



Dynamique des réponses immunitaires humaines dans un modèle 3D de foie : un autre regard sur la pathogénèse hépatique du virus de la fièvre jaune

Nicolas Massé-Deragon

► To cite this version:

Nicolas Massé-Deragon. Dynamique des réponses immunitaires humaines dans un modèle 3D de foie : un autre regard sur la pathogénèse hépatique du virus de la fièvre jaune. Virologie. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1270 . tel-01664950

HAL Id: tel-01664950

<https://theses.hal.science/tel-01664950v1>

Submitted on 15 Dec 2017

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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1270

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° accréditation

Biologie moléculaire intégrative et cellulaire

Spécialité de doctorat : Virologie

Soutenue publiquement le 14 Décembre 2016, par :

Nicolas Massé-Deragon

Dynamique des réponses immunitaires humaines dans un modèle 3D de foie : un autre regard sur la pathogénèse hépatique du virus de la fièvre jaune

Devant le jury composé de :

Monsieur le Pr Bruno LINA, UCB Lyon1, Président du Jury

Monsieur le Dr Ali Amara, INSERM U944 Paris, Rapporteur

Monsieur le Pr Stéphane PAUL, Hôpital Nord St-Etienne, Rapporteur

Madame la Dr Isabelle DIMIER-POISSON, UFR Sc. Ph Tours, Examinatrice

Madame la Dr Catherine LEGRAS-LACHUER, UCBL1 (Co-directrice)

Madame la Docteure Véronique BARBAN, Sanofi Pasteur (Directrice)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire
Vice-président de la Commission Recherche
Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID
M. le Professeur Didier REVEL
M. le Professeur Philippe CHEVALIER
M. Fabrice VALLÉE
M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux
Faculté d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Directeur : M. X. PERROT
Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies
Département Biologie
Département Chimie Biochimie
Département GEP
Département Informatique
Département Mathématiques
Département Mécanique
Département Physique
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon
Polytech Lyon
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI
Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Directeur : Mme C. FELIX
Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
Directeur : M. Y. VANPOULLE
Directeur : M. B. GUIDERDONI
Directeur : M. le Professeur E. PERRIN
Directeur : M. G. PIGNAULT
Directeur : M. le Professeur C. VITON
Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Directeur : M. N. LEBOISNE

Une pensée...

Je te dédie ce mémoire et ces temps passés.

Tu m'as tout donné.

Tu m'as tant donné.

J'y suis arrivé.

Sommaire

Liste des Figures	9
Remerciements	11
Abbréviations	Erreur ! Signet non défini.
I. PARTIE I : La Fièvre Jaune	15
A. Historique de la fièvre jaune	15
B. Epidémiologie	16
1. Distribution géographique	17
2. Incidence	18
3. Cycle écologique	20
C. Agent étiologique : le virus de la fièvre jaune	22
1. Classification et structure	22
2. Génome viral	24
3. Cycle viral des flavivirus	29
D. Pathologie	34
1. Diagnostic de la pathologie	36
1. Pathogénèse	37
2. Réponse immunitaire suite à l'infection	40
II. PARTIE II : Le Foie	43
A. Structure et organization du foie	43
1. Fonctions	45
2. Différenciation hépatocytaire	45
3. Le métabolisme hépatique	46
B. La réponse immunitaire dans le foie	48
1. Détection des pathogènes	48
2. Les acteurs cellulaires de la réponse immunitaire hépatique	49

C.	La tolérance hépatique.....	52
D.	Les modèles d'étude pour le foie	55
III.	PARTIE III : Vaccin contre le virus de la fièvre jaune	59
A.	Traitements existants	59
B.	Historique du vaccin	60
1.	Marqueurs de l'atténuation	60
2.	Modèles animaux	63
3.	Vaccins commerciaux	64
4.	Effets secondaires de la vaccination	66
C.	La réponse immunitaire à la vaccination.....	69
1.	Anticorps neutralisants	69
2.	Réponses cellulaires	70
3.	Réponse innée.....	70
IV.	Objectifs du travail de thèse.....	75
V.	Matériel et Méthodes	79
A.	Virus et modèles cellulaires.....	79
1.	Virus de la fièvre jaune	79
2.	Modèle 2D : hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines.....	79
3.	Modèle 3D : co-culture entre hépatocytes et cellules de Kupffer primaires.....	79
B.	Analyse transcriptomique	81
1.	PCR array	81
C.	Microscopie électronique.....	83
D.	Immunofluorescence.....	84
VI.	Résultats	87
A.	ETUDE N°1 : Etude de la dynamique des réponses immunitaires contre les souches sauvages et vaccinales du virus de la fièvre jaune dans un modèle <i>in vitro</i> d'hépatocytes dérivés de cellules souches humaines	87
1.	Problématique.....	88
2.	Principales observations de l'étude	89
3.	Etude (Under review Plos neglected disease_23 Septembre 2016)	91
B.	Etude N°2 : Comparaison des méthodes de normalisation appliquées aux données de séquençage de l'ARN.....	137

