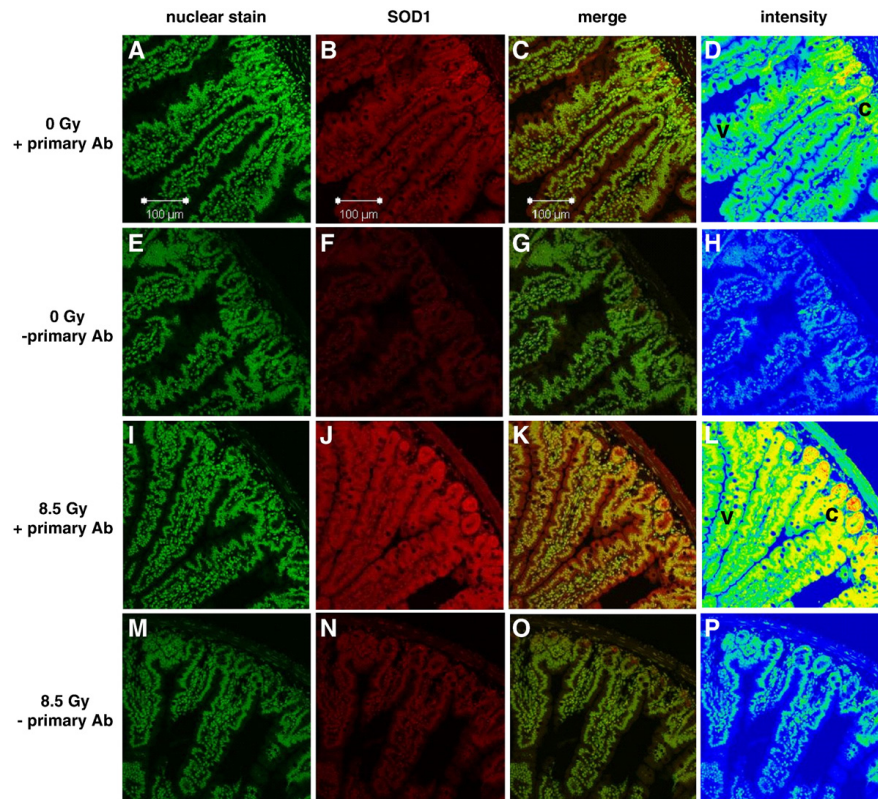
*Radioprotection of intestinal nutrient transport*

*Dietary intake, body weight, and intestinal weight*

Consumption of the vitamin ACE diet was not significantly different from that of the control diet (Fig. 7). However, at 8 days postirradiation, food intake in the 10-Gy mice was reduced by ~25% ( $P = 0.0001$ ) in comparison to both the 0- and the 8.5-Gy-exposed mice, whose food intakes did not differ or differed modestly. Our earlier studies in calorie-restricted mice indicate that acute (2-day to 2-week) reductions in daily food consumption by up to 30% have no effect on intestinal nutrient transport [18]. Body weights were independent of dose except at 8 days postirradiation ( $P = 0.03$ ). Total intestinal weight is largely unchanged 8 days after irradiation with 8.5 Gy (Table 2). However, irradiation with 10 Gy results in a small but significant ( $P < 0.05$ ) reduction in total intestinal weight. This reduction is mitigated significantly by the vitamin ACE diet (Table 2).

*Sugar transport*

To clearly demonstrate protection, we first tested by one-way ANOVA if radiation reduced intestinal uptake of sugars in mice fed the control diet and, if it did, whether a cocktail of the dietary vitamins A, C, and E prevented radiation-induced decreases in uptake. D-Glucose uptake decreased with dose in control ( $P = 0.05$ ) but not in vitamin-supplemented ( $P = 0.80$ ) mice (Fig. 8A). Uptake of the nonmetabolizable analog 3-O-methyl-D-glucose tended to decrease with dose ( $P = 0.20$ ), but not when mice were consuming vitamins A, C, and E ( $P = 0.85$ ; Fig. 8B). The 30% decrease in D-glucose and 3-O-methyl-D-glucose uptake at 10 Gy was clearly prevented by the antioxidant vitamins. Fructose uptake decreased with dose by threefold



**Fig. 6.** Immunolocalization of SOD1 (red) in the small intestine after acute whole-body irradiation with 0 and 8.5 Gy. Sections in column 1 were stained with Sytox green (nuclear stain). Column 3 represents merged images from columns 1 and 2, and column 4 depicts staining intensity where blue represents low, green modest, yellow high, and red highest intensity. Sections from unirradiated mice with primary antibody (row 1, A–D) and without (row 2, E–H) and irradiated mice with primary antibody (row 3, I–L) and without (row 4, M–P) are shown. SOD1 expression is greater in irradiated mice (compare B, C with J, K), confirming the Western blots in Fig. 4. Control images H and P show no difference in intensity of staining of cytosol and nuclei along the crypt–villus axis when no anti-SOD1 is present. Before irradiation, endogenous SOD1 expression seems already greater in the crypt (D, top right, c) as opposed to the upper villus (v) regions. After irradiation, there is a dramatic increase in SOD1 throughout the mucosa and little increase in SOD1 in the submucosal and muscle layers (L). SOD1 expression seems greatest in the crypt (c) region of intestines from irradiated mice (L).

( $P=0.0009$ ) in mice fed control diets (Fig. 8C). Fructose uptake also decreased in irradiated mice that were fed vitamin-supplemented diets ( $P=0.02$ ); however, at 10 Gy, fructose uptake in vitamin-supplemented mice was much greater (threefold) than in unsupplemented mice. Likewise, D-glucose ( $P=0.04$ ) and 3-O-methyl-D-glucose ( $P=0.09$ ) uptake was also greater in vitamin-treated mice than in control mice at 10 Gy. Treatment with vitamins also tended to rescue D-glucose uptake at 8.5 Gy ( $P=0.17$ ).

#### Amino acid, peptide, and bile acid transport

Intestinal uptake of nutrients other than sugars also decreased with dose. In mice fed control diets, proline absorption decreased in a dose-dependent manner, with 30 and 40% reductions at 8.5 and 10 Gy, respectively ( $P=0.008$ ; Fig. 8D). Supplementing the diet with vitamins ACE again prevented the decrease ( $P=0.68$ ). Absorption of the dipeptide carnosine also decreased with dose in dietary control ( $P=0.04$ ) but not in vitamin-supplemented ( $P=0.95$ ) mice (Fig. 8E). Taurocholate absorption was independent of radiation dose in mice eating either the control ( $P=0.24$ ) or the vitamin-supplemented ( $P=0.23$ ) diet (Fig. 8F). In all cases, patterns of nutrient uptake, when

expressed per milligram (not shown), mirrored those expressed per centimeter of intestine.

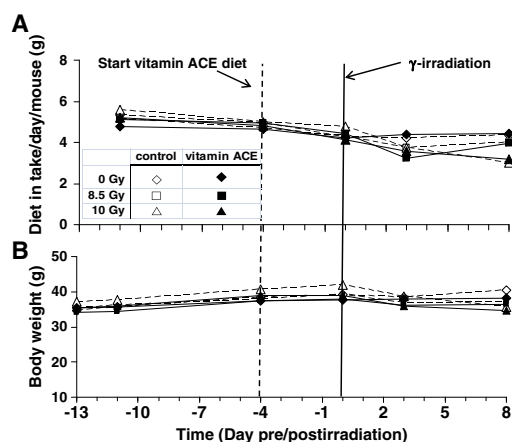
At 10 Gy, proline, carnosine, and taurocholate uptake was greater ( $P=0.01$  to  $0.07$ ) in vitamin-treated than in control mice, suggesting that antioxidant vitamins increased uptake rates at absorbed doses that compromised nutrient transport.

#### Total glucose uptake

To portray the effect of acute  $\gamma$ -irradiation on nutrient absorptive function of the entire intestine, glucose uptake was determined not only in the jejunal (Fig. 8A) but also in the duodenal and ileal regions of the small intestine (not shown). When uptake was integrated from proximal through distal regions, the total uptake capacity of the intestine could be estimated (Fig. 9). Total absorptive capacity of the intestine for glucose decreased with dose ( $P<0.05$ ), but not in mice fed the vitamin ACE diet ( $P>0.50$ ).

#### Intestinal permeability

L-Glucose uptake, a measure of intestinal permeability, was affected neither by diet nor by radiation (Supplemental Fig. S4).



**Fig. 7.** As diagrammed in Fig. 1B, this is the effect of diet and radiation dose on (A) dietary intake (g per day per mouse) and (B) body weight as a function of time pre- and postirradiation. Here, the mice were irradiated with 0 (control), 8.5, or 10 Gy at day 0 (see solid vertical line). The mice were housed one per cage and fed with either control or vitamin ACE-enriched diet. Mean results are plotted,  $n = 6$ . Standards errors have been omitted for clarity. Mice were fed with the control diet from day  $-13$  to day  $-4$ . Then, half of the mice were switched to the vitamin ACE-supplemented diet (dashed vertical line). Diet and radiation dose had modest effects on feeding rate and body weight.

**Summary of nutrient uptake studies**

In summary, 8 days after acute irradiation with 8.5 and 10 Gy, intestinal absorption of most nutrients decreased, but consumption of antioxidant vitamins prevented these radiation-induced decreases in nutrient uptake.

**Discussion**

About 600,000 cancer patients undergo radiation therapy each year, of which over 200,000 involve the abdominal and pelvic areas. Intestinal dysfunction occurs in 60–90% of patients receiving abdominal radiation therapy, and a conservative estimate of the number of patients with radiation-induced intestinal dysfunction living in the United States is 2 million [4]. Prognosis is poor, and some patients require prolonged parenteral nutrition and about 10% eventually succumb. The side effects of irradiation on intestinal structure and function, termed radiation enteritis, dictate the upper limits of radiation therapy involving abdominal organs. Although radiation enteritis is a severe problem in patients receiving abdominal or pelvic radiation therapy, there is no standardized strategy for medical pre-

vention and therapy [19]. A major gap in knowledge pertaining to radiation enteritis is the absence of studies linking changes in oxidative stress and adaptations of the antioxidant network with alterations in intestinal function. Additional information about this link may shed light on methods that may increase the radiation tolerance of normal intestinal tissue to improve the quality of life of cancer survivors and to enhance radiation efficacy by dose escalation [20].

The main and novel findings of this study are that (1) the time course of radiation-induced changes in the expression of antioxidant enzymes differs from that of radiation-induced reductions in intestinal absorptive function, (2) the cell type and location expressing the greatest changes in levels of oxidative stress and in antioxidant enzymes are, respectively, epithelial cells responsible for nutrient absorption and the crypt region comprising mainly undifferentiated cells, and (3) a cocktail of the antioxidant vitamins A, C, and E is an effective radioprotector of intestinal absorptive function when consumed before irradiation. Because nutrient transporters are expressed only in epithelial cells, the tissue type with the greatest levels of 4HNE, it is not surprising to detect reductions in nutrient uptake several days after intestines are exposed to radiation. Two minor findings reported here for the first time are that (1) the radiation-induced decline in glucose transport is probably due to effects on the transport step, because radiation also decreased the transport of the nonmetabolizable glucose analog, 3-O-methyl-glucose, and (2) the absorption of the dipeptide carnosine decreased as a function of radiation absorbed dose.

*Oxidative stress and antioxidant enzymes in intestinal mucosa*

There are only a few studies that have focused on understanding radiation-induced oxidative stress on the small intestine. Repeated low-dose exposure (0.25 Gy monthly irradiation for a total of 4.5 Gy) of the whole body increases the concentration of thiobarbituric acid-reactive substances (a biomarker of oxidative stress) and activities of glutathione peroxidase in the small intestine but not in most other organs [21], indicating the highly radiosensitive nature of the small intestine relative to other organ systems.

Radiation-induced changes were observed in small intestinal mRNA and protein expression, as well as in the activity of several antioxidant enzymes, in antibiotic-treated mice exposed to high dose (14 Gy) abdominal irradiation [22]. Of the nine antioxidant enzymes examined, only SOD2 and thioredoxin 2 (both localized in the mitochondria) responded 6 h after exposure of the small intestine to 14 Gy. These interesting findings were similar to our results and provide additional evidence of the rapid response of intestinal antioxidant enzymes to acute high-dose irradiation. No other time points were examined by Haton et al. [22]. However, it may be essential to track the time course of the antioxidant response to irradiation, because the magnitude of change in mRNA expression of these enzymes may be transient and seems dependent on time after irradiation. In mouse skin, the redox-sensitive transcription factor NF- $\kappa$ B and a group of NF- $\kappa$ B-related proteins are activated within 15 min of exposure to ionizing radiation [23], leading to increases in SOD2 expression and activity 24 h later [24]. Thus, it will be interesting to determine whether NF- $\kappa$ B inhibitors will prevent the rapid and transient radiation-induced increases in expression of antioxidant enzymes in mouse small intestine *in vivo*.

Four days after acute abdominal irradiation of mice with 14 Gy, intestinal structural damage was evident, and it was paralleled by reductions in SOD1, SOD2, and catalase mRNA expression and activity [22]. These findings are not surprising because anatomical destruction of the intestinal tissue would reduce if not outright prevent the expression of many genes and probably indicate that the antioxidant network of the intestine has been overwhelmed. We have earlier shown, by tracking nutrient uptake for several days after irradiation,

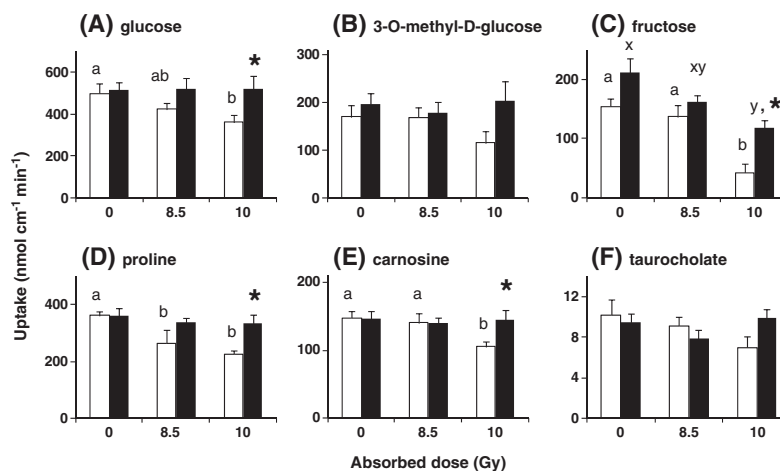
**Table 2**  
Lengths and weights of mouse intestines 8 days postirradiation<sup>a</sup>

Diet	Absorbed dose (Gy)	Segment weight (mg/cm)		Total intestinal weight (g)	Total intestinal length (cm)
		Proximal	Distal		
Control	0	64 ± 2	23 ± 1	1.65 ± 0.08	46 ± 1
ACE	0	59 ± 2	26 ± 2	1.61 ± 0.08	46 ± 1
Control	8.5	61 ± 3	28 ± 5	1.56 ± 0.11	47 ± 1
ACE	8.5	59 ± 1	22 ± 1	1.65 ± 0.06	48 ± 0
Control	10	50 ± 1*	20 ± 1	1.40 ± 0.09*	46 ± 1
ACE	10	57 ± 2	21 ± 1	1.54 ± 0.10	48 ± 1

Values are means ± SE of six independent experiments.

<sup>a</sup> Data obtained from parallel studies.

\*  $P < 0.05$ , significantly different.



**Fig. 8.** In vitro measurements of (A) D-glucose, (B) 3-O-methyl-D-glucose, (C) D-fructose, (D) proline, and (E) carnosine uptake rate in the jejunum of mice irradiated with 0, 8.5, or 10 Gy and sacrificed 8 days postirradiation. (F) Taurocholate uptake was determined in the distal ileum. Mice were fed the AIN-76A diet (control, open bars) or an AIN-76A diet supplemented with a cocktail of vitamins A, C, and E (filled bars). Results are means ( $\pm$  SE) of six independent experiments. Open bars with different letter superscripts are significantly different from other open bars ( $P < 0.05$  by one-way ANOVA), suggesting that increasing radiation dose reduces uptake rate. With the exception of fructose, filled bars did not decrease with increasing radiation dose, suggesting that consumption of the vitamin ACE-supplemented diet prevented the radiation-induced reduction in uptake. Filled bars with asterisks are significantly greater ( $P < 0.05$  by one-way ANOVA) than open bars at the same radiation dose, suggesting that uptake is greater in tissues from vitamin-treated mice. Similar results are obtained when uptakes are expressed per milligram of intestine.

that at 8.5–10 Gy, nutrient absorption decreases ~8–14 days after irradiation [7]. Reductions in absorptive function decrease before overt morphological damage can be observed.

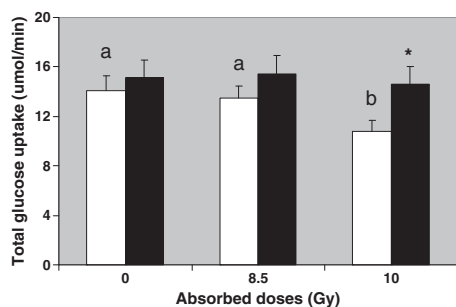
Other in vivo studies have used the approach of providing antioxidant supplements, as well as potentially radioprotective compounds, and then evaluating radiation-induced changes in the levels of antioxidants and antioxidant enzymes in animal models. In these studies, lipid peroxides have generally been shown to increase with absorbed dose. However, it was not consistently clear from these studies whether irradiation increases endogenous antioxidant enzyme expression or activity and whether glutamine in humans [25], selenium in rats [26], vitamin E in rats [26], Triphala in mice [27], and melatonin in rats [28] could enhance endogenous antioxidant activity

in the small intestine after irradiation. Perhaps the failure to observe clear effects of exogenous antioxidants on endogenous antioxidant enzyme expression or activity is due to the transient nature of the response of endogenous antioxidants. Regardless of their inconsistent effect on endogenous antioxidant expression or activity, these exogenous antioxidants were consistently shown to offer radioprotection for the small intestine by reducing levels of oxidative damage.