1.	Problématique.....	138
1.	Analyse transcriptomique par séquençage.....	138
2.	Principales observations de l'étude	140
3.	Etude (submitted_24 Novembre 2016).....	142
C.	Etude N°3 : Mise en place d'un modèle organotypique de foie humain pour étudier les paramètres immunitaires et métaboliques régulés par les souches sauvages et de bases vaccinales du virus de la fièvre jaune	169
1.	Problématique.....	170
2.	Principales observations de l'étude	174
3.	Etude (Soumission Q1 2017)	176
VII.	DISCUSSION	211
VIII.	Conclusion	225
IX.	Perspectives.....	227
X.	Bibliographie.....	233
	Résumé de la thèse	259
	Summary	259

Liste des Figures

Figure 1. Répartition géographique des zones endémiques de la fièvre jaune.....	17
Figure 2. Cycles écologiques du virus de la fièvre jaune.....	21
Figure 3. Particule du virus de la fièvre jaune.....	23
Figure 4. Génome viral.....	24
Figure 5. Cycle réplcatif du virus de la fièvre jaune.....	30
Figure 6. Evolution de la pathologie Clinique.....	34
Figure 7. Cinétique de la réponse immunitaire suite à l'infection par le virus de la fièvre jaune.....	41
Figure 8. Architecture hépatique.....	43
Figure 9. Différentes étapes du métabolisme hépatique.....	48
Figure 10. Réponse immunitaire dans le foie : homéostasie versus inflammation et infection du tissu hépatique.....	50
Figure 11. « Système gravity drop ».....	57
Figure 12. Mutations en acides aminés entre la souche YFV Asibi et la souche YFV 17D.....	61
Figure 13. Historique de passages de la souche 17D-204 utilisée par les différents fabricants de vaccins.....	65
Figure 14. Réponse immunitaire suite à la vaccination.....	71
Figure 15. Principe du Séquençage par synthèse.....	139
Figure 16. Observation de l'architecture des microtissus hépatiques par microscopie électronique.....	171
Figure 17. Détection de canalicules biliaires dans les microtissus hépatiques.....	172
Figure 18. Impact de la dexaméthasone sur l'induction des réponses antivirales.....	173

Remerciements

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d'une collaboration entre Sanofi Pasteur (Marcy l'Etoile) et la plateforme ViroScan3D.

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse...

Je tiens à remercier spécialement ma directrice de thèse, Dr Véronique BARBAN (Sanofi Pasteur). Merci à toi pour ton aide, ton écoute, ton soutien et tes conseils tout au long de ces 4 années. J'ai tellement appris que je ne saurai pas par où commencer. Pour tout cela et bien plus encore, un immense merci.

Je tiens également à remercier ma seconde directrice de thèse, Dr Catherine LEGRAS-LACHUER (Viroscan3D). Merci à toi pour ta disponibilité et ton écoute sur cette thèse. Merci d'avoir su répondre présente aux moments importants avec gentillesse et bienveillance.

Je remercie particulièrement le Pr Bruno LINA pour avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury de soutenance.

Je remercie également le Pr Isabelle DIMIER-POISSON pour avoir accepté de juger ce travail mais également pour la qualité de la formation fournie au cours de mon cursus.

J'adresse de sincères remerciements aux Pr Stéphane PAUL et Pr Ali AMARA pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, leurs conseils et leur compréhension.

J'adresse également mes sentiments respectueux aux membres du comité de pilotage de mon doctorat. En particulier le Pr Eve-Isabelle PECHEUR pour ses conseils sur les modèles hépatiques et les techniques d'immunomarquage. Mais également les Pr Branka HORVAT, Pr Dimitri LAVILETTE et Pr Joel LACHUER pour leurs conseils avisés et bienveillants.

Je tiens à remercier Dr Marion DECOSSAS (UMR 5248- Bordeaux, France), Dr Simon MESSNER (InSphero AG - Suisse) pour leur collaboration.

Je remercie tous les collaborateurs de Sanofi Pasteur, pour leur accueil, leur aide quotidienne, leur bienveillance.

En particulier je remercie Dr Bachra ROKBI pour son aide et ses conseils tout au long de ces 4 années. Tu as su trouver les mots justes pour m'orienter sur les bons choix. Merci à toi.

Merci également au Dr Daniel LAROCQUE pour son aide et son implication rapide dans mon travail. Merci également pour ta bonne humeur et tes leçons de tennis !

Merci à Fabienne PIRAS, Dr Virginie COURTOIS, Dr Frédérique GEOFFROY, Dr Laurence QUEMENEUR, David PONCET, Dr Isabelle LEGASTELOIS, Dr Nadège ARNAUD-BARBE, Dr Emilie CHAUTARD, Dr Yves Girerd-Chambaz pour leur aide et leurs conseils.

Merci à Sabine CLAYETTE, Delphine RIBON et Sylvie MICHEL pour leur soutien au quotidien.

Merci à Franck NARBONNET et toute son équipe.

Un immense merci à Nathalie MANTEL pour son accueil, le stage proposé et l'accompagnement sur les débuts de cette thèse. Merci pour tes conseils et m'avoir permis de travailler avec ta superbe équipe. Merci à vous tous, Alix JOUFFRET, Marion AGUIRRE, Maryline BOUTEILLE, Elisabeth MARION, Sandrine RAYNAUD, Jérémy PONTVIANNE, Florine GUILLAUME, Emilie VENTURA pour votre bonne humeur, votre soutien infaillible dans tous les moments difficiles et pour tous les moments qu'ils nous restent à passer ensemble.

Merci à toute l'équipe de ViroScan3D pour leur aide au milieu de toutes ces données. Merci en particulier au Dr Magali ROCHE pour son suivi et son écoute sur l'ensemble du projet.

Merci à Marie Guinier et Anne NGUYEN pour la réalisation des séquençages. Un grand merci à Clément DELESTRE, Camille MARMAI et Anthony BESSE pour les analyses bio-informatiques.

Un immense merci à tous mes amis, pour leur aide, leur soutien, leurs sourires, leurs vacheries. Rémy, Julie, Rémi, Charlotte, Margaux et Gautier. Maxou et Mel, Céline, Ori, Maelle, Alexandra. Marine, Matthieu, Claire la mèche et Jérôme, Claire Bowie et ma Mamane. Vous êtes au top. Valou, Jeanet, Fabien, Jojo, Amaël, Justine, Btissame ma soeurette et toute sa famille... j'en oublie pleins. Merci, Merci et encore merci.

Merci à ma famille qui a su être là dans ces moments, les plus récents et difficiles mais avant tout les plus agréables passés et à venir. A mes frangins, à ma tante et mes grands-parents.

A toi Maman...

Abréviations

Aa : acide aminé
Ac : anticorps
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ALT : Alanine Aminotransférase
ARN : Acide RiboNucléique
AST : Aspartate Transaminase
Cm : centimètre
CMH-I : Complexe d'Histo-Compatibilité type I
CT : Cycle Threshold
CYP450 : Cytochrome P450
DMSO : Diméthylsulfoxyde
D.O : Densité Optique
ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Geq: Genome Equivalent
GRO: Growth-related Oncogene
GST: glutathione-S-Transférases
h: heure
hESC: human Embryonic Stem Cells
HRP: Horseradish Peroxidase
IFN : interféron
IL : interleukine
JEV: Japanese Encephalitis Virus
kb : kilo base
µg : microgramme
MIF : Macrophage migration Inhibitory factor
µl : microlitre
ml : millilitre
M.O.I. : Multiplicity Of Infection
NK : Natural killer cell

Nm : nanomètre
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCRD : Preclinical Research & Development
PFU : Plaque Forming Units
qRT-PCR : quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RANTES : Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RE : Réticulum Endoplasmique
R&D : Recherche et Développement
Rpm : rotation par minute
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TGF-β : Tumor Growth Factor- β
TNF : Tumor Necrosis Factor
UI : Unité Internationale
VLP : Virus-Like Particles
WNV : West Nile Virus
YF : Yellow Fever
CMV : cytomégalovirus
HCV : virus de l'hépatite C
HBV : virus de l'hépatite B
RPKM : Read per kilobase per million of mapped reads
RUV : Remove unwanted variation
SNP : Single nucleotide polymorphism
HNF : Hepatic nuclear factor

I. PARTIE I : La Fièvre Jaune

A. Historique de la fièvre jaune

La fièvre jaune est une maladie tropicale virale, causée par le virus de la fièvre jaune et associée à des épidémies majeures en Afrique sub-saharienne et en Amérique du Sud. Les premières apparitions de cette pathologie sont difficiles à déterminer. L'utilisation du terme « fièvre jaune » remonte à 1750, lors d'une épidémie sur les îles Barbades. En se basant sur les descriptions cliniques et épidémiologiques trouvées dans de vieux manuscrits, Carter estima que la première épidémie pouvant être attribuée au virus de la fièvre jaune aurait eu lieu sur la péninsule du Yucatan au Mexique en 1648. Cette introduction historique en Amérique latine est associée à la traite des esclaves qui a de fait indéniablement contribué à l'expansion de la pathologie. Au XVIII^{ème}, l'augmentation des transports maritimes d'esclaves et de marchandises augmenta la problématique et résulta en de multiples introductions en Europe et aux Etats-Unis. La multiplication des épidémies eut un impact humain et économique très importants. Ainsi une épidémie dans la vallée du Mississippi causa la mort de près de 13000 personnes en 1878 et la construction du canal de Panama au Mexique en 1889 fut fortement ralentie par des épidémies successives qui décimaient les ouvriers [1]. Longtemps associée aux « miasmes » provenant des matières organiques d'origines végétales et/ou animales, la transmission de la pathologie par le moustique *Aedes aegypti* fut établie par le médecin Carlos Finlay en 1881. Vingt années plus tard, Walter Reed confirma ces observations sur des adultes volontaires dont près de 80% d'entre eux moururent. Dans le même temps, Reed démontra que l'agent infectieux était capable de traverser le filtre de Berkefeld, distinguant ainsi le virus des bactéries, classiquement retenues dans ce filtre [2].

La Fièvre jaune avait donc pour origine un agent dit filtrant, le premier virus décrit comme pathogène pour l'homme.

La découverte du mode de transmission limita drastiquement les épidémies urbaines aux Etats-Unis, en Amérique Centrale et même en Afrique de l'Ouest. Un contrôle des gîtes larvaires du moustique urbain *Aedes aegypti* fut ainsi mis en place conduisant à la disparition du virus de l'île de Cuba en 1901. La Nouvelle Orléans connut sa dernière épidémie en 1905 avec 8399 cas recensés et 908 morts et la construction du canal de Panama fut achevée en 1914.