#### Location of radiation-induced antioxidant enzyme expression

The crypt–villus site of radiation-induced changes in intestinal antioxidant enzyme expression is apparently unknown, even though this information is critical because it identifies the cell types or locations that respond to radiation insults regardless of whether other overt changes are apparent. Here we show that, although radiation-induced increases in 4HNE levels are remarkable in almost all tissue types, the greatest increase seems localized mainly in the innermost mucosal layer comprising epithelial cells. Because 4HNE levels seem homogeneous along the crypt–villus axis of epithelial cells, oxidative damage (as indicated by 4HNE location) may be similar among epithelial cells at various stages of development. In contrast, the crypt–villus location of antioxidant enzyme adaptation clearly indicates that SOD1 expression first increases markedly in crypt cells. Epithelial cells along the crypt–villus axis differ not only in terms of development, but also in terms of radiosensitivity [1,29], with differentiated villus cells being relatively much less radiosensitive. Actively proliferating intestinal stem cells in the crypt region are among the most radiosensitive cells in the body, and their sensitivity ( $LD_{50} < 1$  Gy [30]) is an order of magnitude lower than those of other tissues in the mucosa (e.g., endothelium, > 10 Gy [31]; neuronal tissue, > 20 Gy [32]).

Intestinal irradiation slows down the rate of mitosis and proliferative activity of crypt cells and therefore the replacement of villus cells within 12–48 h postirradiation [29,33]. Replacement of villus cells is dependent on the number of and rate of division of surviving stem cells in the crypt. If no crypt cells survive at very high doses, then the villus is denuded and ulcers occur and nutrient transport



**Fig. 9.** Total glucose uptake for the entire small intestine, estimated by integrating uptake rates from the duodenal, jejunal, and distal regions. Open bars (controls) with different letter superscripts are significantly different ( $P < 0.05$  by one-way ANOVA), suggesting that increasing radiation dose reduced uptake rate. Filled bars (ACE diet) did not change with radiation dose, suggesting that consumption of the vitamin ACE-supplemented diet prevented the radiation-induced reduction in uptake. The filled bar with asterisk is significantly greater ( $P < 0.05$  by one-way ANOVA) than the open bar at 10 Gy, suggesting that uptake was greater in tissues from vitamin-treated mice.

decreases without recovering. If some crypt cells survive, the villus is eventually regenerated and the time of regeneration is dependent on the severity of the insult to the crypt. When the villus is repopulated with functionally mature enterocytes, nutrient transport recovers.

There have been reports that microvascular endothelial apoptosis in the submucosal and muscle layers is the primary lesion leading to intestinal dysfunction [31]. However, at absorbed doses above and below the threshold for death from the GI syndrome, recent work has demonstrated that vascular endothelial cell apoptosis does not seem to be the cause of the GI syndrome [34]. Most cells affected by ionizing radiation actually reside in the epithelium.

The gastrointestinal glutathione peroxidase 2 is highly expressed in the intestinal crypt region [35], and it will be interesting to evaluate its role in radioprotection, because irradiation seems to markedly affect the crypt region. Glutathione peroxidase 2 is protective against intestinal inflammation *in vivo* [36] and its expression, as well as activity, is induced by intestinal luminal microflora [37].

#### *Radioprotection of intestinal transport function*

Although there has been a large number of studies evaluating potential radioprotectors for the small intestine, there has been only a few that focused on radioprotection for nutrient absorptive function. When given before irradiation, a diet high in saturated, but not polyunsaturated, fatty acids prevented the radiation-associated decline in intestinal uptake of glucose and some fatty acids [38]. A synthetic prostaglandin (enprostil) did not prevent the radiation-associated decline in intestinal glucose uptake when given before or after irradiation [39]. Preradiation treatment with antioxidant selenium led to a lower incidence of diarrhea in patients receiving pelvic radiation [40], suggesting that consumption of antioxidants before irradiation can diminish the adverse effects of radiation on intestinal function.

The top five nutraceuticals in terms of U.S. sales are vitamin C, coenzyme Q, vitamin E, vitamin A/ $\beta$ -carotene, and noni juice. We have previously shown that vitamin A alone does not protect the small intestine from damage caused by acute whole-body irradiation [7], hence we here chose to provide a cocktail of vitamins A, C, and E, a mixture that turned out to be an excellent radioprotector. The experimental level of 0.3 g or 150,000 IU/kg diet of vitamin A has been shown by Friedenthal et al. to be highly protective of the GI tract against radiation damage [41]. This level is nontoxic to rats even when consumed for 1 year [42]. Humans consuming 1,000,000 IU/day for 5 years have not experienced vitamin A toxicity [43]. About 100 $\times$  the RDA is the likely dietary limit [44].

The control diet did not contain vitamin C, which mice synthesize. The optimal level of vitamin C for radioprotection of testes is about 10 g/kg diet [45], hence we added an equivalent (in terms of activity) amount (29 g/kg diet) of vitamin C phosphate (only 35% active). When injected into target tissue or peritoneum, vitamin E is a highly effective radioprotector particularly for the small intestine [26,46], but injections are often impractical. Vitamin E may be added at 3 $\times$  the minimum required in the diet to be effective in intestinal and hepatic radioprotection [26,47]. Dietary vitamin E, at 30 $\times$  control values, suppresses lipid peroxidation in cancerous tissue [48]. Even higher levels (250 $\times$ , 10,000 IU/kg diet) protected crypt cell numbers, mucosal height, and goblet cell numbers against radiation effects [13]. Although very high, these levels consumed for 2 weeks did not cause vitamin E toxicity in rats [13].

Dietary antioxidant vitamins can potentially protect both normal and malignant gut tissues from irradiation. Thus, patients who take antioxidant vitamins during radiation therapy of their malignant tumor may have fewer bouts of diarrhea, but may also experience reductions in the anti-tumor efficacy of ionizing radiation. However, Blumenthal et al. have shown that, in the context of radioimmunotherapy of GW-39 human colon cancer xenografts in mice with <sup>131</sup>I-MN14 anti-CEA IgG, a cocktail of vitamins A, C, and E facilitated a

42% increase in maximum tolerated dose and protected against reductions in body weight and myelosuppression [14]. They also observed that, although this cocktail of vitamins afforded considerable protection of normal tissues, no protection was extended to the tumor. These findings are consistent with recent epidemiological studies conducted by Simone et al. that show that patients who underwent radiation therapy and took nonprescription antioxidants actually had increased survival [49,50]. Taken together, these and our studies auger well for the use of vitamins as radioprotectors of normal tissue in the context of radiotherapy of cancer.

#### **Perspective**

In summary, using radiation absorbed doses that clearly result in marked reductions in nutrient transport and that acutely increase levels of oxidative stress and expression of antioxidant enzymes in intestinal epithelial cells responsible for nutrient absorption, we found that ingestion of high levels of antioxidants for a few days before irradiation may blunt radiation-induced oxidative stress and allow epithelial cells of the small intestine to retain its absorptive function. Although the implications of these findings to radiation oncology were already alluded to in the first paragraph of the *Discussion*, they also have implications for radiological emergencies or terrorism. The GI injuries that arise in casualties from such radiation exposures can lead to temporary debilitation or death. Although death is catastrophic indeed, the economic and social implications of temporary debilitation can also be enormous. Accordingly, development of medical products capable of ameliorating GI damage caused not only by otherwise lethal radiation exposures, but also by sublethal exposures that may adversely impact important GI functions such as nutrient transport, is necessary. In this way, one can reduce the debilitating effects of sublethal doses of radiation to keep the general population maximally productive under emergency conditions. Specialized agents can be manufactured and stockpiled for use by emergency responders; however, making a fresh supply of such agents immediately available to the potentially large number of victims in the general public is complex. Therefore, identifying radioprotectors that are readily available to the general public, without the need for stockpiling, is desirable. The chemotoxicity of the most effective synthetic radioprotectors often limits their use in humans [51]. Accordingly, Weiss and Landauer [52] have suggested the use of naturally occurring antioxidants and related agents. The present studies provide support for this premise and argue in favor of using a combination of vitamins A, C, and E to protect nutrient transport against radiation-induced intestinal damage caused by accidents or terrorist events. These vitamins are inexpensively manufactured, easily administered, safe for repeated doses, relatively stable, and readily available to the general public. Additional studies are under way to assess the capacity of this cocktail to protect intestinal transport against chronic irradiation and to ameliorate reductions in transport when administered after the advent of an acute or chronic radiation insult. It is recommended that the consequences of intake of high doses of this vitamin cocktail be studied in humans.

#### **Acknowledgments**

We thank Dr. Veronique Douard for help with experiments and for valuable discussion. We also extend our gratitude to all of the staff at the NJMS Comparative Medicine Resources facility, especially Jose Espinal, Sabrina Jung, Ana Henriquez, and Peter Rodriguez. This study was supported, in part, by National Institute of Allergy and Infectious Diseases Grant RC1-AI-078518 (to R.W. Howell). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases or the National Institutes of Health. The laboratory of Dr. Ferraris also receives support from National Science Foundation

Grant IOS-0722365 and National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Grant DK-075617A and that of Dr. Howell from National Cancer Institute Grant RO1-CA-83838.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.689.

#### References

- Potten, C. S.; Merritt, A.; Hickman, J.; Hall, P.; Faranda, A. Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**:71–78; 1994.
- Somosy, Z.; Horvath, G.; Telbisz, A.; Rez, G.; Palfia, Z. Morphological aspects of ionizing radiation response of small intestine. *Micron* **33**:167–178; 2002.
- Miholic, J.; Vogelsang, H.; Schlappack, O.; Kletter, K.; Szepesi, T.; Moeschl, P. Small bowel function after surgery for chronic radiation enteritis. *Digestion* **42**:30–38; 1989.
- Hauer-Jensen, M.; Wang, J.; Boerma, M.; Fu, Q.; Denham, J. W. Radiation damage to the gastrointestinal tract: mechanisms, diagnosis, and management. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care* **1**:23–29; 2007.
- Strup-Perrot, C.; Mathe, D.; Linard, C.; Violot, D.; Milliat, F.; Francois, A.; Bourhis, J.; Vozenin-Brotons, M. C. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**:G875–G885; 2004.
- MacNaughton, W. K. New insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **14**:523–528; 2000.
- Roche, M.; Netti, P. V.; Kemp, F. W.; Agrawal, A.; Attanasio, A.; Douard, V.; Muduli, A.; Azzam, E. I.; Norkus, E.; Brimacombe, M.; Howell, R. W.; Ferraris, R. P. Radiation-induced reductions in transporter mRNA levels parallel reductions in intestinal sugar transport. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**:R173–R182; 2010.
- Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* **142**:231–255; 2004.
- Harapanhalli, R. S.; Narra, V. R.; Yaghai, V.; Azure, M. T.; Goddu, S. M.; Howell, R. W.; Rao, D. V. Vitamins as radioprotectors in vivo. II. Protection by vitamin A and soybean oil against radiation damage caused by internal radionuclides. *Radiat. Res.* **139**:115–122; 1994.
- Sarma, L.; Kesavan, P. C. Protective effects of vitamins C and E against gamma-ray-induced chromosomal damage in mouse. *Int. J. Radiat. Biol.* **63**:759–764; 1993.
- Weiss, J. F.; Landauer, M. R. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology* **189**:1–20; 2003.
- Empey, L. R.; Papp, J. D.; Jewell, L. D.; Fedorak, R. N. Mucosal protective effects of vitamin E and misoprostol during acute radiation-induced enteritis in rats. *Dig. Dis. Sci.* **37**:205–214; 1992.
- Felemovicius, I.; Bonaack, M. E.; Baptista, M. L.; Delaney, J. P. Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol). *Ann. Surg.* **222**:504–508 (discussion 508–510); 1995.
- Blumenthal, R. D.; Lew, W.; Reising, A.; Soyne, D.; Osorio, L.; Ying, Z.; Goldenberg, D. M. Anti-oxidant vitamins reduce normal tissue toxicity induced by radioimmunotherapy. *Int. J. Cancer* **86**:276–280; 2000.
- Kennedy, M.; Brumina, K.; Mutlu, E. A.; Losurdo, J.; Choudhary, S.; Keshavarzian, A. Successful and sustained treatment of chronic radiation proctitis with antioxidant vitamins E and C. *Am. J. Gastroenterol.* **96**:1080–1084; 2001.
- Karasov, W. H.; Diamond, J. M. A simple method for measuring intestinal solute uptake in vitro. *J. Comp. Physiol.* **152**:105–116; 1983.
- Shuttleworth, C. W. Use of NAD(P)H and flavoprotein autofluorescence transients to probe neuron and astrocyte responses to synaptic activation. *Neurochem. Int.* **56**:379–386; 2010.
- Ferraris, R. P.; Cao, Q. X.; Prabhakaram, S. Chronic but not acute energy restriction increases intestinal nutrient transport in mice. *J. Nutr.* **131**:779–786; 2001.
- Zimmerer, T.; Bocker, U.; Wenz, F.; Singer, M. V. Medical prevention and treatment of acute and chronic radiation induced enteritis—is there any proven therapy? A short review. *Z. Gastroenterol.* **46**:441–448; 2008.
- Haydout, V.; Bourquier, C.; Vozenin-Brotons, M. C. Rho/ROCK pathway as a molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity. *Br. J. Radiol.* **80** (Spec. No. 1):S32–S40; 2007.
- Siems, W.; Gartner, C.; Kianz, D.; Schneider, W.; Grune, T.; Schimke, J.; Gau, S.; Wege, U.; Gerber, G. Long term effects of monthly low dose whole body irradiation on the glutathione status and thiobarbituric acid-reactive substances in different organs of male Wistar rats. *Radiobiol. Radiother. (Berlin)* **31**:257–263; 1990.
- Haton, C.; Francois, A.; Vandamme, M.; Wysocki, J.; Griffiths, N. M.; Benderitter, M. Imbalance of the antioxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure. *Radiat. Res.* **167**:445–453; 2007.
- Fan, M.; Ahmed, K. M.; Coleman, M. C.; Spitz, D. R.; Li, J. J. Nuclear factor-kappaB and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells. *Cancer Res.* **67**:3220–3228; 2007.
- Murley, J. S.; Nantajit, D.; Baker, K. L.; Kataoka, Y.; Li, J.; Grdina, D. J. Maintenance of manganese superoxide dismutase (SOD2)-mediated delayed radioprotection induced by repeated administration of the free thiol form of amifostine. *Radiat. Res.* **169**:495–505; 2008.
- Giris, M.; Erbil, Y.; Oztecan, S.; Olgac, V.; Barbaros, U.; Deveci, U.; Kirgiz, B.; Uysal, M.; Tokar, G. A. The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamine on radiation-induced intestinal damage: the effect of heme oxygenase-1 on radiation enteritis. *Am. J. Surg.* **191**:503–509; 2006.
- Mutlu-Turkoglu, U.; Erbil, Y.; Oztecan, S.; Olgac, V.; Tokar, G.; Uysal, M. The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats. *Life Sci.* **66**:1905–1913; 2000.
- Sandhya, T.; Lathika, K. M.; Pandey, B. N.; Bhilwade, H. N.; Chaubey, R. C.; Priyadarsini, K. I.; Mishra, K. P. Protection against radiation oxidative damage in mice by Triphala. *Mutat. Res.* **609**:17–25; 2006.
- Sener, G.; Jahovic, N.; Tosun, O.; Atasoy, B. M.; Yegen, B. C. Melatonin ameliorates ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rats. *Life Sci.* **74**:563–572; 2003.
- Becciolini, A.; Balzi, M.; Potten, C. S. Radiation effects on proliferation and differentiation in the rat small intestine. In: Potten, C.S., Hendry, J.H. (Eds.), *Radiation and Gut*. Elsevier, Amsterdam, pp. 85–143; 1995.
- Potten, C. S. Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiat. Res.* **161**:123–136; 2004.
- Paris, F.; Fuks, Z.; Kang, A.; Capodiceci, P.; Juan, G.; Ehleiter, D.; Haimovitz-Friedman, A.; Cordon-Cardo, C.; Kolesnick, R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* **293**:293–297; 2001.
- Coleman, C. N.; Blakely, W. F.; Fike, J. R.; MacVittie, T. J.; Metting, N. F.; Mitchell, J. B.; Moulder, J. E.; Preston, R. J.; Seed, T. M.; Stone, H. B.; Tofilon, P. J.; Wong, R. S. Molecular and cellular biology of moderate-dose (1–10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: report of a workshop at Bethesda, Maryland, December 17–18, 2001. *Radiat. Res.* **159**:812–834; 2003.
- Becciolini, A.; Cremonini, D.; Fabbrica, D.; Balzi, M. Cell proliferation and differentiation in the small intestine after irradiation with multiple fractions. *Acta Radiol. Oncol.* **25**:51–56; 1986.
- Schuller, B. W.; Rogers, A. B.; Cormier, K. S.; Riley, K. J.; Binns, P. J.; Julius, R.; Hawthorne, M. F.; Coderre, J. A. No significant endothelial apoptosis in the radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **68**:205–210; 2007.
- Kipp, A.; Banning, A.; Brigelius-Flohe, R. Activation of the glutathione peroxidase 2 (Gpx2) promoter by beta-catenin. *Biol. Chem.* **388**:1027–1033; 2007.
- Esworthy, R. S.; Yang, L.; Frankel, P. H.; Chu, F. F. Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *J. Nutr.* **135**:740–745; 2005.
- Esworthy, R. S.; Binder, S. W.; Doroshov, J. H.; Chu, F. F. Microflora trigger colitis in mice deficient in selenium-dependent glutathione peroxidase and induce Gpx2 gene expression. *Biol. Chem.* **384**:597–607; 2003.
- Thomson, A. B.; Keelan, M.; Lam, T.; Cheeseman, C. I.; Walker, K.; Clandinin, M. T. Saturated fatty acid diet prevents radiation-associated decline in intestinal uptake. *Am. J. Physiol.* **256**:G178–G187; 1989.
- Thomson, A. B.; Keelan, M.; Clandinin, M. T.; Tavernini, M.; Lam, T.; Walker, K.; Cheeseman, C. I. Lack of protective effect of oral enprostil, a synthetic prostaglandin E2, on intestinal transport and morphology following abdominal irradiation in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **67**:1351–1356; 1989.
- Dennert, G.; Horneber, M. Selenium for alleviating the side effects of chemotherapy, radiotherapy and surgery in cancer patients. *Cochrane Database Syst. Rev.* **3**:CD005037; 2006.
- Friedenthal, E.; Mendecki, J.; Davis, L.; Seifter, E. The role of vitamin A and analogues in prevention of radiation toxicity during radiotherapy of cancer. In: Jacobs, M.M. (Ed.), *Vitamins and Minerals in the Prevention and Treatment of Cancer*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 275–278; 1991.
- Levenson, S. M.; Gruber, C. A.; Rettura, G.; Gruber, D. K.; Demetriou, A. A.; Seifter, E. Supplemental vitamin A prevents the acute radiation-induced defect in wound healing. *Ann. Surg.* **200**:494–512; 1984.
- Werback, M. R. *Nutritional Influences on Illness*. Keats Publishing, New Canaan, CO; 1987.
- Bendich, A.; Langseth, L. Safety of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**:358–371; 1989.
- Narra, V. R.; Howell, R. W.; Sastry, K. S.; Rao, D. V. Vitamin C as a radioprotector against iodine-131 in vivo. *J. Nucl. Med.* **34**:637–640; 1993.
- Satyamitra, M.; Devi, P. U.; Murase, H.; Kagiya, V. T. In vivo radioprotection by alpha-TMG: preliminary studies. *Mutat. Res.* **479**:53–61; 2001.
- Srinivasan, V.; Jacobs, A. J.; Simpson, S. A.; Weiss, J. F. Radioprotection by vitamin E: effects on hepatic enzymes, delayed type hypersensitivity and postirradiation survival of mice. In: Meyskens, F., Prasad, K.N. (Eds.), *Modulation and Mediation of Cancer by Vitamins*. Karger, Basel, pp. 119–131; 1983.
- Cameron, I. L.; Munoz, J.; Barnes, C. J.; Hardman, W. E. High dietary level of synthetic vitamin E on lipid peroxidation, membrane fatty acid composition and cytotoxicity in breast cancer xenograft and in mouse host tissue. *Cancer Cell Int.* **3**:3; 2003.
- Simone II, C. B.; Simone, N. L.; Simone, V.; Simone, C. B. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 2. *Altern. Ther. Health Med.* **13**:40–47; 2007.
- Simone II, C. B.; Simone, N. L.; Simone, V.; Simone, C. B. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Altern. Ther. Health Med.* **13**:22–28; 2007.
- Weiss, J. F. Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. *Environ. Health Perspect.* **105** (Suppl. 6):1473–1478; 1997.
- Weiss, J. F.; Landauer, M. R. Radioprotection by antioxidants. *Ann. NY Acad. Sci.* **899**:44–60; 2000.