En 1925, le singe, d'ores et déjà identifié comme hôte, fut utilisé pour l'identification du pathogène. La première souche virale fut isolée le 30 juin 1927. Le sang d'un patient, appelé Asibi, obtenu 33 heures après le pic de fièvre fut inoculé à un singe rhésus au laboratoire de recherche d'Accra. Des signes pathologiques et une atteinte hépatique furent observés après 4 jours. Un deuxième singe fut inoculé avec le sang du premier et présenta les mêmes signes. Par la suite Stokes *et al.* ont établi la souche Asibi par passages directs sur singes et indirects sur les moustiques *Aedes aegypti* [3]. Parallèlement, une souche fut isolée à l'institut Pasteur de Dakar à partir d'un patient syrien. Les deux souches, bien que d'origines différentes présentent une homologie de 99,8% avec seulement 23 nucléotides et 9 acides aminés variants [4]. Ces isollements sont à l'origine de développements vaccinaux initiés dans différents pays comme l'Angleterre, les Etats-Unis, ou encore le Brésil.

B. Epidémiologie

La fièvre jaune est une zoonose, maintenue à l'état sauvage par des transmissions entre les primates non humains et des moustiques diurnes du genre *Haemagogus* spp. en Amérique et *Aedes* spp. en Afrique. Dans ce contexte les humains ne sont exposés que ponctuellement à cette forme. Au niveau de la savane africaine, les gîtes larvaires sont plus importants et sont impliqués dans des transmissions endémiques et épidémiques entre le singe et l'homme (cycle intermédiaire) et entre hommes (cycle urbain). Le moustique, dit « domestique », *Aedes aegypti*, se développe massivement dans les zones péri-urbaines et est le principal vecteur des épidémies intra-humaines.

1. Distribution géographique

Les zones endémiques de la maladie se trouvent en Amérique du Sud et en Afrique sub-saharienne (Figure 1).

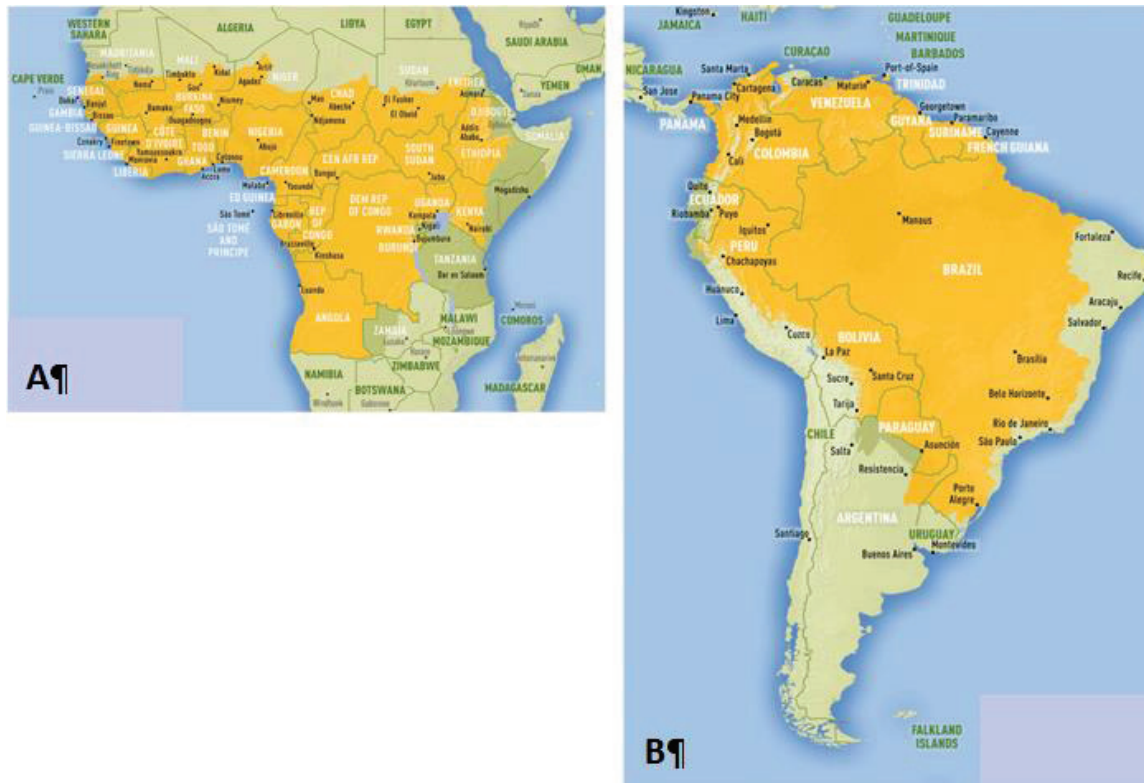


Figure 1. Répartition géographique des zones endémiques de la fièvre jaune.

Ces zones sont définies en fonction des recommandations liées à la vaccination. Vaccination recommandée (jaune) ; vaccination suggérée (vert foncé) ; vaccination non recommandée (vert clair). **A.** Répartition des zones endémiques en Afrique subsaharienne en 2015. **B.** Répartition des zones endémiques en Amérique du Sud en 2014.

Adapté de <http://www.cdc.gov/yellowfever/maps.html>

Si les premières cartes définissant les zones endémiques datent des années 1930, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) organise depuis 2008 le rassemblement d'experts autour de données épidémiologiques afin d'établir une carte des zones à risques et ainsi orienter les politiques locales et les

consignes de vaccination pour le voyageur. Bien que limitées par les sous informations et l'ancienneté des données, ces cartes permettent d'avoir une vue globale des points sensibles.

Les régions avec les plus forts risques de transmission se situent en Amérique, incluant les zones côtières et les villes intérieures infestées par le vecteur en Argentine, au Brésil, au Pérou, en Bolivie, en Colombie, en Equateur, au Venezuela, la Guyane, le Mexique et le sud des Etats-Unis. Toutes ces villes ont été ou sont affectées par la Fièvre jaune et représentent en parallèle une zone à risque pour la transmission d'un autre flavivirus, le virus de la dengue.

Le risque de réémergence des formes urbaines de la Fièvre jaune augmente constamment du fait de l'urbanisation croissante, des mouvements de populations et de l'expansion des zones de développement du vecteur *Aedes aegypti*. Enfin l'absence du virus des zones asiatiques, indiennes et océaniques s'expliquent à la fois par des facteurs démographiques et biologiques ou encore par la présence d'autres flavivirus et la plus faible compétence des moustiques vecteurs présents dans ces zones pour la transmission du virus de la fièvre jaune [5–7].

Compte tenu de la large répartition du virus, la variabilité génétique des souches est un facteur critique dans le développement d'un vaccin. Après séquençage d'une multitude de souches d'origines différentes, seulement 7 génotypes différents ont été identifiés. Parmi ces génotypes, 5 sont identifiés en Afrique et seulement 2 en Amérique [8–10]. Cette faible variabilité est également retrouvée pour d'autres arbovirus, et expliquée par l'impact du génome dans la réplication chez le moustique et les transmissions inter-espèces [11].

2. Incidence

Entre 1985 et 2009, 31455 cas et 8108 décès ont été reportés par OMS. Ces chiffres masquent une grande disparité avec une variation du nombre de cas reportés selon les années et une forte augmentation des reports entre 1986 et 1995.

En Afrique, le taux de mortalité atteint près de 22% soit 6090 cas sur les 27467 reportés sur cette période. Ces taux sont cependant sous-estimés en raison du manque d'informations sur les personnes décédées. Selon les régions, les proches de victimes retirent les patients du cadre hospitalier si bien que l'évolution de la maladie n'est pas connue des autorités de santé. En se basant sur les estimations, l'incidence annuelle dans ces régions a pu être déterminée. Elle est en moyenne de 14.4 cas pour 100000 habitants [12].

En Amérique du Sud, la fièvre jaune se retrouve en Amazonie. Entre 1985 et 2009, 3988 cas et 2287 décès ont été reportés pour un taux de mortalité de 57%. Néanmoins l'incidence annuelle n'est qu'en moyenne de 2,1 cas pour 100000 habitants. La différence d'incidence entre les deux régions affectées s'explique à la fois par des facteurs écologiques (présence du vecteur, densités de populations primates et humains) ou par la couverture vaccinale. En revanche les plus forts taux de létalité en Amérique du Sud s'expliquent par des souches plus virulentes, une susceptibilité des races aux formes létales [13] et encore une fois par une sous-estimation des cas en Afrique sub-saharienne [12].

Depuis 1985, une importance série d'épidémies ont été décrites en Afrique, en particulier au Sénégal (1995-1996, 2002-2003, 2006) au Libéria (1995, 1998, 2000-2001, 2004), au Soudan (2003, 2005), en Ouganda (2010) et au Congo (2014). La province soudanaise du Darfour a connu en 2012 une des plus graves épidémies des dernières décennies. En Amérique du Sud, les épidémies ont été recensées au Brésil (2007-2009), au Pérou (1995), en Colombie ou encore au Venezuela [14,15].

Outre les populations locales, les voyageurs et travailleurs internationaux sont également sujets aux infections par le virus de la Fièvre jaune. La majorité des cas répertoriés concerne des voyageurs non vaccinés et ayant séjourné en zone endémique. En Novembre 2001, une touriste belge de 47 ans, en séjour en Gambie, est décédée des suites d'une infection [16]. Le décès d'un Nord-Américain de retour d'un séjour sur le Rio Negro fut déclaré en mars 2002 dans un hôpital du Texas (non publié). En se basant

sur les estimations et les incidences décrites plus haut, le risque d'être infecté par le virus de la Fièvre jaune lors d'un voyage de deux semaines en zone endémique est de 1 cas pour 267 alors que le décès ne surviendrait que dans 1 cas pour 1333 [17].

3. Cycle écologique

La fièvre jaune est transmise à son hôte par la pique d'un moustique infecté dans le cadre d'une transmission dite « horizontale ». Le moustique peut également transmettre le virus à ses larves et on parlera alors de transmission « verticale ».

De nombreuses espèces de singes sont sensibles à l'infection par le virus de la Fièvre jaune [18,19]. La transmission entre le singe et le moustique, dite enzootique, est responsable du maintien des foyers infectieux dans les zones endémiques et de la description d'un grand nombre d'épidémies chez l'animal. Les moustiques impliqués dans cette transmission sont principalement *Aedes Africanus* pour l'Afrique et des moustiques du genre *Haemagogus* et *Sabethes* en Amérique du Sud. Par ailleurs l'immunisation naturelle des singes infectés et le fort taux de mortalité dans ces espèces explique le caractère cyclique de l'apparition des épidémies de Fièvre jaune. Enfin l'urbanisation accélérée et les déforestations importantes réduisent considérablement les populations de singes et font de l'homme l'hôte principal dans les cycles de transmission [20].