Article

# Recombinant Zika NS1 Protein Secreted from Vero Cells Is Efficient for Inducing Production of Immune Serum Directed against NS1 Dimer

Wildriss Viranaicken <sup>1</sup>, Alexia Ndebo <sup>1,2</sup>, Sandra Bos <sup>1</sup> , Philippe Souque <sup>3</sup>, Gilles Gadea <sup>1</sup>, Chaker El-Kalamouni <sup>1</sup>, Pascale Krejbich-Trotot <sup>1</sup>, Pierre Charneau <sup>3</sup>, Philippe Desprès <sup>1,\*</sup> and Marjolaine Roche <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, Platform CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97491 Sainte-Clotilde, La Réunion, France; wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr (W.V.); Alexia.Ndebo@etu.unige.ch (A.N.); sandrabos.lab@gmail.com (S.B.); gilles.gadea@inserm.fr (G.G.); Chaker.El-Kalamouni@univ-reunion.fr (C.E.-K.); pascale.krebich@univ-reunion.fr (P.K.-T.)
- <sup>2</sup> Section des Sciences Pharmaceutiques, Université de Genève, rue Michel-Servet 1, 1211 Genève, Switzerland
- <sup>3</sup> Virologie Moléculaire et Vaccinologie, Institut Pasteur, 28 Rue du Dr Roux, 75724 Paris CEDEX 15, France; philippe.souque@pasteur.fr (P.S.); pierre.charneau@pasteur.fr (P.C.)
- \* Correspondence: philippe.despres@univ-reunion.fr (P.D.); marjolaine.roche@univ-reunion.fr (M.R.)

Received: 2 November 2017; Accepted: 21 December 2017; Published: 23 December 2017

**Abstract:** Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne flavivirus that recently emerged in the South Pacific, Americas, and Caribbean islands, where the larger epidemics were documented. ZIKV infection in humans is responsible for neurological disorders and microcephaly. Flavivirus NS1 is a non-structural glycoprotein that is expressed on the cell surface and secreted as a hexameric lipoprotein particle. Intracellular NS1 exists as a dimer that is required for viral replication, whereas the secreted NS1 hexamer interacts with host factors, leading to pathophysiological conditions. In an effort to dispose of specific anti-ZIKV NS1 immune serum, Vero cells were transduced with a lentiviral vector containing the NS1 gene from an epidemic strain of ZIKV. We showed that stably transduced Vero/ZIKV NS1 cell clone was efficient in the secretion of recombinant NS1 oligomer. Immunization of adult rat with purified extracellular NS1 developed anti-ZIKV antibodies that specifically react with the NS1 dimer produced in human cells infected with African and Asian strains of ZIKV. The rat antibody against ZIKV NS1 dimer is a reliable biological tool that enables the immunological detection of secreted NS1 from host-cells infected with ZIKV.

**Keywords:** emerging disease; arbovirus; Zika virus; NS1 protein; lentiviral vector; recombinant antigen; humoral immunity; NS1 antiserum

## 1. Introduction

Emerging mosquito-transmitted Zika virus (ZIKV) belongs to the *Flavivirus* genus of *Flaviviridae* family, and is related to other medically important flaviviruses, such as dengue (DENV), Japanese encephalitis (JEV), West Nile (WNV), and yellow fever (YFV) [1]. ZIKV was originally isolated in Uganda in 1947, and presumably expanded from Africa to Asia in the 1960s [2,3]. To date, African and Asian lineages are the two major lineages of ZIKV [4]. Before 2007, few cases of ZIKV infection were detected sporadically. The first ZIKV outbreaks occurred in Western Pacific Micronesia in 2007, and a large epidemic was recorded in French Polynesia in 2013 [5,6]. The increased pathogenicity of the Asian lineage of ZIKV might have contributed to the recent epidemics. ZIKV was introduced in Brazil in 2015, and it has rapidly spread in the Americas and Caribbean islands [7,8]. In humans, ZIKV infection was implicated in causing severe clinical consequences, including congenital

malformations and neurological abnormalities [9,10]. Sexual transmission of ZIKV has been also documented [11]. The World Health Organization (WHO) declared Zika fever a serious public health emergency in 2016.

Flaviviruses, such as ZIKV, contain a positive single-stranded RNA genome encoding a large polyprotein that is processed co- and post-translationally into three structural proteins (C, prM/M, and E) and seven non-structural proteins, NS1 to NS5 [12,13]. Glycoprotein NS1 (352 amino acids) is synthesized as a protomer, which contains six intramolecular disulfide linkages that contribute to the stabilization of the polypeptide. Alignment of different flaviviral NS1 proteins identified conserved regions [14]. As shown in Figure S1, the NS1 proteins from clinical isolate PF13/2015-18 of ZIKV and live-attenuated 17D-204 strain of YFV share at least 82% of similarity in amino acids. Once processed from the viral polyprotein into the lumen of the endoplasmic reticulum, the *N*-glycosylated NS1 protein forms a homo-dimer which acquires the capacity to associate to lipids [15]. Most of the newly synthesized NS1 dimers remain associated to viral replication complexes. However, a fraction of NS1 dimer is driven towards the plasma membrane, and another one is secreted as a hexameric lipoprotein particle. It has been recently proposed that the NS1 dimer could act as a structural intermediate that is formed during the process of NS1 hexamer formation [16]. The quaternary organization of the NS1 hexamer and the associated lipids has been recently resolved for different flaviviruses, including ZIKV [15–17]. The extracellular NS1 hexamer has been shown to play an important role in the pathogenesis of flavivirus-associated diseases [18–20]. On the other hand, the secreted NS1 is highly immunogenic during flavivirus infection, and it can also be used as a diagnostic biomarker of disease [21].

Both NS1-based vaccines and NS1-targeting antibody that inhibit NS1 activity are promising antiviral strategies to prevent flavivirus disease progression [22–26]. Remarkably, it has been recently demonstrated that induction of a peripheral immunity against NS1 can protect mice against a lethal challenge with ZIKV [27]. Following the observation that an NS1-based vaccine is able to mediate protection against ZIKV infection, it will therefore be a high priority to generate NS1-targeting antibodies for investigating the role of NS1 in disease development. Knowing the oligomeric nature of NS1, it is essential to dispose NS1 antibodies targeting the secreted form with aim of elucidating the role of hexameric lipoprotein particles in the ZIKV-mediated cell dysfunction. Such NS1-targeting antibodies will help to establish the NS1 function in the context of ZIKV infection, and also in the search for NS1 targeting inhibitors.

Recombinant flavivirus NS1 antigens have been used as biological tools for the immunocapture of anti-NS1 antibody [28]. Anti-NS1 monoclonal antibodies were generated, allowing the detection of soluble NS1 in the bloodstream of dengue patients during the acute phase of disease [29]. In an effort to produce specific anti-ZIKV NS1 immune serum, we reported that immunization of adult rat with a crude *Escherichia coli* extract which overexpressed the N-terminal region of recombinant NS1 (rNS1<sup>1–151</sup>) elicited the production of NS1 antiserum that reacts preferentially with the NS1 monomer [30]. In the present study, we used a lentiviral TRIP vector for expression of a recombinant full-length NS1 protein from ZIKV strain isolated in Brazil in 2015. Non-human primate Vero cells were stably transduced with a lentiviral vector containing the NS1 gene. We showed that immunization with the secreted recombinant NS1 dimer elicits the production of antibody against NS1 dimer.

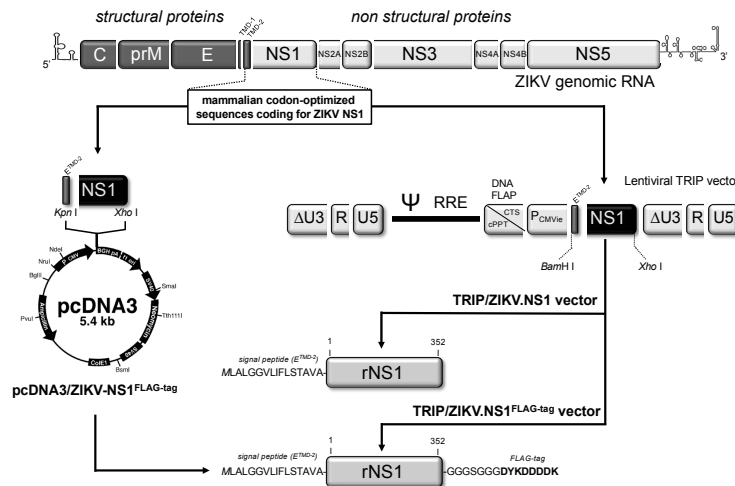
## 2. Results and Discussion

### 2.1. Stable HEK293 and Vero Cell Lines Expressing Recombinant NS1 Protein from Zika Virus (ZIKV)

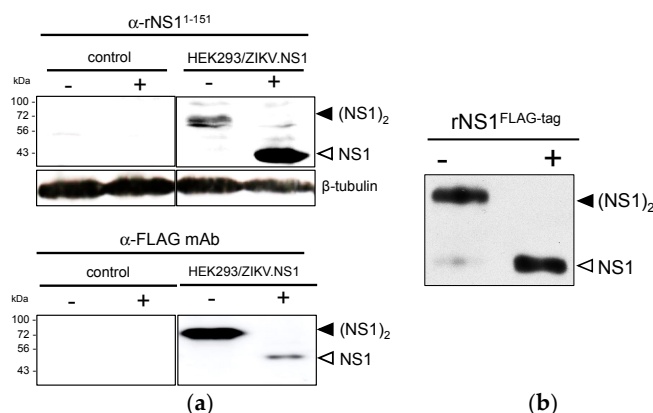
#### 2.1.1. Expression of Recombinant ZIKV NS1 Protein Using a Mammalian-Optimized Codon NS1 Gene

In order to produce a recombinant NS1 from a contemporary epidemic strain of ZIKV, modifications that optimize the expression of a viral gene in mammalian cells were done on the original NS1 sequence of epidemic ZIKV strain BeH819015 isolated in Brazil in 2015 (Figure S2). Given that plasmid vector pcDNA3 was successfully used for the expression of DENV NS1 in human cells [31], we decided to validate the expression of the mammalian codon-optimized ZIKV NS1

gene using pcDNA3.1(+)-Neo (Figure 1). The NS1 sequence was inserted into pcDNA3.1(+)-Neo to generate recombinant plasmid pcDNA3/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup>. In this construct, ZIKV NS1 was preceded by the second transmembrane domain of E acting as NS1 signal peptide, and ended with a FLAG-tag (Figure S2). HEK-293 cells were transfected with pcDNA3/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup>, selected on growth medium supplemented with geneticin to establish a stable HEK293/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup> cell line. Immunoblot assays using anti-ZIKV rNS1<sup>1-151</sup> or anti-FLAG mAb were performed on RIPA lysates of HEK293/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup> cells (Figure 2a). It has been widely reported that flavivirus NS1 glycoprotein (app. MW 48 kDa) is converted to a heat-labile dimeric form (app. MW 72 kDa) inside the infected cells [31]. Because the NS1 dimers are sensitive to heat denaturation, cell lysates were analyzed in SDS-PAGE before and after heat denaturation of the samples. The presence of heat-labile NS1 dimer was clearly detected in HEK293/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup> cells regardless the antiserum tested. Thus, transfection of HEK293 cells with pcDNA3 containing the mammalian optimized-codon of ZIKV NS1 gene leads to efficient production of rNS1<sup>FLAG-tag</sup>. Secreted soluble rNS1<sup>FLAG-tag</sup> was purified from the extracellular medium of HEK293/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup> cells by anti-FLAG antibody-based affinity chromatography. Immunoblot assay using anti-FLAG antibody confirmed that purified ZIKV rNS1 essentially exists as a dimer (Figure 2b). These results showed that mammalian codon-optimized NS1 gene from ZIKV strain BeH819015 is suitable for the production of secreted rNS1 dimer in mammalian cells.



**Figure 1.** Cloning strategy of pcDNA3/ZIKV-NS1 and TRIP/ZIKV-NS1. In top, the schematic representation of Zika virus (ZIKV) genomic RNA with the E gene including the two transmembrane domains TMD-1 and TMD-2 at its C-terminus followed by the NS1 gene. In right, the mammalian codon-optimized sequence encoding TMD-2 from E followed by NS1 was cloned into the plasmid vector pcDNA3(+) under the control of human cytomegalovirus promoter ( $P_{CMV}$ ). The resulting plasmid pcDNA3/ZIKV-NS1 includes the signal peptide of NS1 (ETMD-2) and the entire NS1 gene of epidemic ZIKV strain BeH81905, followed by a glycine-serine spacer and a FLAG-tag at the C-terminus of NS1. In left, the mammalian codon-optimized sequences encoding TMD-2 from E followed by NS1 were cloned into the lentiviral TRIP vector under the control of immediate early CMV promoter ( $P_{CMVie}$ ). Recombinant TRIP/ZIKV-NS1 vector and TRIP/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup> vector include the same ZIKV sequence that pcDNA3/ZIKV-NS1 except TRIP/ZIKV-NS1 vector that has been deleted of the spacer and FLAG-tag at the C-terminus of NS1. In bottom, the design of recombinant ZIKV NS1 (rNS1) protein with its signal peptide ETMD-2 and followed or not by a spacer and a FLAG-tag is represented. The recombinant NS1 sequences are described in Figure S2.

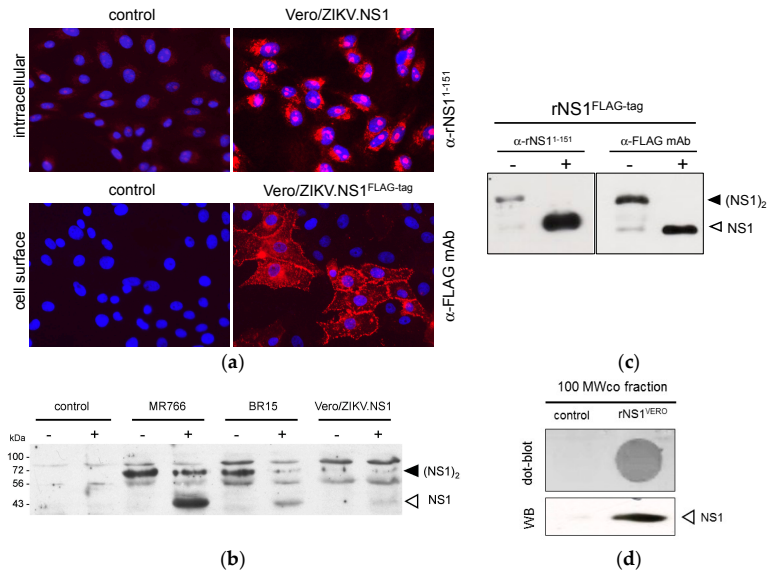


**Figure 2.** Expression of recombinant ZIKV NS1 protein in HEK-293 cells stably transfected with a plasmid vector. **(a)** Immunoblot analysis of rNS1 expression in RIPA lysates from HEK293/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> (HEK293/ZIKV.NS1) and mock-transfected HEK293 (control) cells. Samples were heat-denatured (+) or not (−) before immunoblotting with rat anti-NS1 serum ( $\alpha$ -rNS1<sup>1-151</sup>) or mouse anti-FLAG mAb ( $\alpha$ -FLAG mAb). Detection of  $\beta$ -tubulin served as protein loading control; **(b)** Samples of purified rNS1<sup>FLAG-tag</sup> were heat-denatured (+) or not (−) and then analyzed by immunoblotting with anti-FLAG mAb. The bands corresponding to NS1 dimer (black arrow head) and NS1 monomer (open arrow head) are indicated to the right of the blot.

#### 2.1.2. Secretion of ZIKV Rns1 from Vero Cells Stably Transduced by a Lentiviral Vector

Lentiviral vectors represent an attractive platform allowing NS1 protein production in mammalian cells [32–34]. The mammalian codon-optimized ZIKV NS1 gene was inserted in lentiviral vector TRIP, to generate recombinant lentiviral vectors expressing NS1 with or without FLAG-tag (Figure 1). The attempts to establish stably transduced HEK293 cell lines expressing recombinant NS1 of ZIKV were unsuccessful. Consequently, we decided to transduce Vero cells to generate stable Vero/ZIKV.NS1 and Vero/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> cell lines. By immunofluorescence analysis, both Vero/ZIKV.NS1 and Vero/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> cells were positively stained with anti-rNS1<sup>1-151</sup> immune serum and anti-FLAG mAb, respectively (Figure 3a). ZIKV rNS1 is expressed on the plasma membrane of transduced Vero cells consistent with a cell membrane interaction of NS1 dimer, as has been reported with authentic NS1 [18]. Immunoblot assays were performed on RIPA cell lysates of Vero/ZIKV.NS1 cells (Figure 3b). As positive controls, Vero cells were infected with ZIKV molecular clones derived from African strain MR766 isolated in Uganda in 1947, and Asian strain BeH819015 isolated in Brazil in 2015 (hereafter designed BR15). Anti-rNS1<sup>1-151</sup> immune serum confirmed the expression of rNS1 in Vero/ZIKV.NS1 cells (Figure 3b).