La transmission à l'homme se fait dans le cadre d'un cycle intermédiaire ou sylvatique qui implique différentes espèces du genre *Aedes* qui transmettent le virus au singe ou à l'homme. Ce cycle n'a jamais été décrit en Amérique du Sud (Figure 2A) et n'est observable en Afrique que dans les zones de savane humide, occasionnant quelques épidémies locales (Figure 2B).

Figure 2. Cycles écologiques du virus de la fièvre jaune.

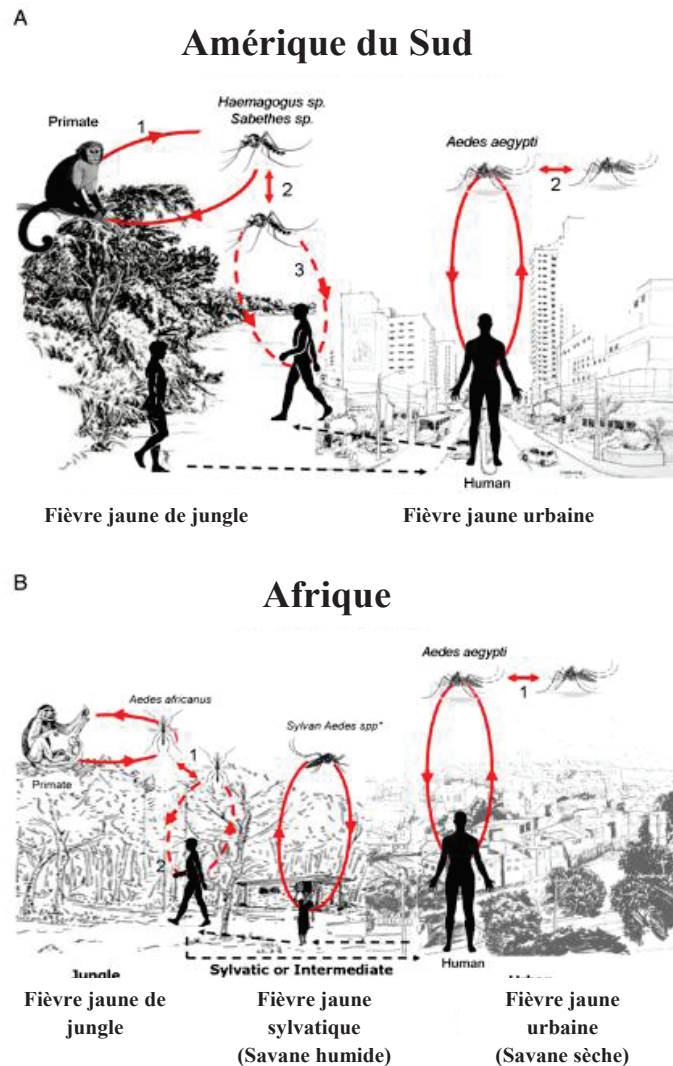


Figure adaptée de [21]

Enfin, le cycle urbain assure la transmission du virus d'un homme à un autre. Ce cycle est assuré le plus souvent par le moustique du genre *Aedes aegypti*, et nécessite l'introduction du virus dans les zones urbaines par des hommes ayant voyagé en zone endémique. Compte-tenu des densités de populations humaines et vectorielles, ce cycle est source d'épidémies massives.

En Amérique, en raison du contrôle important des vecteurs, la dernière épidémie de Fièvre jaune urbaine date de 1942, au Brésil [22]. Depuis, quelques cas de transmission par le moustique *Aedes aegypti* ont été répertoriés [23]. Les cas répertoriés sont donc associés à des travailleurs des zones forestières et une transmission par le moustique du genre *Haemagogus*.

En parallèle des cycles naturels de transmission, des contaminations du personnel hospitalier et des chercheurs ont régulièrement été décrites. Les phases de contact avec du sang de patients récemment infectés, les accidents d'injection ou la pique de moustiques infectés en laboratoire sont à l'origine de ces infections [24]. Les contaminations par les urines ou les excréments ne sont pas suspectées en raison de charges virales trop faibles ou non détectables.