We assessed whether the secretion of soluble rNS1 was efficient in Vero/ZIKV.NS1 cell lines. FLAG-tagged rNS1 protein was purified from supernatant of Vero/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> cells by immunoaffinity chromatography, as described above. Immunoblot assay using anti-FLAG mAb showed that purified extracellular rNS1 essentially exists as a stable dimer (Figure 3c). We assessed whether the secreted rNS1 without FLAG-tag can be concentrated from the supernatants of Vero/ZIKV.NS1 cells. Extracellular medium of mock-infected Vero cells was used as a negative control. Total proteins into the supernatants of Vero/ZIKV.NS1 cell cultures were concentrated by ultrafiltration using a crossflow cassette with a cut-off of 100 kDa. As shown in Figure 3d, the remaining solution, designed hereafter as 100 MWco fraction, was positive for rNS1. Taken together, these results confirmed that transduction of Vero cells with TRIP/ZIKV.NS1 vector leads to efficient secretion of recombinant NS1, and the 100 MWco fraction is suitable for the further experiments.

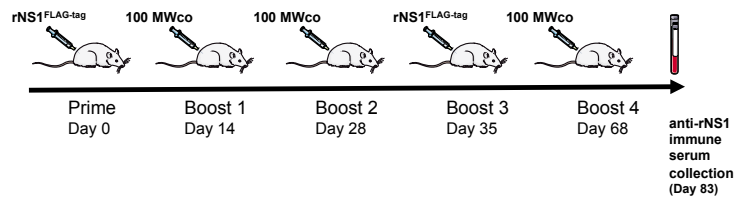


**Figure 3.** Expression of recombinant ZIKV NS1 protein in Vero cells transduced with a lentiviral vector. (a) IF analysis was performed on stably transduced Vero cells expressing rNS1. Fixed Vero/ZIKV.NS1 cells were permeabilized with non-ionic detergent and incubated with rat anti-NS1 immune serum ( $\alpha$ -NS1<sup>1-151</sup>). Fixed Vero/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> cells were directly stained with mouse anti-FLAG monoclonal antibody ( $\alpha$ -FLAG mAb). Nuclei were visualized with DAPI. Mock-transduced Vero cells (control) served as a negative control; magnification:  $\times 400$ ; (b) Immunoblot analysis of rNS1 in RIPA lysates from Vero/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> cells, mock-transduced Vero cells (control) and Vero cells infected 48 h with ZIKV strains MR766 or BR15. Samples were heat-denatured (+) or not (-). Authentic and recombinant NS1 were detected using rat anti-rNS1<sup>1-151</sup> immune serum. Detection of  $\beta$ -tubulin served as protein loading control; (c) Samples of purified FLAG-tagged ZIKV rNS1 (NS1<sup>FLAG-tag</sup>) were heat-denatured (+) or not (-) and then analyzed by immunoblotting with rat anti-NS1 immune serum ( $\alpha$ -NS1<sup>1-151</sup>) or mouse anti-FLAG monoclonal antibody ( $\alpha$ -FLAG mAb) as described above. The bands corresponding to NS1 dimer (black arrow head) and NS1 monomer (open arrow head) are indicated to the right of the blot; (d) 100 MWco fraction samples from supernatants of Vero/ZIKV.NS1 cells (rNS1<sup>VERO</sup>) and Vero cells (control) were analyzed by dot-blotting (dot-blot) or Western blotting (WB) with anti-rNS1<sup>1-150</sup> immune serum.

## 2.2. Immunization of Rat and Anti-ZIKV NS1 Immune Serum Reactivity

### 2.2.1. Immunization of Adult Rat with ZIKV rNS1

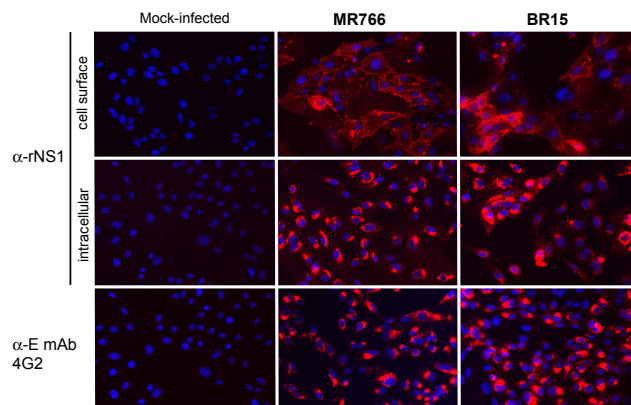
The secreted rNS1 from Vero/ZIKV.NS1 cells was used as recombinant viral antigen for immunization of adult female Wistar rat. The sequence of rat immunization is depicted in Figure 4. Induction of an antibody-based immune response against ZIKV NS1 was essentially based on a series of injections of semi-purified secreted NS1 protein (100 MWco fraction) from Vero/ZIKV.NS1 cells. In order to initiate humoral immunity towards extracellular NS1 oligomers, animals were subcutaneously primed with 5  $\mu$ g of purified rNS1<sup>FLAG-tag</sup>. To drive the anti-NS1 humoral immune response towards the hexameric lipoprotein particles, immunized rats were boosted with 50  $\mu$ g of extracellular proteins in a 100 MWco fraction. An antigenic boost with 5  $\mu$ g of purified rNS1<sup>FLAG-tag</sup> was performed at Day 35 to specifically enhance the production of antibody against ZIKV NS1 dimer prior the last inoculation of 100 MWco fraction at Day 68. The rat immune serum was collected at Day 83, and further analyzed for the reactivity of anti-NS1 immune serum.



**Figure 4.** Sequence of rat immunization with recombinant ZIKV NS1 protein. Adult female Wistar rat was subcutaneously immunized with purified rNS1<sup>FLAG-tag</sup>. After the prime, animal was boosted with rNS1 into the 100 MWco fraction of Vero/ZIKV.NS1 cell supernatants. A second inoculation of purified rNS1<sup>FLAG-tag</sup> was performed at Day 35. Whole blood was collected 83 days after the prime.

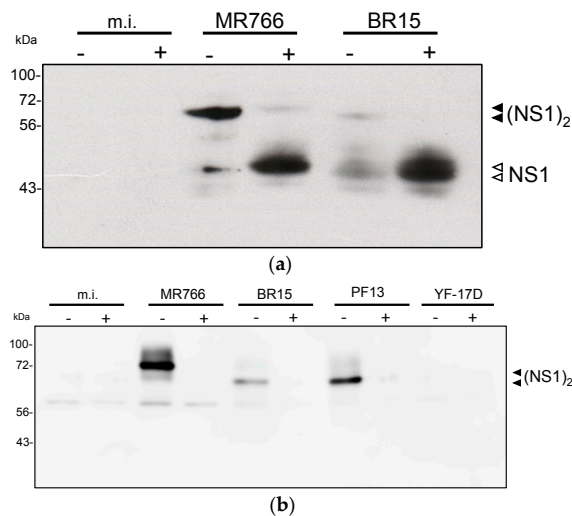
### 2.2.2. Reactivity of Anti-ZIKV rNS1 Antibodies against Authentic NS1 Protein

We assessed whether the rat immune serum reacted with NS1 produced in host cells infected with ZIKV. Immunofluorescence assays were performed on Vero cells infected for 48 h with MR766 and BR15 (Figure 5). Anti-*pan* flavivirus E mAb 4G2 was used as a positive control for ZIKV infection [35]. We showed that rat immune serum collected at Day 83 strongly reacted with intracellular and plasma membrane-associated NS1, regardless the viral strains tested. Thus, hyperimmunization of rat with rNS1 elicited the production of anti-NS1 immune serum that reacts with African and Asian strains of ZIKV.



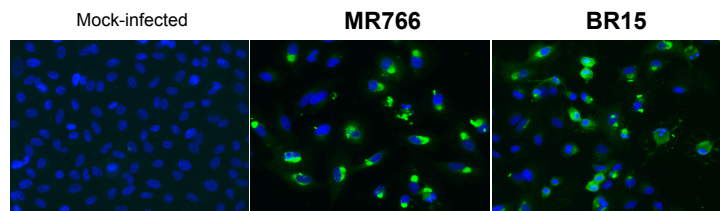
**Figure 5.** Reactivity of rat anti-rNS1 immune serum against NS1 synthesized in Vero cells infected by different strains of ZIKV. Vero cells were infected with MR766 and BR15 or mock-infected. Cells were fixed with PFA and permeabilized (intracellular) or not permeabilized (cell surface) with non-ionic detergent, and incubated with rat anti-rNS1 immune serum at dilution 1:2000. The anti-E mAb 4G2 served as a control of ZIKV infection. Nuclei were stained with DAPI. Magnification:  $\times 400$ . The reactivity of rat anti-rNS1 immune serum was evaluated by immunoblotting on RIPA lysates of Vero cells infected with historical strain MR766, or epidemic strains BR15 and PF-25013-18 of ZIKV (Figure 6). The NS1 proteins from BR15 and PF-25013-18 share 100% of amino acid identity. Infection with YFV 17D strain was performed to evaluate the specificity of anti-NS1 antibody. ZIKV growth in Vero cells was confirmed by immunoblot assay using anti-E mAb 4G2 (Figure S3). Immunoblot assay using anti-rNS1<sup>1-151</sup> immune serum detected both NS1 monomer and dimer in ZIKV-infected Vero cells (Figure 6a). We noted that reactivity of BR15 NS1 dimer with anti-rNS1<sup>1-151</sup> immune serum was weaker when compared to historical strain MR766. Rat anti-rNS1 immune serum reacted with authentic NS1 synthesized in Vero cells infected with ZIKV but not YFV (Figure 6b). An infectious YFV titer of 4.3 log PFU.mL<sup>-1</sup> was found at 24 h post-infection, confirming the productive infection of Vero cells by YF-17D.

Remarkably, only authentic NS1 dimer was detected with the rat anti-rNS1 immune serum, suggesting that majority of antibodies bind to NS1 epitopes which are exposed at the surface of NS1 oligomer (Figure 6b). We observed that both anti-rNS1<sup>1-151</sup> and anti-rNS1 antisera reacted with a BR15 or PF-13-18 NS1 dimer that migrated faster than that of MR766 (Figure 6). A faster migration of BR15 and PF-13-18 NS1 monomers was also observed by immunoblot assay using anti-rNS1<sup>1-151</sup> immune serum (Figure 6a). There are nine amino acid substitutions at positions I21V, E52D, K69R, E146K, R191K, A194V, V236I, V264M, and Y286H between NS1 proteins from MR766 and BR15 (or PF-13-18). Whether these amino acid changes could contribute to the faster electrophoretic mobility of NS1 proteins from epidemic ZIKV strains of Asian lineage is an important issue that remains to be investigated. Altogether, these results showed that immunization with secreted rNS1 preferentially resulted in the production of immune serum essentially directed against ZIKV NS1 dimer and presumably, the NS1 hexamer. Importantly, the rat anti-rNS1 immune serum comparably recognized the NS1 dimer produced by ancestral and contemporary epidemic strains of ZIKV.

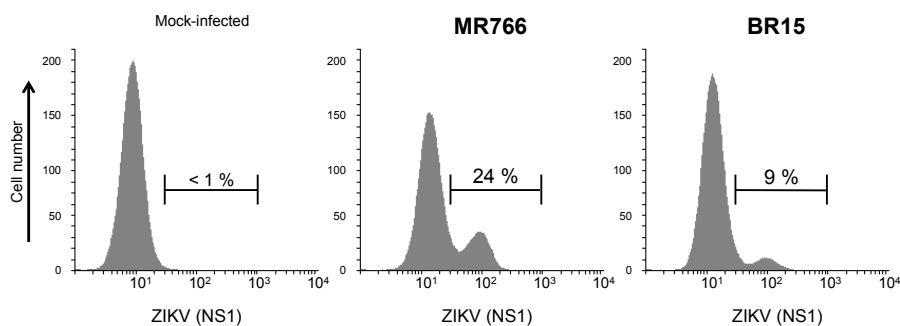


**Figure 6.** Reactivity of rat anti-rNS1 immune serum against ZIKV NS1 protein. RIPA lysates obtained from Vero cells infected with ZIKV strains MR766, BR15, and PF-25013-18 (PF13) or live-attenuated YFV 17D vaccine (YF-17D) or mock-infected (m.i.) were incubated with anti-NS1<sup>1-151</sup> (a) or anti-rNS1; (b) immune serum (dilution 1:500 and 1:1000 respectively) by immunoblot assay. The samples were heat denatured (+) or not (–) before immunoblot analysis. To the right of the blot, the open head arrow indicates the position of the NS1 monomer, and the black head arrow indicates the position of the NS1 dimer. The molecular weight (MW) of protein size markers is indicated to the left of the blot.

We assessed whether the rat anti-rNS1 immune serum recognizes intracellular NS1 produced in human lung epithelial A549 cells infected with ZIKV [28,29]. By IF analysis, rat immune serum against NS1 oligomer recognized intracellular NS1 in A549 cells infected with African historical strain MR766 or Asian epidemic strain BR15 of ZIKV (Figure 7). The immune detection of authentic NS1 protein was confirmed by flow cytometry analysis (Figure 8). These results showed that rat anti-rNS1 immune serum is suitable for the immune detection of NS1 synthesized in human cells infected with ZIKV strains of different lineages.



**Figure 7.** Reactivity of anti-rNS1 immune serum against ZIKV NS1 synthesized in human cells. A549 cells were infected 48 h with ZIKV strains MR766 and BR15 or mock-infected and analyzed by IF assay. Fixed cells were permeabilized with non-ionic detergent and then incubated with rat anti-rNS1 immune serum at dilution 1:2000. Magnification:  $\times 400$ .



**Figure 8.** Reactivity of rat anti-rNS1 immune serum against NS1 produced in human epithelial cells infected by ZIKV. A549 cells were infected for 24 h with ZIKV strains MR766 and BR15 or mock-infected (no virus). Fixed cells were permeabilized and incubated with rat anti-rNS1 immune serum at dilution 1:1000 as primary antibody. The percentages of ZIKV-infected A549 cells positively stained with anti-rNS1 immune serum were determined by flow cytometry analysis, and the values are indicated on the top.

### 2.3. Concluding Remarks

In the last five years, mosquito-borne ZIKV has become a serious public health concern worldwide. There is an urgent need to dispose of specific and sensitive biological tools for ZIKV detection. Secreted NS1 produced in human host cells infected with ZIKV is a potential biological marker for viral infection. Authentic and recombinant NS1 proteins have been used as viral antigens for the capture of specific antibodies directed against medically important flaviviruses [21,28,29]. It has been also reported that NS1-based vaccines induce partial protective immunity against flavivirus infection [14]. Recently, we demonstrated that rat immunization with the first 151 amino acids of ZIKV NS1 expressed in bacteria resulted in the production of anti-NS1 antibodies that preferentially recognize the NS1 monomer [30]. To better understanding the role of the NS1 protein in the pathophysiology of ZIKV infection, it is necessary to dispose of specific anti-NS1 antibodies that are able to recognize both cell membrane-associated NS1 dimer and secreted NS1 hexamer. Consequently, we decided to produce a recombinant full-length NS1 protein from a contemporary epidemic strain of ZIKV using the non-replicative lentiviral TRIP vector that is particularly effective for the expression of secreted flaviviral antigens [32–34]. We first evaluated the ability of a mammalian-codon optimized NS1 sequence to produce an immunogenic NS1 in HEK293 cells stably transfected with a vector plasmid expressing ZIKV NS1. Immunoblot assays confirmed the expression of recombinant NS1 dimer that is released into the extracellular space, presumably as a hexamer. The ZIKV NS1 gene



was therefore inserted into the lentivirus TRIP vector, and Vero cells were transduced with the recombinant lentiviral vector expressing ZIKV NS1. We showed that recombinant NS1 exists as both cell surface-associated and secreted proteins in stably transduced Vero cells. Immunization of adult rat with secreted recombinant NS1 elicited production of anti-ZIKV NS1 immune serum. Reactivity of rat anti-NS1 immune serum was documented by immunofluorescence and immunoblot assays. The NS1 antiserum specifically recognizes the NS1 dimer synthesized in host cells infected with historical African and epidemic Asian strains of ZIKV. No cross-antigenic reactivity of anti-ZIKA NS1 immune serum was observed with the NS1 synthesized by the live 17D vaccine of YFV. In conclusion, we demonstrated that recombinant ZIKV NS1 expressed in mammalian cells stably transduced with a lentiviral vector is suitable for inducing the production of specific antibody directed against NS1 oligomer. Anti-ZIKV immune serum could be a great tool for the specific detection of secreted NS1 hexamer in human cells infected with ZIKV of African and Asia lineages, including contemporary epidemic strains.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Cell Lines and Viruses

Monkey kidney normal Vero cells (ATCC, CCL-81), human embryonic kidney HEK-293 cells (ATCC, CRL-1573), and human carcinoma epithelial lung A549 cells (ATCC, CCL-185) were cultured at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in MEM Eagle medium supplemented with 5% to 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Dutscher, Brumath, France) and penicillin/streptomycin/fungizone (PAN Biotech Dutscher, Brumath, France). The clinical isolate PF-25013-18 of ZIKV has been previously described [36]. ZIKV molecular clones MR766 and BR15 were generated from African historical strain MR766-NIID (GenBank access: LC002520) isolated in Uganda in 1947 and Asian epidemic strain BeH819015 isolated in Brazil in 2015 (GenBank access: KU365778) [35]. Live-attenuated vaccine strain 17D of yellow fever virus (YF-17D STAMARIL, Sanofi-Pasteur, Lyon, France) was twice propagated in Vero cells. Virus stocks were grown on Vero cells, and their infectivity was determined by plaque-forming assays [36]. Cells were routinely infected with ZIKV strains or YF-17D virus at the multiplicity of infection of 1 plaque forming unit per cell.