C. Agent étiologique : le virus de la fièvre jaune

1. Classification et structure

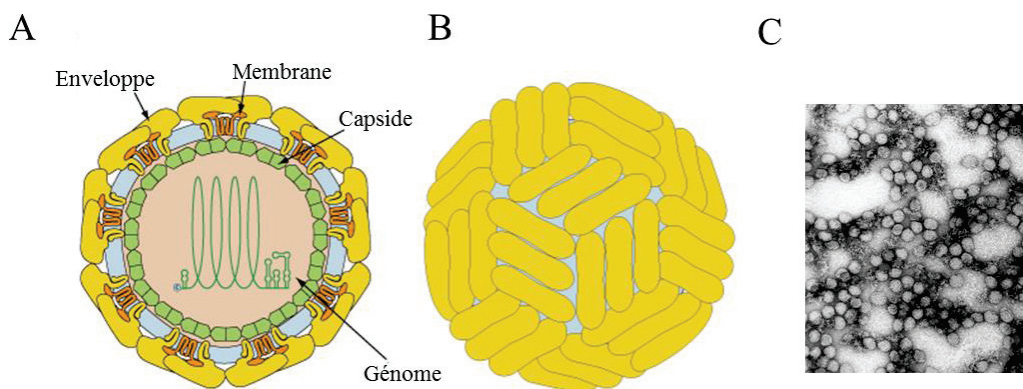
Classé depuis 1985 dans la famille des *Flaviviridae*, le virus de la Fièvre jaune est le prototype du genre flavivirus [25]. Cette famille englobe par ailleurs deux autres genres : les pestivirus et les hépacivirus (comme le virus de l'hépatite C). Ce regroupement s'effectuant principalement en raison des similitudes morphologiques, génomiques et répliquatives [26]. A l'instar du virus de la Fièvre jaune, de nombreux flavivirus sont des arbovirus, c'est-à-dire transmis à leurs hôtes par des insectes vecteurs, comme les tiques ou les moustiques, chroniquement infectés par le pathogène. Quelques rares flavivirus ont néanmoins été isolés de rongeurs ou de chauve-souris sans que la transmission par les arthropodes n'ait pu être établie.

Sur les 68 flavivirus décrits, plus de 40 sont associés à une pathologie humaine [27]. Parmi eux, on retrouve les virus de l'encéphalite japonaise (JEV), de l'encéphalite à tique (TBE), de l'encéphalite de Saint Louis (SLE), du West Nile (WNV) ou encore de la dengue (DENV). Ils ont été classés en différents « groupes » ou « complexes sérologiques » en fonction de leur réactivité sérologique (test de

neutralisation et d'héماغglutination) [28]. Le virus de la Fièvre jaune était connu comme le seul membre du complexe sérologique Fièvre jaune jusqu'à une série d'études phylogénétiques permettant d'intégrer certains virus dans un groupe dit « génétique » sans qu'aucune forme fatale de pathologies n'aient été reportées [26].

Le virus de la Fièvre jaune est un virus sphérique de 40 à 60 nm de diamètre. Le génome viral est un ARN simple brin non segmenté de polarité positive. Un ensemble de protéines de capsid (C) interagit et protège cet ARN par formation d'une nucléocapside. Le complexe nucléocapsidique est recouvert d'une double couche lipidique issue des membranes du réticulum endoplasmique de la cellule hôte dans laquelle sont ancrées les protéines d'enveloppe (E) et de membrane (M) du virus (Figure 3). La surface externe des virions est recouverte de 90 dimères de glycoprotéines E en agencement icosaédrique [29]. De par leur organisation structurale, ces virus sont très sensibles à de nombreux traitements tels que des solvants lipidiques, des détergents, et peuvent être inactivés par différents traitement chimiques, par la chaleur ou par rayon ultraviolet (UV) ou γ .

Figure 3. Particule du virus de la fièvre jaune



A. Schéma du virion. **B.** Représentation tridimensionnelle de l'enveloppe virale. **C.** Particules virales observées par microscopie électronique à transmission.

Figures adaptées de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html

2. Génome viral

Le génome, est un ARN monocaténaire de 10862 nucléotides (nt) et de polarité positive. Il est composé d'une coiffe de type I (m⁷GpppAmp) en extrémité 5', suivie d'une courte région non codante en 5' (100 nt), puis d'un unique cadre ouvert de lecture de 10233 nt et enfin d'une région non codante en 3' (500 nt) dépourvue de séquence poly-adenylée [25,30]. La partie traduite du génome code pour 3 protéines structurales : la capside (C), la membrane (M, exprimée sous la forme d'un précurseur prM) et l'enveloppe (E). Par ailleurs, 7 protéines non-structurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b et NS5) essentielles à la réplication virale sont codées par le reste du génome (Figure 4).

24

Figure 4. Génome viral.