#### 3.2. Stable Transfection of HEK293 Cells with Vector Plasmid Expressing NS1

The mammalian codon-optimized sequence coding for the NS1 signal peptide, followed by the amino acids 1 to 352 of NS1 protein from ZIKV strain BeH819015, was synthesized by Genecust (Luxembourg) (Figure S2). The synthetic NS1 gene was cloned into *Kpn* I and *Xho* I restriction sites of the pcDNA3.1(+) Neo plasmid (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) to generate pcDNA3/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup> (Figure 1). In this construct, a glycine-serine spacer and a FLAG-tag sequence followed the NS1 sequence. HEK293 cells were transfected with pcDNA3/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup> using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific). Stable HEK293/ZIKV-NS1<sup>FLAG-tag</sup> cell line was selected with 800 µg·mL<sup>-1</sup> of geneticin G418.

#### 3.3. Stable Transduction of Vero Cells with Lentiviral Vectors Expressing NS1

The mammalian codon-optimized sequences coding ZIKV NS1 protein, with or without FLAG-tag, were cloned into the BamHI and XhoI restriction sites of the pTRIPΔU3CMV plasmid to generate pTRIPΔU3CMV/ZIKV.NS1 and pTRIPΔU3CMV/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> (Figure 1). Lentiviral particles were produced by transient calcium co-transfection of Vero cells, as previously described [24]. The recombinant lentiviral vectors were pseudotyped with VSV-G envelope protein of serotype Indiana. In the resulting lentiviral vectors, TRIP/ZIKV.NS1 and TRIP/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup>, the early promoter immediately ( $P_{CMVie}$ ) drive the constitutive expression of recombinant NS1 of ZIKV (Figure 1). Stable Vero/ZIKV.NS1 and Vero/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> cell cultures were obtained by transduction of Vero cells with TRIP/ZIKV.NS1 or TRIP/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup>, respectively.

### 3.4. Production and Purification of Recombinant NS1

To semi-purify secreted rNS1, Vero/ZIKV.NS1, cell monolayers were cultured for 4 days with synthetic Panserin 401 medium (PAN Biotech) that has been developed for serum-free cell cultivation. Non-denaturing concentration of rNS1 dimer in cell supernatant was realized using a two-step concentration and diafiltration method. The culture medium (500 mL) was passed through a Vivaflow 200 system with a cut-off of 100 kDa (Sartorius) and the remaining solution was then reduced to a final volume of 10 mL on a Vivacell cassette with a cut-off of 50 kDa (Sartorius). The 100 MWco fraction contained a 50-fold concentration of the constituent proteins with a molecular weight greater than 100 kDa from the original culture medium. The samples were verified for the presence of rNS1 by immunoblot assay, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  after a flash frozen in liquid nitrogen. Protein quantification in the 100 MWco fraction was performed using BCA assay (Sigma-Aldrich).

To purify secreted FLAG-tagged rNS1, supernatants of HEK293/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> and Vero/ZIKV.NS1<sup>FLAG-tag</sup> cell monolayers cultured 4 days with synthetic Panserin 401 medium were clarified by centrifugation for 10 min at 1200g and subjected to diafiltration as above. The remaining solutions contained a 10-fold concentration of the constituent proteins from the original culture medium. The solutions were loaded on an anti-FLAG M2 affinity agarose gel column (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Bound FLAG-tagged proteins were eluted from affinity column with  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  FLAG peptide in PBS (Sigma-Aldrich). The elution samples were dialyzed against PBS to remove the unbound FLAG peptide, and analyzed using 8% SDS-PAGE and further processed using PlusOne Silver staining kit (GE Healthcare, Buc, France). The samples containing the purified rNS1<sup>FLAG-tag</sup> were quantified and stored as above.

### 3.5. Rat Experiments and Ethical Statement

Experiments were conducted following the guidelines of Office Laboratory of Animal Care at the CYROI platform. Rats were housed individually in separate cages at the CYROI platforms' animal facility. The CETEA at the CYROI has ethically validated the protocols and subsequent experiments in the document n°A974001, which has been then approved by the French authorities (03197.02, 18 July 2016).

Adult Wistar rats were serially subcutaneously inoculated with rNS1 in PBS mixed with Complete Freund's Adjuvant (prime immunization) or Incomplete Freund's Adjuvant (the antigenic boosts) in a final volume of 0.2 mL. Three months after the prime, whole blood was collected by cardiac puncture after rats were anesthetized.

### 3.6. Immunoblotting

For Western blot assays, samples were processed by 10% SDS-PAGE, and transferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking of the membrane for 1 h with 90% FBS in PBS-Tween, the blot was incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with appropriate dilution of the primary antibody in the same buffer. Rat immune sera directed against rNS1<sup>1-151</sup> and rNS1 were used at dilutions 1:500 and 1:1000, respectively. Mouse mAb anti-FLAG tag (Sigma Aldrich) was used at dilution 1:1000. Anti-mouse and anti-rat IgG HRP-conjugated secondary antibodies were used at 1:2000 dilution (Vectors Labs, Premanon, France). The membranes were developed with Pierce ECL Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific) and exposed on an Amersham imager 600 (GE Healthcare). For dot blot assays, the sample was directly loaded on a nitrocellulose membrane and then probed with antibodies as described above.

### 3.7. Immunofluorescence and Flow Cytometry Assays

For IF analysis, cell monolayers grown on glass coverslips were incubated 20 min with paraformaldehyde (PFA) at the final concentration of 3.2% in PBS. When required, permeabilization of fixed cells was performed for 4 min with nonionic detergent Triton X-100 at the final concentration of

0.1% in PBS. Cells were incubated for 30 min with primary antibody at the appropriate dilution in PBS containing 1% bovine serum albumin (PBS-BSA). Rat immune sera directed against rNS1<sup>1-151</sup> and rNS1 were used at dilutions 1:200 and 1:500, respectively. Mouse mAb anti-FLAG-tag was used at dilution 1:500. Mouse anti-*pan* flavivirus E protein 4G2 mAb was used at dilution 1:1000. Goat anti-mouse Alexa Fluor 594 IgG, donkey anti-rat Alexa Fluor 594 IgG and goat anti-rat Alexa Fluor 488 IgG were used as secondary antibodies at the dilution (1:2000). Nuclei were stained with DAPI. Vectashield reagent (Vector Labs, Premanon, France) was used for the mounting of the glass coverslips. A Nikon Eclipse E2000-U microscope was used for the visualization of the fluorescence. The capture of the fluorescent signal was allowed with a Hamamatsu ORCA-ER camera coupled to the imaging software NIS-Element AR (Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

For flow cytometry analysis, cells were fixed with 3.7% PFA in PBS, permeabilized with ethanol and then blocked with PBS-BSA. Cells were incubated 20 min with rat anti-rNS1 immune serum diluted 1:1000 in PBS-BSA as primary antibody. Goat anti-rat Alexa Fluor 488 IgG at dilution 1:1000 was used as secondary antibody. Expression of ZIKV NS1 protein was analyzed by flow cytometric analysis using FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France).

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at [www.mdpi.com/1422-0067/19/1/38/s1](http://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/38/s1).

**Acknowledgments:** We gratefully acknowledge Patrick Mavingui and all the members of PIMIT for helpful discussions. We thank Céline Frechina for assistance in concentration of proteins in cell culture supernatant and Eva Ogire for technical assistance. The study received fundings from the La Reunion Island University, INSERM-transfert (ZIKAVax project n°15167A10) from CVT Aviesan/DVS Innovation, the ZIKAlliance project (European Union-Horizon 2020 program under grant agreement n°734548) and the ZIKAlert project (European POE FEDER 2014-2020, Ile de La Réunion, action 1.05 under grant agreement n° SYNERGY:RE0001902). The work of A.N. was supported by the Swiss-European Erasmus Mobility Movetia programme of Geneva University (Switzerland).

**Author Contributions:** Marjolaine Roche, Pierre Charneau, Wildriss Viranaicken and Philippe Desprès conceived and designed the experiments. Wildriss Viranaicken, Pierre Charneau, Marjolaine Roche, Philippe Souque, Pascale Krejbich-Trotot, Alexia Ndebo, Sandra Bos performed the experiments. Marjolaine Roche, Pierre Charneau, Wildriss Viranaicken, Gilles Gadea, Chaker El-Kalamouni, and Philippe Desprès analyzed the data; Marjolaine Roche, Pierre Charneau, Philippe Souque, Wildriss Viranaicken, Philippe Desprès contributed to reagents/materials/analysis tools; Marjolaine Roche, Wildriss Viranaicken, Philippe Desprès wrote the paper.

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

## Abbreviations

HEK293 cells	human embryonic kidney 293 cells
IF	immunofluorescence
kDa	kilodalton
mAb	monoclonal antibody
MW	molecular weight
NS1	non structural protein 1
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
ZIKV	zika virus

## References

1. Fields, B.N.; Knipe, D.M. (Eds.) *Fields Virology*, 6th ed.; Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013; Volume 2, ISBN 978-1-4511-0563-6.
2. Dick, G.W.A.; Kitchen, S.F.; Haddow, A.J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 509–520. [[CrossRef](#)]
3. Faye, O.; Freire, C.C.M.; Iamarino, A.; Faye, O.; de Oliveira, J.V.C.; Diallo, M.; Zanutto, P.M.A.; Sall, A.A. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Haddow, A.D.; Schuh, A.J.; Yasuda, C.Y.; Kasper, M.R.; Heang, V.; Huy, R.; Guzman, H.; Tesh, R.B.; Weaver, S.C. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Duffy, M.R.; Chen, T.-H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C.; et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536–2543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cao-Lormeau, V.-M.; Roche, C.; Teissier, A.; Robin, E.; Berry, A.-L.; Mallet, H.-P.; Sall, A.A.; Musso, D. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1084–1086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Heukelbach, J.; Alencar, C.H.; Kelvin, A.A.; De Oliveira, W.K.; Pamplona de Góes Cavalcanti, L. Zika virus outbreak in Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2016**, *10*, 116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Faria, N.R.; da Silva Azevedo, R.D.S.; Kraemer, M.U.G.; Souza, R.; Cunha, M.S.; Hill, S.C.; Theze, J.; Bonsall, M.B.; Bowden, T.A.; Rissanan, I.; et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **2016**, *352*, 345–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Cao-Lormeau, V.-M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [[CrossRef](#)]
10. Faizan, M.I.; Abdullah, M.; Ali, S.; Naqvi, I.H.; Ahmed, A.; Parveen, S. Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. *Intervirology* **2016**, *59*, 152–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. D’Ortenzio, E.; Matheron, S.; de Lamballerie, X.; Hubert, B.; Piorkowski, G.; Maquart, M.; Descamps, D.; Damond, F.; Yazdanpanah, Y.; Leparac-Goffart, I. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *New. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 2195–2198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lindenbach, B.D.; Rice, C.M. Molecular biology of flaviviruses. In *Advances in Virus Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2003; Volume 59, pp. 23–61, ISBN 978-0-12-039859-1.
13. Yun, S.-I.; Lee, Y.-M. Zika virus: An emerging flavivirus. *J. Microbiol.* **2017**, *55*, 204–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rastogi, M.; Sharma, N.; Singh, S.K. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. *Viol. J.* **2016**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Xu, X.; Song, H.; Qi, J.; Liu, Y.; Wang, H.; Su, C.; Shi, Y.; Gao, G.F. Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. *EMBO J.* **2016**, *35*, 2170–2178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Watterson, D.; Modhiran, N.; Young, P.R. The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antivir. Res.* **2016**, *130*, 7–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sironi, M.; Forni, D.; Clerici, M.; Cagliani, R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Brown, W.C.; Akey, D.L.; Konwerski, J.R.; Tarrasch, J.T.; Skiniotis, G.; Kuhn, R.J.; Smith, J.L. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 865–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Gutsche, I.; Coulibaly, F.; Voss, J.E.; Salmon, J.; d’Alayer, J.; Ermonval, M.; Larquet, E.; Charneau, P.; Krey, T.; Megret, F.; et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8003–8008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Edeling, M.A.; Diamond, M.S.; Fremont, D.H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4285–4290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Muller, D.A.; Young, P.R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antivir. Res.* **2013**, *98*, 192–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Beatty, P.R.; Puerta-Guardo, H.; Killingbeck, S.S.; Glasner, D.R.; Hopkins, K.; Harris, E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 304ra141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Desprès, P.; Dietrich, J.; Girard, M.; Bouloy, M. Recombinant baculoviruses expressing yellow fever virus E and NS1 proteins elicit protective immunity in mice. *J. Gen. Virol.* **1991**, *72*, 2811–2816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chung, K.M.; Thompson, B.S.; Fremont, D.H.; Diamond, M.S. Antibody recognition of cell surface-associated NS1 triggers Fc- $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and clearance of west nile virus-infected cells. *J. Virol.* **2007**, *81*, 9551–9555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Schlesinger, J.J.; Foltzer, M.; Chapman, S. The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. *Virology* **1993**, *192*, 132–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Wan, S.-W.; Lu, Y.-T.; Huang, C.-H.; Lin, C.-F.; Anderson, R.; Liu, H.-S.; Yeh, T.-M.; Yen, Y.-T.; Wu-Hsieh, B.A.; Lin, Y.-S. Protection against dengue virus infection in mice by administration of antibodies against modified nonstructural protein 1. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Brault, A.C.; Domi, A.; McDonald, E.M.; Talmi-Frank, D.; McCurley, N.; Basu, R.; Robinson, H.L.; Hellerstein, M.; Duggal, N.K.; Bowen, R.A.; et al. A Zika vaccine targeting NS1 protein protects immunocompetent adult mice in a lethal challenge model. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Huang, J.-L.; Huang, J.-H.; Shyu, R.-H.; Teng, C.-W.; Lin, Y.-L.; Kuo, M.-D.; Yao, C.-W.; Shiao, M.-F. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J. Med. Virol.* **2001**, *65*, 553–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Alcon, S.; Talarmin, A.; Debruyne, M.; Falconar, A.; Deubel, V.; Flamand, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 376–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Viranaicken, W.; Nativel, B.; Krejbich-Trotot, P.; Harrabi, W.; Bos, S.; El Kalamouni, C.; Roche, M.; Gadea, G.; Desprès, P. ClearColi BL21(DE3)-based expression of Zika virus antigens illustrates a rapid method of antibody production against emerging pathogens. *Biochimie* **2017**, *142*, 179–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Noisakran, S.; Dechtawewat, T.; Rinkaewkan, P.; Puttikhunt, C.; Kanjanahaluethai, A.; Kasinrerk, W.; Sittisombut, N.; Malasit, P. Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. *J. Virol. Methods* **2007**, *142*, 67–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Iglesias, M.C.; Frenkiel, M.-P.; Mollier, K.; Souque, P.; Despres, P.; Charneau, P. A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus. *J. Gene Med.* **2006**, *8*, 265–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Coutant, F.; Frenkiel, M.-P.; Despres, P.; Charneau, P. Protective antiviral immunity conferred by a nonintegrative lentiviral vector-based vaccine. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. De Wispelaere, M.; Ricklin, M.; Souque, P.; Frenkiel, M.-P.; Paulous, S.; Garcia-Nicolas, O.; Summerfield, A.; Charneau, P.; Desprès, P. A lentiviral vector expressing Japanese encephalitis virus-like particles elicits broad neutralizing antibody response in pigs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gadea, G.; Bos, S.; Krejbich-Trotot, P.; Clain, E.; Viranaicken, W.; El-Kalamouni, C.; Mavingui, P.; Desprès, P. A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology* **2016**, *497*, 157–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Frumence, E.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; El-Kalamouni, C.; Nativel, B.; Rondeau, P.; Missé, D.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Desprès, P. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- $\beta$  production and apoptosis induction. *Virology* **2016**, *493*, 217–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# Three *Leptospira* Strains From Western Indian Ocean Wildlife Show Highly Distinct Virulence Phenotypes Through Hamster Experimental Infection

Colette Cordonin<sup>1</sup>, Magali Turpin<sup>1</sup>, Jean-Loup Bascands<sup>2</sup>, Koussay Dellagi<sup>1\*</sup>, Patrick Mavingui<sup>1</sup>, Pablo Tortosa<sup>1\*†</sup> and Marjolaine Roche<sup>1†</sup>

## OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Leonard Peruski,  
Centers for Disease Control and  
Prevention (CDC), United States

**Reviewed by:**  
Renee Galloway,  
Centers for Disease Control and  
Prevention (CDC), United States  
Prashant Khare,  
Baylor Scott & White Research  
Institute (BSWRI), United States

**\*Correspondence:**  
Pablo Tortosa  
pablo.tortosa@univ-reunion.fr

**†Present address:**  
Koussay Dellagi,  
Department of International Affairs,  
Institut Pasteur, Paris, France

<sup>†</sup>Co-last authors

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Infectious Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 19 December 2018

**Accepted:** 13 February 2019

**Published:** 11 March 2019

**Citation:**  
Cordonin C, Turpin M, Bascands J-L,  
Dellagi K, Mavingui P, Tortosa P and  
Roche M (2019) Three *Leptospira*  
Strains From Western Indian Ocean  
Wildlife Show Highly Distinct  
Virulence Phenotypes Through  
Hamster Experimental Infection.  
*Front. Microbiol.* 10:382.  
doi: 10.3389/fmicb.2019.00382

<sup>1</sup>Unité Mixte de Recherche Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (UMR PIMIT), Université de La Réunion, INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme de Recherche CYROI, Sainte-Clotilde, Reunion, France, <sup>2</sup>Unité Mixte de Recherche Diabète Athérothrombose Thérapie Réunion-Océan Indien (UMR DéTROJ), Université de La Réunion, INSERM U1188, Plateforme de Recherche CYROI, Sainte-Clotilde, Reunion, France

Leptospirosis is one of the most widespread zoonoses worldwide, with highest incidence reported on tropical islands. Recent investigations carried out in a One-Health framework have revealed a wide diversity of pathogenic *Leptospira* lineages on the different islands of Western Indian Ocean carried out by a large diversity of mammal reservoirs, including domestic and wild fauna. Using golden Syrian hamsters as a model of acute infection, we studied the virulence of *Leptospira interrogans*, *L. mayottensis*, and *L. borgpetersenii* isolates obtained from rats, tenrecs, and bats, respectively. Hamsters were inoculated with  $2 \cdot 10^8$  bacterial cells and monitored for 1 month. The *L. interrogans* isolate proved to be the most pathogenic while *L. mayottensis* and *L. borgpetersenii* isolates induced no clinical symptoms in the infected hamsters. High leptospiral DNA amounts were also detected in the urine and organs of hamsters infected with the *L. interrogans* isolate while *L. mayottensis* and *L. borgpetersenii* isolates mostly failed to disseminate into the organism. In addition, histological damage was more pronounced in the kidneys and lungs of hamsters infected with the *L. interrogans* isolate. Altogether, these data support that *Leptospira* strains shed by mammals endemic to this insular ecosystem (*L. mayottensis* and *L. borgpetersenii* isolates) are less pathogenic than the *L. interrogans* rat-borne isolate. These results may provide a relevant framework for understanding the contrasting epidemiology of human leptospirosis observed among Western Indian Ocean islands.

**Keywords:** *Leptospira*, leptospirosis, virulence, hamster model, kidney, bats, tenrecs, Western Indian Ocean

## INTRODUCTION

Leptospirosis is a neglected re-emerging bacterial zoonosis affecting over one million persons annually and causing nearly 60,000 deaths worldwide (Costa et al., 2015). This disease is caused by a spirochete from the genus *Leptospira* (Adler, 2015) and human infection most commonly results from indirect environmental contamination with leptospires shed by the urine of infected

reservoir animals. In humans, asymptomatic infection is more common than the symptomatic disease which may be associated with mild symptoms such as fever, headache, vomiting, or more severe symptoms including pulmonary hemorrhage, liver and renal failure, also known as Weil's syndrome (Evangelista and Coburn, 2010).

Leptospirosis can reach high incidence in human populations especially in the tropics where humid and warm climate can promote survival of the bacteria (Simbizi et al., 2016). The tropical islands of Western Indian Ocean report some of the highest incidence worldwide (Pappas et al., 2008; Derne et al., 2011). Despite their importance, unfortunately little is known about the precise nature of pathogenic strains in this region, partly due to the fact that very few have been successfully isolated from either human clinical cases or animal hosts. Rats are well-known reservoirs of leptospirosis worldwide, including Western Indian Ocean islands, but they are not the only mammals at play. For example, dogs and cattle were also identified as potential reservoirs for the disease on Reunion while *Tenrec ecaudatus*, introduced from Madagascar to Mayotte as game meat, may play a role in human leptospirosis (Guernier et al., 2016; Lagadec et al., 2016). In Madagascar, a wide range of endemic mammals, including several tenrec and bat species, has been reported to shelter a wide diversity of *Leptospira* lineages although there is no evidence of their role as disseminators of the disease (Lagadec et al., 2012; Dietrich et al., 2014; Gomard et al., 2016; Guernier et al., 2016).

Recently, molecular studies have described contrasting epidemiology of leptospirosis between the islands of Western Indian Ocean. On Reunion Island, most cases of leptospirosis are caused by *Leptospira interrogans* with sequence types (STs) also distributed in other countries worldwide (Guernier et al., 2016). By contrast, studies conducted on human cases from Mayotte reported a variety of original STs belonging to *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, and *L. mayottensis* species (Bourhy et al., 2012, 2014). In addition, severity of human leptospirosis is significantly different on the two islands with 4.6% admission in intensive care unit and 0.7% mortality rate in Mayotte while Reunion records 30% admission in intensive care unit and 5% mortality (Cire Océan Indien, 2017; Pagès et al., 2017; Subiros et al., 2017).

In this study we aim to provide a first insight into differences in virulence between *Leptospira* strains from Western Indian Ocean islands shed by different mammal hosts through experimental infection of golden Syrian hamsters. This rodent model mimics the clinical symptoms of human leptospirosis and has already allowed the description of several virulence phenotypes of different *Leptospira* strains (Tucunduva de Faria et al., 2007; Silva et al., 2008; Villanueva et al., 2014; Matsui et al., 2015). To pursue our goal, we tested three available *Leptospira* isolates obtained from wild fauna during a previous research program. The *L. interrogans* isolate was obtained from a rat on Reunion and displays a ST associated with the majority of acute human cases on Reunion Island (Guernier et al., 2016) and the *L. mayottensis* isolate obtained from a tenrec on Mayotte has a ST previously reported in several human acute cases on the island (Lagadec et al., 2016). By contrast, the *L. borgpetersenii* isolate was obtained from a

bat endemic to Madagascar and has a genotype that has not been reported from any human case thus far.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal Experiments and Ethical Statement

Experiments were conducted following the guidelines of the Office Laboratory of Animal Care at the CYROI platform. Female golden Syrian hamsters (Janvier Labs, Le Genest, France), aged from 6 to 8 weeks, were housed by 3 in enriched cages. The appropriate number of animals was calculated using the Resource equation method (Festing, 2006). All animal procedures carried out in this study were performed in accordance with the European Union legislation for the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU). Experimental procedures were approved by the French Ministry of Sciences and Higher Education under the number APAFIS#8773-2016111615105111 v2.

### Bacterial Isolates

*Leptospira* strains used in this study were isolated from the kidneys of animals trapped in the field. *L. interrogans* was isolated on Reunion Island from *Rattus rattus* (2013RR GLM983) (Guernier et al., 2016), *L. mayottensis* on Mayotte from *Tenrec ecaudatus* (2014TE MDI222) (Lagadec et al., 2016) and *L. borgpetersenii* on Madagascar from *Triaenops menamena* (2014TM FMNH228863), an insectivorous bat endemic to Madagascar (Lebarbenchon et al., 2017). Leptospires were grown at 28°C for 14–70 days in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) liquid medium (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with albumin fatty acid supplement (AFAS) and 5-fluorouracil (5-Fu) as previously described (Lagadec et al., 2016; Biscornet et al., 2017). Of note, all used isolates were passaged less than ten times *in vitro* before restoration of virulence.

### Restoration of Virulence

As the virulence of pathogenic *Leptospira* tends to attenuate during *in vitro* passages and freeze storage (Reed et al., 2000; Samir and Wasfy, 2013), the assessment of virulence requires a restoration step in hamsters by serial infections (Haake, 2006). For this, two serial passages in hamsters were performed and the resulting isolates were subsequently used for experimental infection. Cultures were centrifuged at 9,000 rpm for 30 min, pellets resuspended in 500- $\mu$ l sterile phosphate buffer saline (PBS) 1X, and bacterial cells counted using an improved Neubauer cell counting chamber (Marienfeld Superior, Germany). Animals were inoculated intraperitoneally (i.p.) with  $1.5\text{--}3 \times 10^8$  leptospires in 500  $\mu$ l of sterile PBS 1X and sacrificed 3–7 days post-infection (dpi). Urine and kidney samples were used to inoculate EMJH liquid medium supplemented with AFAS and 200  $\mu$ g/ml 5-Fu as previously detailed,<sup>1</sup> followed by a subculture in the same fresh medium without 5-Fu. Each strain was subcultured less than 5 times *in vitro* in order to maintain the virulence of leptospires used for experimental infection (Reed et al., 2000).

<sup>1</sup><http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ifcbbiw>

## Infection and Sample Collection

Hamsters were inoculated i.p. with  $2 \times 10^8$  low-passaged *L. interrogans* ( $n = 9$  animals), *L. mayottensis* ( $n = 7$ ), or *L. borgpetersenii* ( $n = 7$ ) resuspended in 500  $\mu$ l of sterile PBS 1X. Control animals ( $n = 7$ ) were injected i.p. with 500  $\mu$ l of sterile PBS 1X. Animals were monitored for 4 weeks. Urine samples were collected from each hamster once a day and subsequently frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . After 4 weeks or earlier when moribund (characterized by significant weight loss, lethargy, isolation, and ruffled fur), hamsters were anesthetized with 5 mg/kg xylazine and 25 mg/kg ketamine injected i.p. and subsequently euthanized by cardiac puncture. The lungs, liver, spleen, kidneys, and brain were collected and processed for further experiments or immediately frozen at  $-80^\circ\text{C}$ .

## Bacterial Load Measurement

Up to 25 mg of frozen kidney, lung, liver, and brain, and up to 10 mg of frozen spleen tissue were collected and lysed in ATL buffer (Qiagen, Germany) for at least 3 h. DNA was extracted from frozen organs and from up to 100  $\mu$ l of frozen urine samples using the DNEasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany). DNA amounts were quantified using a probe-specific real-time PCR (Smythe et al., 2002) and a Quantinova probe PCR mix (Qiagen, Germany). Each sample was triplicated and considered positive if at least two out of the three triplicates led to positive PCR with  $\text{Ct} < 45$ . For organ samples, results are expressed as mean genome copies per milligram of tissue  $\pm$  standard error of mean (SEM), determined using data of all hamsters within a group. DNA amounts in urine were determined for each animal and are reported as genome copies per microliter of urine. The number of genome copies was calculated considering the genome size of *L. interrogans* strain Fiocruz L1-130 (Nascimento et al., 2004).

## Viability of Leptospire Assay

A portion of fresh liver, kidney, or brain was used to inoculate fresh EMJH medium as previously detailed<sup>2</sup>. Cultures were observed once a week under a dark-field microscope (Axio Lab.A1, Zeiss France) and considered negative if no leptospire were visible after 4 months.

## Histological Studies

A portion of fresh lung and one whole kidney were fixed in 4% paraformaldehyde for 24–48 h, dehydrated in five successive ethanol baths (70, 90, 95,  $2 \times 100\%$ , 1 h each) and two successive xylene baths, 1 h each. Dehydrated organs were incubated in two successive melted paraffin baths for 1 h and overnight, respectively, and eventually in paraffin. Four- to six- $\mu\text{m}$ -thick paraffin sections of kidney were deparaffinized in three successive xylene baths, 10 min each, and rehydrated in three successive ethanol baths (100, 70, and 50%, 2 min each) and one bath of distilled water, 2 min. Rehydrated sections were stained with either periodic acid Schiff or Sirius Red and sections of lung were stained with hematoxylin

and eosin. Stained sections were observed with a digital slide scanner (NanoZoomer S60, Hamamatsu France).

## Statistical Analysis

Log-rank test was used to compare survival curves of the different groups of hamsters. Non-parametric Kruskal-Wallis followed by non-parametric Dunn's multiple comparison tests were used to compare mean body weight percentage and *Leptospira* DNA amounts in organs of hamsters. Statistical analyses were conducted using RStudio 1.0.153 (RStudio Team, 2015).

## RESULTS

### Body Weight Monitoring, Clinical Signs, and Survival Analysis

Groups of hamsters were inoculated i.p. with  $2 \times 10^8$  bacteria and subsequently monitored for 4 weeks. None of the hamsters infected with *L. borgpetersenii* and *L. mayottensis* exhibited any clinical sign and all challenged animals survived throughout the whole experiment with a mean weight increase of 24 and 22%, respectively, comparable with the weight increase measured on control hamsters (27%) (Figure 1A). By contrast, the survival rate of hamsters infected with *L. interrogans* dropped drastically from 7 days after the infection compared to hamsters infected with *L. mayottensis* and *L. borgpetersenii* ( $p = 0.0019$ ) (Figure 1B): only one out of the nine *L. interrogans*-infected hamsters actually survived during the 4 weeks of experiment without any clinical sign and a weight increase of 23%. Moribund *L. interrogans*-infected hamsters showed weight loss averaging 7.08% in the first week, and reaching 16.65% between 7 and 12 dpi (Figure 1A). Other clinical signs included ruffled fur, lethargy, and isolation.

### Dynamics of *Leptospira* Urinary Shedding

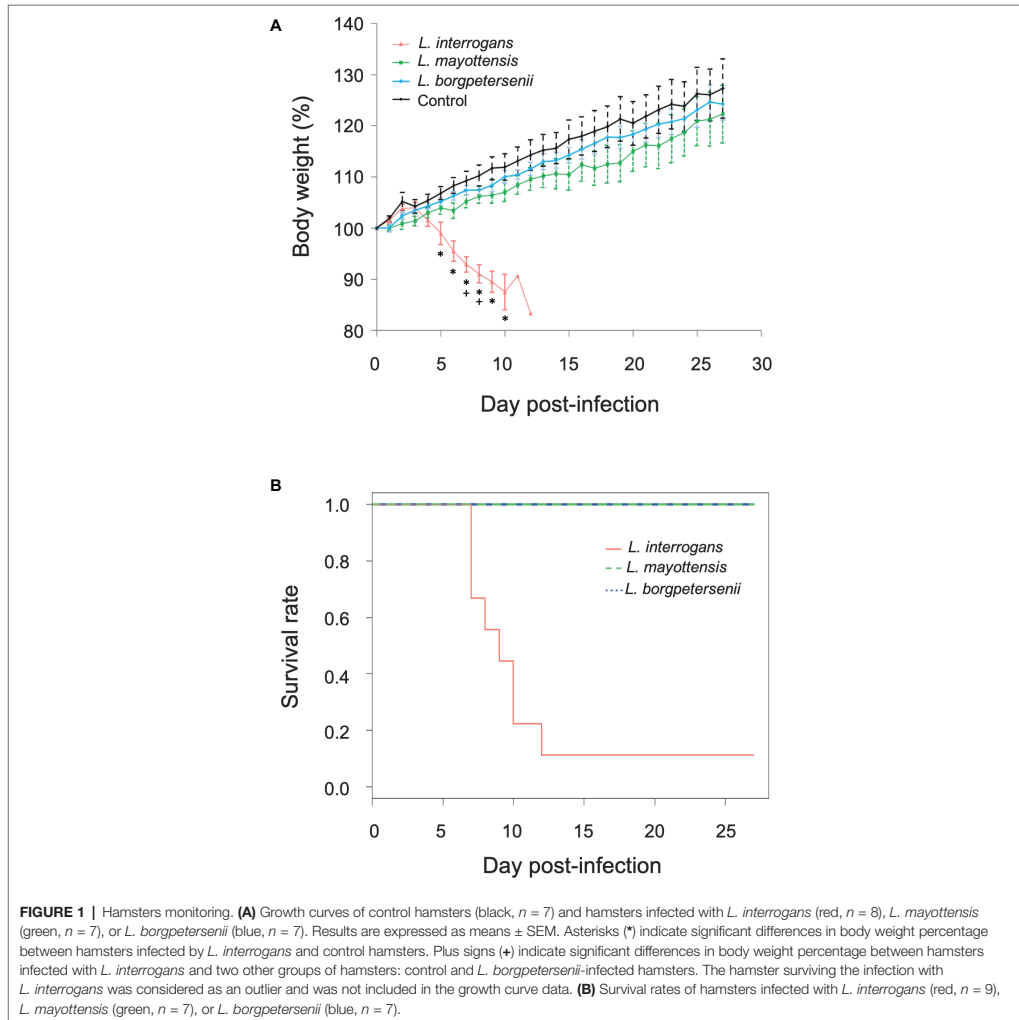
The urine of hamsters was collected once a day whenever possible in order to follow the dynamics of *Leptospira* shedding following infection (Figure 2A). *Leptospira* DNA was detected discontinuously in the urine of all *L. interrogans*-infected hamsters: high peaks of *Leptospira* DNA, ranging from 820.62 ( $\pm 159.79$ ) to 1839.19 ( $\pm 414.13$ ) genome copies per microliter of urine, were detected in the urine of five out of nine hamsters as early as 5 dpi. Among these animals, the single hamster surviving *L. interrogans* infection excreted high amounts of *Leptospira* DNA throughout the 4 weeks of infection. The other four *L. interrogans*-infected animals showed limited leptospiral excretion during the whole experiment ( $< 80$  *Leptospira* genome copies/ $\mu\text{l}$ ). By contrast, hamsters infected with *L. borgpetersenii* and *L. mayottensis* isolates shed little or no *Leptospira* DNA in their urine (up to 2.54 and 35.72 genome copies/ $\mu\text{l}$ , respectively).

### Quantification of *Leptospira* DNA in Organs

*Leptospira* DNA was quantified in brain, kidney, liver, lung, and spleen tissues of euthanized animals. As shown on Table 1, highest DNA amounts were obtained in kidney tissues, the highest

<sup>2</sup><http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.ificbwiw>



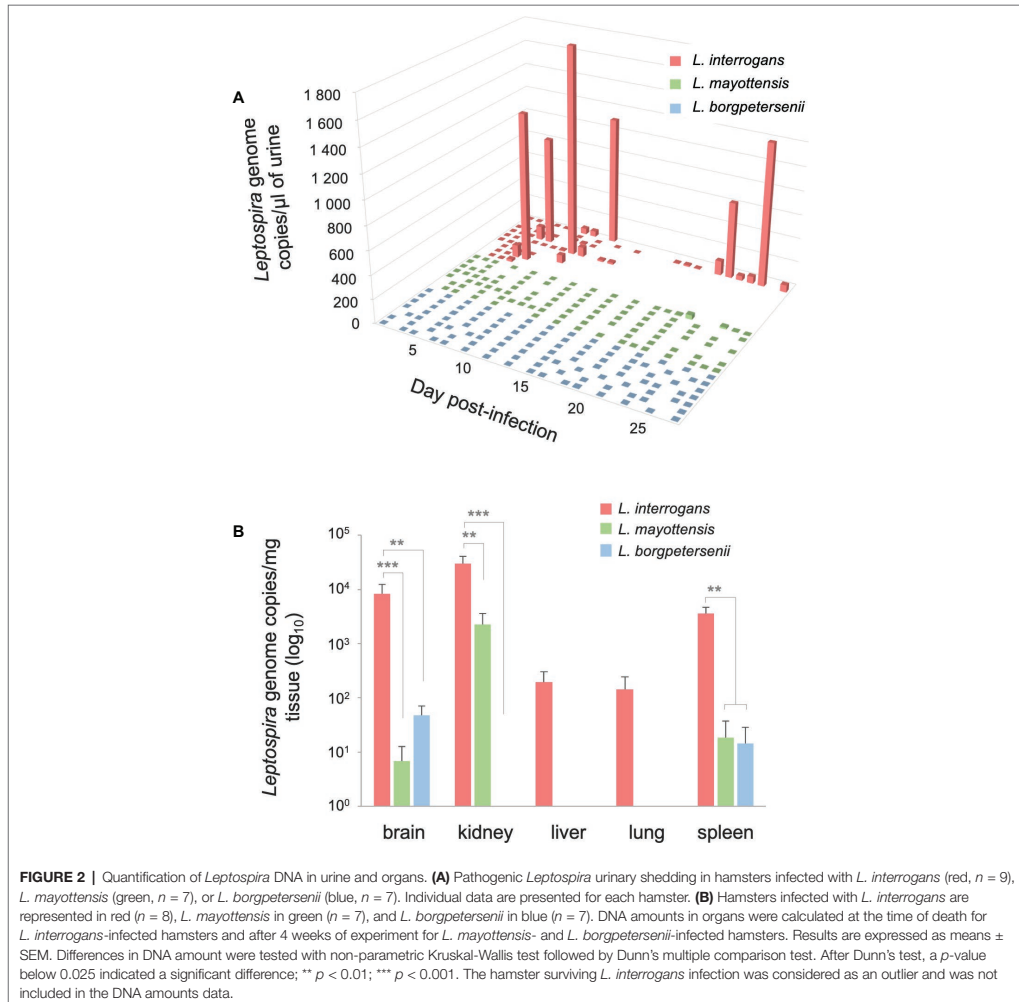


amount being detected in the single hamster surviving *L. interrogans* infection ( $1.7 \times 10^6 \pm 2.9 \times 10^5$  genome copies/mg). *Leptospira* DNA amounts were higher in *L. interrogans*-infected animals for all tested tissues: DNA amount was increased by over 10-fold in the kidneys and over 100-fold in the brain, lungs, and spleen tissues of animals infected with *L. interrogans* as compared to those infected with *L. mayottensis* or *L. borgpetersenii* (Figure 2B). *Leptospira* DNA was detected in the liver of *L. interrogans*-infected animals only. All kidney tissues from *L. interrogans*-infected hamsters tested positive through PCR, while only three out of seven *L. mayottensis*- and none of the

*L. borgpetersenii*-infected animals tested positive using DNA from their kidney tissues (Table 1). DNA was detected at low levels ( $< 40$  genome copies/mg) in the spleen and brain of hamster infected with either *L. mayottensis* or *L. borgpetersenii* (Figure 2B).

### Viability of *Leptospira*

Considering previous detection of high levels of *Leptospira* DNA in the kidneys and liver of infected hamsters (Coutinho et al., 2014; Wunder et al., 2016), possible brain damage induced by the disease (Panicker et al., 2001; Chang et al., 2003), and culture constraints, we selected these three organs for detection



of live leptospires through culture (Table 1). Live leptospires were obtained from almost all kidney and brain homogenate cultures and in one-third of liver homogenate cultures from *L. interrogans*-infected hamsters. Intriguingly, no leptospires were seen in any tissue culture prepared from the single surviving *L. interrogans*-infected hamster. Organs from *L. mayottensis*-infected hamsters led to lower isolation success with no positive brain or liver homogenate cultures and only 2 out of 7 positive kidney homogenate cultures. Although lost after one passage *in vitro*, live leptospires were obtained from animals infected with *L. borgpetersenii* mainly using brain tissue and to a lesser extent using kidney tissue (Table 1).

### Differential Tissue Damages Revealed by Histological Monitoring

The renal tropism of pathogenic *Leptospira* and the pulmonary involvement in most severe human forms of leptospirosis (Vijayachari et al., 2008) led us to consider kidneys and lungs for histological studies. Gross external examination of organs showed significant lesions in the kidneys of hamsters infected with *L. interrogans* (Figure 3, see lower right inserts). Lungs of *L. interrogans*- and *L. mayottensis*-infected hamsters harbored some lesions while the lungs of *L. borgpetersenii*-infected hamsters showed a normal phenotype, indistinguishable from control lungs (data not shown).

**TABLE 1** | Rate of *Leptospira* positive samples using qPCR or culture on organs of experimentally infected hamsters.

	Positive qPCRs/Tested animals (%)					Positive cultures/Tested animals (%)		
	Brain	Kidney	Liver	Lung	Spleen	Brain	Kidney	Liver
<i>L. interrogans</i>	8/9 (88.9)	9/9 (100.0)	4/9 (44.4)	3/9 (33.3)	7/8 (87.5)*	8/9 (88.9)	8/9 (88.9)	3/9 (33.3)
<i>L. mayottensis</i>	2/7 (28.6)	4/7 (57.1)	0/7 (0.0)	1/7 (14.3)	1/7 (14.3)	0/7 (0.0)	2/7 (28.6)	0/7 (0.0)
<i>L. borgpetersenii</i>	3/7 (42.9)	0/7 (0.0)	0/7 (0.0)	0/7 (0.0)	1/7 (14.3)	5/7 (71.4)*	2/7 (28.6)*	0/7 (0.0)

\*Data missing for one hamster.

\*The isolates were lost after one passage *in vitro*.

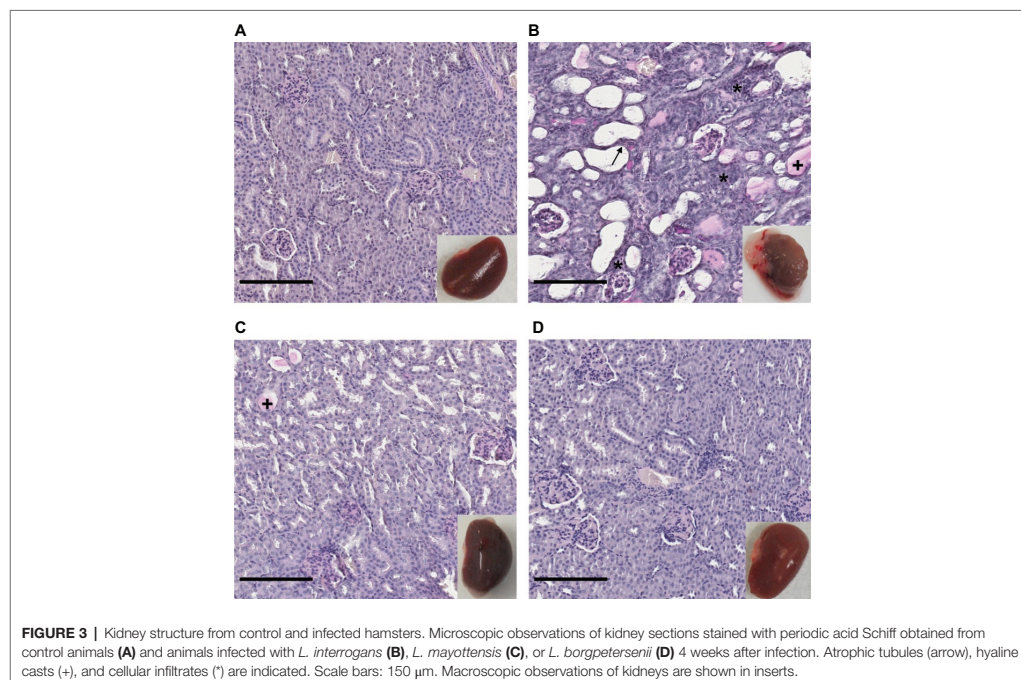
Data indicate number of positive qPCRs and cultures at the time of death for *L. interrogans*-infected animals and at 4 weeks post-infection for *L. mayottensis*- and *L. borgpetersenii*-infected hamsters.

Microscopic sections of kidneys from control hamsters and from hamsters infected with *L. borgpetersenii* stained with periodic acid Schiff showed glomeruli and tubules of regular shape 4 weeks after infection. Slightly dilated tubules and some hyaline casts were visible in kidney sections from *L. mayottensis*-infected hamsters. Kidneys from hamsters infected with *L. interrogans* showed retracted glomeruli with large urinary space, focal infiltrates of inflammatory cells mainly around vessels, and very important tubular damages characterized by tubular dilation, atrophy, and hyaline casts (Figure 3). Sirius Red staining further highlighted interstitial fibrosis in kidneys from these animals (Figure 4).

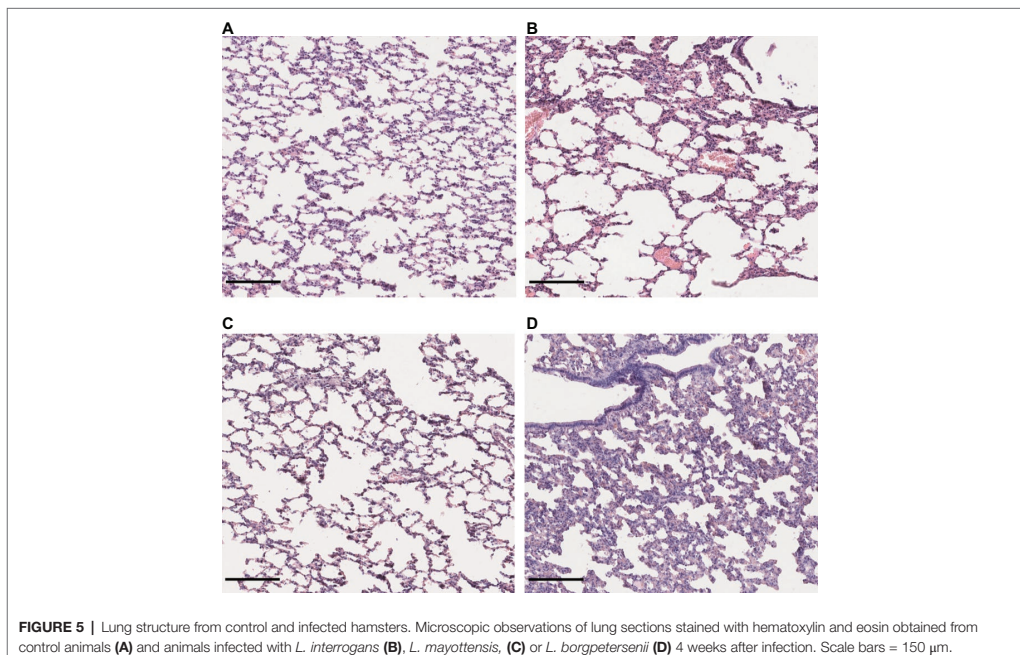
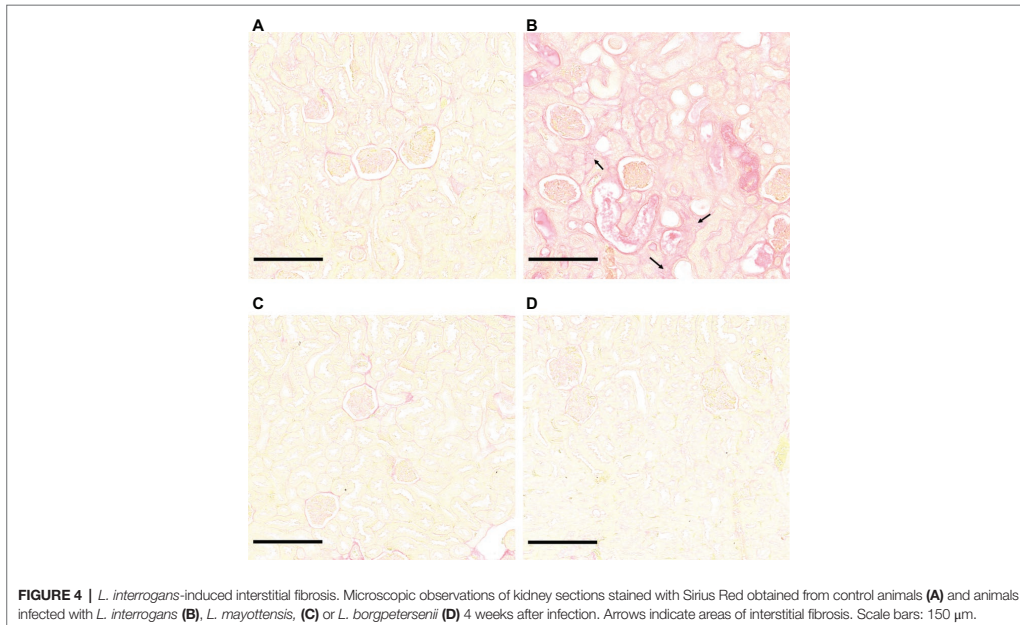
Lung sections stained with hematoxylin and eosin revealed a mild to moderate thickening of alveolar septa in the lungs

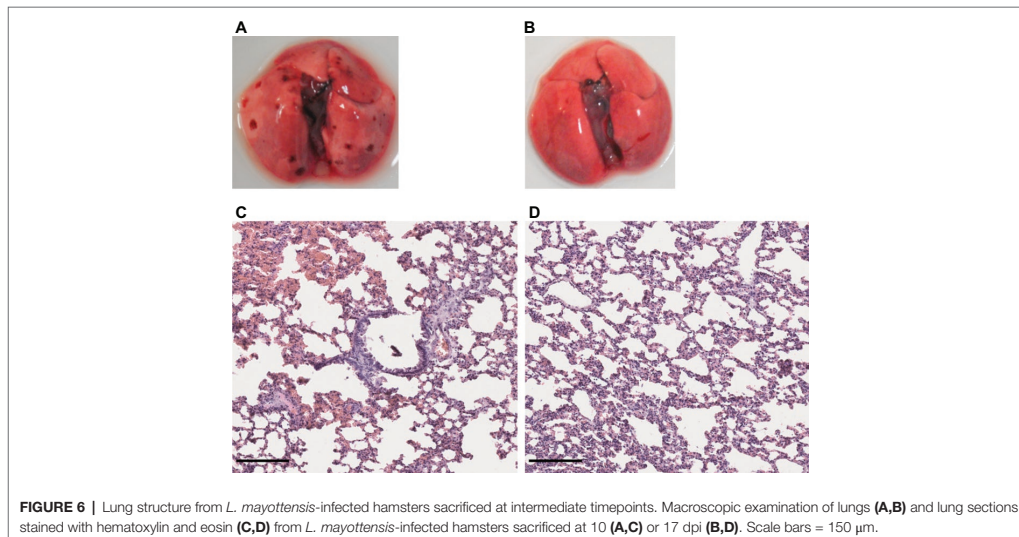
of hamsters infected with *L. interrogans* and *L. borgpetersenii*, at the time of death and after 4 weeks of infection, respectively. Dilated alveoli were also observed in the lungs of *L. interrogans*-infected hamsters. By contrast, lungs of control and *L. mayottensis*-infected hamsters euthanized after 4 weeks showed a regular structure (Figure 5).

Given that no clinical sign was observed in the first week of infection in hamsters infected with either *L. mayottensis* or *L. borgpetersenii*, we chose to sacrifice only one hamster from each group at two different intermediate timepoints, 10 and 17 (*L. mayottensis* group) or 18 (*L. borgpetersenii* group) dpi, in order to explore possible internal damages. At 10 dpi, the hamster infected with *L. mayottensis* harbored several petechial hemorrhages in the lungs and histological analysis revealed



**FIGURE 3** | Kidney structure from control and infected hamsters. Microscopic observations of kidney sections stained with periodic acid Schiff obtained from control animals (A) and animals infected with *L. interrogans* (B), *L. mayottensis* (C), or *L. borgpetersenii* (D) 4 weeks after infection. Atrophic tubules (arrow), hyaline casts (+), and cellular infiltrates (\*) are indicated. Scale bars: 150  $\mu$ m. Macroscopic observations of kidneys are shown in inserts.





focal areas of hemorrhage and thickening of alveolar septa. At 17 dpi, no macroscopic lesion but thickening of alveolar septa were observed in the lungs; no area of hemorrhage was observed (**Figure 6**). Lungs of *L. borgpetersenii*-infected hamsters sacrificed at 18 dpi harbored the same features as at the end of the experiment (data not shown).

## DISCUSSION

Western Indian Ocean islands harbor a large diversity of pathogenic *Leptospira* lineages carried out by a wide range of animal reservoirs (Dietrich et al., 2018). In this study, we selected three regional *Leptospira* strains and evaluated their virulence phenotype using golden Syrian hamsters as a model of acute disease. The obtained data show that *L. mayottensis* 2014TE MDI222 and *L. borgpetersenii* 2014TM FMNH228863 isolates endemic to Madagascar and surrounding islands are both less virulent than *L. interrogans* 2013RR GLM983 isolate from Reunion. All but one hamster infected with *L. interrogans* isolate showed significant weight loss and had to be euthanized a few days after the challenge, in keeping with previous experimental infections (Forster et al., 2013; Villanueva et al., 2014). It was either difficult or impossible to collect urine from these hamsters, likely as a result of kidney failure, which was further confirmed by histological examinations that showed tissue damages. Unexpectedly, no areas of intensive hemorrhage were observed in the lungs of challenged animals, which differs from previous studies reporting foci of intensive hemorrhage in *L. interrogans*-infected hamsters (Nally et al., 2004; Villanueva et al., 2014). The absence of profuse pulmonary lesions could result from the high infectious

dose used in our experiments: the hamsters could have died before the infection invaded the lungs (Diniz et al., 2011). As for the single surviving hamster, a recent study has shown that females are more resistant than males to *L. interrogans* infection (Gomes et al., 2018). The obtained low survival rate might be actually zero if males had been used instead of females. Interestingly, as previously reported (Haake, 2006), qPCR showed that this single survivor supported persistent renal infection.

By contrast, *L. mayottensis* and *L. borgpetersenii* isolates failed to induce clinical symptoms on the infected hamsters. Intriguingly, necropsy at 4 weeks revealed macroscopic pulmonary lesions in some *L. mayottensis*-hamsters but not in *L. borgpetersenii*-hamsters although histological analysis revealed a thickening of alveolar septa in the latter. The absence of early symptoms in these two groups led us to euthanize animals at intermediate timepoints in order to address possible tissue damage in the course of the experiment. No damage was observed at 10 and 18 dpi in *L. borgpetersenii*-infected hamsters. *L. mayottensis*-infected hamsters showed pulmonary damage at 10 dpi but not at 17 dpi. Histological findings confirmed these observations with the presence of focal hemorrhage and alveolar septal thickening at 10 dpi and only alveolar septal thickening at 17 dpi. This pattern is suggestive of an attempt of lung repair, a phenomenon previously described in hamsters experimentally infected with *L. interrogans* (Marinho et al., 2009). The confirmation of such pattern will require the implementation of an experimental setup allowing to monitor the dynamics of infection and tissue lesions induced by *L. mayottensis*.

*Leptospira* tissue tropism following experimental infection differed among bacterial isolates. The high *L. interrogans* DNA

amounts and the presence of live leptospires in the brain and kidneys of infected hamsters suggest that these organs are preferential targets of *L. interrogans*. Retracted glomeruli, dilated tubules, and an abundance of hyaline casts in the kidneys have commonly been observed in *L. interrogans* infection (Areal, 1962; Zhang et al., 2012; Forster et al., 2013). Although the induction of nervous system damage by *L. interrogans* has been previously reported in human cases (Forwell et al., 1984; Brown et al., 2003; Chang et al., 2003; El Bouazzaoui et al., 2011), experimental infection studies mainly report damage and high leptospiral load in the kidneys, lungs, and liver only (Silva et al., 2008; Lourdault et al., 2009; Fujita et al., 2015). Four weeks following infection, *L. mayottensis* was present only in the kidneys as indicated by high leptospiral DNA amounts and the presence of live leptospires. However, at 10 dpi the presence of live leptospires in cultures inoculated with kidney, brain, and liver homogenates indicates that *L. mayottensis* could actually disseminate into several organs in the early phases of infection.

*L. borgpetersenii* isolate was found to be the least virulent strain used in this study. This isolate induced no clinical sign and very low leptospiral DNA amounts were detected in the different organs. Leptospires were observed in some cultures from brain and kidney homogenates albeit with low density and with bacteria being lost after one passage *in vitro*. The low *Leptospira* DNA amounts and the absence of cultivable leptospires in the organs from hamsters sacrificed at intermediate timepoints are suggestive of poor dissemination although observation of alveolar thickening indicates that the lungs can be affected by this *Leptospira* lineage. This differs from infection patterns observed with other *L. borgpetersenii* strains inducing important systemic damage and death in hamsters (Villanueva et al., 2014; Matsui et al., 2015). A previous study comparing the virulence of two *L. borgpetersenii* strains, both serovar Hardjo, reported that the avirulent strain was able to efficiently colonize the kidneys of hamsters even at a lower dose (Zuerner et al., 2012). Hence, the bat-borne *Leptospira* used herein clearly behaves differently. Although genotyping defines this isolate as *L. borgpetersenii*, Malagasy bats shelter a huge diversity of unique *L. borgpetersenii* lineages (Gomard et al., 2016) and a complete genome sequencing of this particular isolate is required to determine its exact phylogenetic position.

We can hypothesize that these distinct virulence phenotypes may partly explain the contrasted epidemiology of human leptospirosis in Western Indian Ocean region. Indeed, MLST profile of *L. interrogans* 2013RR GLM983 isolate, found in other countries worldwide, is the same as that of *L. interrogans* identified in most human leptospirosis acute cases on Reunion while *L. mayottensis* 2014TE MDI222 isolate, considered as endemic to Western Indian Ocean, has the same MLST profile as *L. mayottensis* identified in clinical cases on Mayotte. By contrast, *L. borgpetersenii* 2014TM FMNH228863 isolate, which induced no clinical sign in hamsters, has not yet been identified in human cases of leptospirosis. On Reunion, a narrow diversity of mainly *L. interrogans* is involved in clinical cases while a wider diversity of *Leptospira*, distributed in four distinct species, is identified in clinical cases on Mayotte. On Reunion, mostly

introduced mammals like rats, mice, or dogs, were identified as *Leptospira* carriers (Guernier et al., 2016), while on Mayotte, endemic small mammals like tenrecs may also have epidemiological importance in human leptospirosis (Lagadec et al., 2016). The French islands of Mayotte and Reunion hence provide an interesting environmental setup, as transmission chains are distinct on both islands and associated with human infection of contrasting severity. The understanding of such epidemiological contrast could be addressed through a prospective study to be conducted on Mayotte in which the symptoms of each human case are described together with each associated *Leptospira* lineage/species. This will allow addressing whether one species or lineage is responsible for most of the fatal cases, and testing whether the remaining endemic lineages may be associated with milder symptoms.

In conclusion, our data suggest that the *L. interrogans* 2013RR GLM983 isolate is significantly more virulent than both *L. mayottensis* 2014TE MDI222 and *L. borgpetersenii* 2014TM FMNH228863 isolates, endemic to Western Indian Ocean. Golden Syrian hamsters provide a good experimental model for exploring virulence features of *Leptospira* strains found in Western Indian Ocean and the contrasted epidemiology of leptospirosis observed in the islands of this region. Furthermore, presented data pave the way for future investigations aiming at illuminating genetic determinants and mechanisms of virulence.

It has been previously reported that the regulation of genes encoding cytokines can differ according to the *Leptospira* strain used to infect hamsters (Fujita et al., 2015). This differential regulation of cytokine expression has also been observed among human patients. More specifically, the up-regulation of cytokines was more important in patients developing a severe disease compared to patients with mild disease (Reis et al., 2013). The inflammatory response may also have an involvement in the development of the disease. A previous study reported an absence of leptospires in the lungs of infected hamsters although pulmonary damage was observed (Tomizawa et al., 2017). It would be interesting to compare the inflammatory response induced by the three isolates used in this study and determine the impact of the potentially different regulation on the phenotype of infected hamsters.

The determinants of virulence are poorly known in *Leptospira* (Lehmann et al., 2014; Buyuktimkin et al., 2015; Patra et al., 2015; Fouts et al., 2016), notably because genetic tools are scarce, hence impairing reverse genetics approaches and because the basal position of spirochetes is associated with a high number of proteins of unknown function. The unique diversity of pathogenic *Leptospira* sheltered by mammals mostly endemic to Western Indian Ocean region provides a biological material that is suitable for the investigation of virulence determinants through genome-wide approaches such as comparative genomics.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC, KD, PT, MR, and PM conceived and designed the experiments. CC, MR, PT, MT, and J-LB performed the experiments. CC, PT, PM, MR, and J-LB contributed resources,

reagents, materials, and analysis tools. CC wrote the paper. All co-authors revised the paper.

## FUNDING

The study received funding from FEDER INTERREG V program ECOSPIR (GURDTI/20170789-6875). CC received a PhD grant from the French Ministry of Higher Education

and Research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Matthieu Bringart for performing Sirius Red staining and David A. Wilkinson for helping with writing.

## REFERENCES

- Adler, B. (2015). *Leptospira* and Leptospirosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 1–293. doi: 10.1001/archneur.1967.00470290112018
- Arean, V. M. (1962). The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Am. J. Pathol.* 40, 393–423.
- Biscornet, L., Dellagi, K., Pagès, F., Bibi, J., de Comarmond, J., Mélade, J., et al. (2017). Human leptospirosis in Seychelles: a prospective study confirms the heavy burden of the disease but suggests that rats are not the main reservoir. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:e0005831. doi: 10.1371/journal.pntd.0005831
- Bourhy, P., Collet, L., Brisse, S., and Picardeau, M. (2014). *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 4061–4067. doi: 10.1099/ijls.0.066597-0
- Bourhy, P., Collet, L., Lernout, T., Zinini, F., Hartskeerl, R. A., Van Der Linden, H., et al. (2012). Human *Leptospira* isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular features. *J. Clin. Microbiol.* 50, 307–311. doi: 10.1128/JCM.05931-11
- Brown, P. D., Carrington, D. G., Gravekamp, C., Van De Kemp, H., Edwards, C. N., Jones, S. R., et al. (2003). Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Res. Microbiol.* 154, 581–586. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00166-9
- Buyuktimkin, B., Saier, M. H., Jolla, L., and Saier, M. H. (2015). Comparative genomic analyses of transport proteins encoded within the genomes of *Leptospira* species. *Microb. Pathog.* 88, 52–64. doi: 10.1016/j.micpath.2015.07.019
- Chang, A., Ranawaka, U., Gunasekera, H., and Wijesekera, J. (2003). A case of primary neuroleptospirosis. *Ceylon Med. J.* 48, 143–144. doi: 10.4038/cmj.v48i4.3335
- Cire Océan Indien (2017). Surveillance de la leptospirose à la Réunion en 2017. *Le Point Épidémiol.* 3, 1–2.
- Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., et al. (2015). Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0003898. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898
- Coutinho, M. L., Matsunaga, J., Wang, L. C., de la Peña Moctezuma, A., Lewis, M. S., Babbitt, J. T., et al. (2014). Kinetics of *Leptospira interrogans* infection in hamsters after intradermal and subcutaneous challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e3307. doi: 10.1371/journal.pntd.0003307
- Derne, B. T., Fearnley, E. J., Lau, C. L., Paynter, S., and Weinstein, P. (2011). Biodiversity and leptospirosis risk: a case of pathogen regulation? *Med. Hypotheses* 77, 339–344. doi: 10.1016/j.mehy.2011.05.009
- Dietrich, M., Gomard, Y., Lagadec, E., Ramasindrazana, B., Le Minter, G., Guernier, V., et al. (2018). Biogeography of *Leptospira* in wild animal communities inhabiting the insular ecosystem of the western Indian Ocean islands and neighboring Africa. *Emerg. Microbes Infect.* 7:57. doi:10.1038/s41426-018-0059-4
- Dietrich, M., Wilkinson, D. A., Soarimalala, V., Goodman, S. M., Dellagi, K., and Tortosa, P. (2014). Diversification of an emerging pathogen in a biodiversity hotspot: *Leptospira* in endemic small mammals of Madagascar. *Mol. Ecol.* 23, 2783–2796. doi: 10.1111/mec.12777
- Diniz, J. A., Rodrigues Félix, S., Bonel-Raposo, J., Seixas Neto, A. C. P., Vasconcellos, F. A., Grassmann, A. A., et al. (2011). Highly virulent *Leptospira borgpetersenii* strain characterized in the hamster model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 271–274. doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0013
- El Bouazzaoui, A., Houari, N., Arika, A., Belhoucine, I., Boukatta, B., Sbai, H., et al. (2011). Facial palsy associated with leptospirosis. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* 128, 275–277. doi: 10.1016/j.anorl.2011.02.011
- Evangelista, K. V., and Coburn, J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5, 1413–1425. doi: 10.2217/fmb.10.102
- Festing, M. F. (2006). Design and statistical methods in studies using animal models of development. *ILAR J.* 47, 5–14. doi: 10.1093/ilar.47.1.5
- Forster, K. M., Hartwig, D. D., Seixas, F. K., McBride, A. J. A., Monte, L. G., Recuero, A. L. C., et al. (2013). Characterization of a virulent *Leptospira interrogans* strain isolated from an abandoned swimming pool. *Braz. J. Microbiol.* 44, 165–170. doi: 10.1590/S1517-83822013005000029
- Forwell, M. A., Redding, P. J., and Brodie, M. J. (1984). Leptospirosis complicated by fatal intracerebral haemorrhage. *Br. Med. J.* 289:1583.
- Fouts, D. E., Matthias, M. A., Adhikarla, H., Adler, B., Amorim-Santos, L., Berg, D. E., et al. (2016). What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004403. doi: 10.1371/journal.pntd.0004403
- Fujita, R., Koizumi, N., Sugiyama, H., Tomizawa, R., Sato, R., and Ohnishi, M. (2015). Comparison of bacterial burden and cytokine gene expression in golden hamsters in early phase of infection with two different strains of *Leptospira interrogans*. *PLoS One* 10:e0132694. doi: 10.1371/journal.pone.0132694
- Gomard, Y., Dietrich, M., Wieseke, N., Ramasindrazana, B., Lagadec, E., Goodman, S. M., et al. (2016). Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic *Leptospira* suggesting notable host-specificity patterns. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92:fiw037. doi: 10.1093/femsec/fiw037
- Gomes, C. K., Guedes, M., Potula, H. H., Dellagostin, O. A., and Gomes-Solecki, M. (2018). Sex matters: male hamsters are more susceptible to lethal infection with lower doses of pathogenic *Leptospira* than female hamsters. *Infect. Immun.* 86:e00369-18. doi: 10.1128/IAI.00369-18
- Guernier, V., Lagadec, E., Cordonin, C., Le Minter, G., Gomard, Y., Pagès, F., et al. (2016). Human leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: are rodents the (only) ones to blame? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004733. doi: 10.1371/journal.pntd.0004733
- Haake, D. A. (2006). "Hamster model of leptospirosis" in *Current protocols in microbiology*. Chapter 12, Unit 12E.2.
- Lagadec, E., Gomard, Y., Guernier, V., Dietrich, M., Pascalis, H., Temmam, S., et al. (2012). Pathogenic *Leptospira* spp. in bats, Madagascar and Union of the Comoros. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1696–1698. doi: 10.3201/eid1810.111898
- Lagadec, E., Gomard, Y., Le Minter, G., Cordonin, C., Cardinale, E., Ramasindrazana, B., et al. (2016). Identification of *Tenrec ecaudatus*, a wild mammal introduced to Mayotte Island, as a reservoir of the newly identified human pathogenic *Leptospira mayottensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0004933. doi: 10.1371/journal.pntd.0004933
- Lebarbenchon, C., Ramasindrazana, B., Joffrin, L., Bos, S., Lagadec, E., Le Minter, G., et al. (2017). Astroviruses in bats, Madagascar. *Emerg. Microbes Infect.* 6:e58. doi: 10.1038/emi.2017.47
- Lehmann, J., Matthias, M., Vinetz, J., and Fouts, D. (2014). Leptospirosis pathogenomics. *Pathogens* 3, 280–308. doi: 10.3390/pathogens3020280
- Lourdault, K., Aviat, F., and Picardeau, M. (2009). Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 58, 648–655. doi: 10.1099/jmm.0.008169-0

- Marinho, M., Oliveira-Júnior, I. S., Monteiro, C. M. R., Perri, S. H., and Salomão, R. (2009). Pulmonary disease in hamsters infected with *Leptospira interrogans*: histopathologic findings and cytokine mRNA expressions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 832–836. doi: 10.4269/ajtmh.2009.80.832
- Matsui, M., Roche, L., Soupé-Gilbert, M.-E., Roudier, M., Moniquet, V., and Goarant, C. (2015). Experimental hamster infection with a strain of *Leptospira borgpetersenii* Ballum isolated from a reservoir mouse in New Caledonia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92, 982–985. doi: 10.4269/ajtmh.14-0462
- Nally, J. E., Chantranuwat, C., Wu, X. Y., Fishbein, M. C., Pereira, M. M., Pereira Da Silva, J. J., et al. (2004). Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am. J. Pathol.* 164, 1115–1127. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63198-7
- Nascimento, A. L. T. O., Verjovski-Almeida, S., Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Digiampietri, L. A., et al. (2004). Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 459–478. doi: 10.1590/S0100-879X2004000400003
- Pagès, F., Collet, L., Henry, S., Margueron, T., Achirafi, A., Bourhy, P., et al. (2017). Leptospirosis in Mayotte: contribution of epidemiological surveillance, 2008–2015. *Bull. Épidémiologique Hebdomadaire* 8–9, 147–156.
- Panicker, J., Mammachan, R., and Jayakumar, R. V. (2001). Primary neuroleptospirosis. *Postgrad. Med. J.* 77, 589–590. doi: 10.1136/pmj.77.911.589
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., and Akritidis, N. (2008). The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 351–357. doi: 10.1016/j.ijid.2007.09.011
- Patra, K. P., Choudhury, B., Matthias, M. M., Baga, S., Bandyopadhyay, K., and Vinetz, J. M. (2015). Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic *Leptospira* species. *BMC Microbiol.* 15:244. doi: 10.1186/s12866-015-0581-7
- Reed, N. E., Varney, W. C., Goddard, R. D., and Wyeth, P. J. (2000). The maintenance of challenge strains used in the potency test for canine *Leptospira* vaccines. *Biologicals* 28, 25–28. doi: 10.1006/biol.1999.0235
- Reis, E. A. G., Hagan, J. E., Ribeiro, G. S., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Montgomery, R. R., et al. (2013). Cytokine response signatures in disease progression and development of severe clinical outcomes for leptospirosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2457. doi: 10.1371/journal.pntd.0002457
- RStudio Team. (2015). RStudio: integrated development for R.
- Samir, A., and Wasfy, M. O. (2013). A simple technique for long-term preservation of leptospires. *J. Basic Microbiol.* 53, 299–301. doi: 10.1002/jobm.201100551
- Silva, É. F., Santos, C. S., Athanazio, D. A., Seyffert, N., Seixas, F. K., Cerqueira, G. M., et al. (2008). Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine* 26, 3892–3896. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.085
- Simbizi, V., Saulze, M. N., Potts, A., Lötter, C., and Gummow, B. (2016). A study of leptospirosis in South African horses and associated risk factors. *Prev. Vet. Med.* 134, 6–15. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.09.019
- Smythe, L. D., Smith, I. L., Smith, G. A., Dohnt, M. F., Symonds, M. L., Barnett, L. J., et al. (2002). A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect. Dis.* 2:13. doi: 10.1186/1471-2334-2-13
- Subiros, M., Collet, L., Pagès, F., Aboubacar, A., Ruello, M., Bourhy, P., et al. (2017). Outbreak of leptospirosis in an endemic French territory, Mayotte, 2016. *Bull. épidémiologique Hebdomadaire* 24–25, 529–536.
- Tomizawa, R., Sugiyama, H., Sato, R., Ohnishi, M., and Koizumi, N. (2017). Male-specific pulmonary hemorrhage and cytokine gene expression in golden hamster in early-phase *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis infection. *Microb. Pathog.* 111, 33–40. doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.016
- Tucunduva de Faria, M., Athanazio, D. A., Gonçalves Ramos, E. A., Silva, E. F., Reis, M. G., and Ko, A. I. (2007). Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J. Comp. Pathol.* 137, 231–238. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.08.001
- Vijayachari, P., Sugunan, A. P., and Shriram, A. N. (2008). Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J. Biosci.* 33, 557–569. doi: 10.1007/s12038-008-0074-z
- Villanueva, S. Y. A. M., Saito, M., Tsutsumi, Y., Segawa, T., Baterna, R. A., Chakraborty, A., et al. (2014). High virulence in hamsters of four dominant *Leptospira* serovars isolated from rats in the Philippine. *Microbiology* 160, 418–428. doi: 10.1099/mic.0.072439-0
- Wunder, E. A., Figueira, C. P., Santos, G. R., Lourdault, K., Matthias, M. A., Vinetz, J. M., et al. (2016). Real-time PCR reveals rapid dissemination of *Leptospira interrogans* after intraperitoneal and conjunctival inoculation of hamsters. *Infect. Immun.* 84, 2105–2115. doi: 10.1128/IAI.00094-16
- Zhang, Y., Lou, X. L., Yang, H. L., Guo, X. K., Zhang, X. Y., He, P., et al. (2012). Establishment of a leptospirosis model in guinea pigs using an epicutaneous inoculations route. *BMC Infect. Dis.* 12:20. doi: 10.1186/1471-2334-12-20
- Zuerner, R. L., Alt, D. P., and Palmer, M. V. (2012). Development of chronic and acute golden Syrian hamster infection models with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Vet. Pathol.* 49, 403–411. doi: 10.1177/0300985811409252

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

Copyright © 2019 Cordonin, Turpin, Bascands, Dellagi, Mavingui, Tortosa and Roche. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.