GENOME

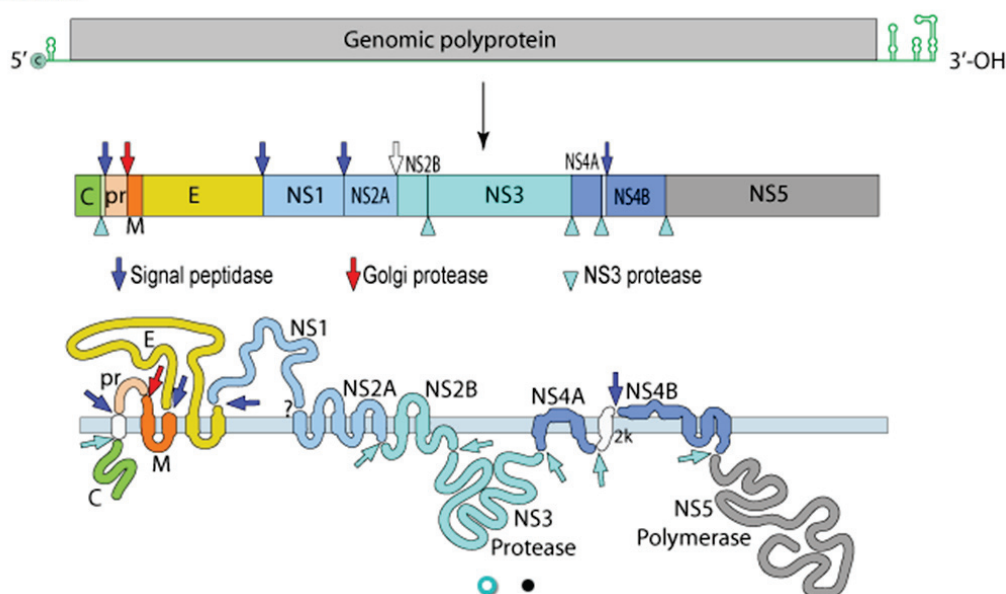


Figure issue de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/24.html

Les deux régions non-codantes, bien que variables, présentent des séquences répétées et des structures secondaires conservées entre les flavivirus. Ces éléments ont des rôles variés, certains étant décrits comme essentiels dans les phases de réplication, de traduction et d'assemblage du virus et peuvent expliquer les variabilités de souches et parfois même de virulence observées sur différentes zones endémiques [31–33].

a) Protéines structurales

Ces protéines sont au nombre de 3 et font partie intégrante de la structure des particules virales des flavivirus

La protéine de capsid (C) est une protéine d'environ 11kDa. Cette protéine est le composant structural unique de la capsid qui protège l'ARN génomique des flavivirus. Elle est retrouvée au début de l'infection à la surface de vésicules sécrétées du réticulum endoplasmique de la cellule hôte. Son rôle est essentiel dans l'encapsidation spécifique du génome viral, comme en témoigne l'existence de particules virales extracellulaires sans capsid ni ARN viral génomique [34]. La liaison entre la protéine C et l'ARN viral se fait via des interactions avec des résidus basiques des parties N- et C- terminales de la protéine C [35]. Par ailleurs, des dimères de protéine C ont été observés pour le DENV et le YFV [36] et seraient l'élément de base de l'assemblage de la nucléocapsid [37]. Au-delà de son rôle structural, la protéine C est impliquée dans la régulation du devenir des cellules infectées. Son expression intracellulaire est par exemple associée à l'apparition d'une apoptose médiée par la voie mitochondriale et l'activation des caspases 3 et 9 dans les infections par le virus West Nile [38].

La glycoprotéine de membrane (M) des flavivirus, d'environ 8kDa, est au même titre que la protéine d'enveloppe E, ancrée par sa partie C-terminale dans l'enveloppe lipidique des virions matures. Cette protéine est dérivée d'une forme précurseur, appelée prM, clivée au cours de la réplication par des

protéases cellulaires. Le clivage entraîne la libération d'un fragment « pr » dans le milieu extracellulaire. Ce clivage, réalisé par une furine cellulaire, est parfois incomplet. Un tel phénomène affecte l'infectivité, la conformation ainsi que l'antigénicité du virus [26]. Dans les particules immatures, le précurseur prM, d'environ 27 kDa, forme un hétérodimère non covalent avec la protéine E, dont il protège les peptides de fusion durant l'exocytose des particules virales [39]. Il contient par ailleurs un signal de rétention au niveau du réticulum endoplasmique [40] et joue un rôle de chaperonne dans le repliement et l'agencement des protéines E [41]. Tout comme la protéine C, la protéine M induit de l'apoptose une séquence « ApoptoM » suite à l'infection par les 4 sérotypes du virus de la dengue [42].

La protéine d'enveloppe E, d'environ 50 kDa, est une protéine membranaire de type I, comme la protéine M. Des études de cristallographie aux rayons X ont montré que cette protéine forme des homodimères positionnées tête-bêche, parallèlement à la surface des flavivirus [43]. Cette structure particulière est notamment stabilisée par la présence de résidus cystéine qui forment des ponts disulfures. Cette disposition ainsi que la présence de 90 dimères donnent au virus son agencement icosaédrique [29]. Les glycosylations et les déterminants antigéniques de la protéine d'enveloppe jouent un rôle essentiel dans l'attachement du virus à la membrane de la cellule, l'internalisation du virus, la reconnaissance des anticorps ou encore une fois dans les mécanismes apoptotiques [44]. De plus, la protéine E serait une des cibles majeures de la réponse cellulaire T [45]. La partie N-terminale de la protéine ou « ectodomaine », d'environ 400 acides aminés (aa), contient trois domaines distincts. Le domaine I constitue le domaine central de la structure. Il s'agit d'un agencement de feuillet β qui lie le domaine N-terminal de dimérisation de la protéine, ou domaine II, à une partie C-terminale de type immunoglobuline, ou domaine III. Le domaine II contient par ailleurs le peptide de fusion (résidus hydrophobiques 98-110), essentiel à la fusion des membranes de l'hôte et du virus lors de l'internalisation de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire [46]. Le domaine III est quant à lui reconnu comme le site d'attachement au récepteur cellulaire, encore non identifié [43,47].

b) Protéines non structurales (NS)

Ces protéines sont au nombre de 7 : NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b et NS5. Non essentielles à la structure du virion, elles sont en revanche indispensables à la réplication des flavivirus.

La protéine NS1 est une glycoprotéine d'environ 46kDa très conservée parmi les flavivirus. Elle contient 12 résidus cystéine, invariants parmi les flavivirus et qui forment des ponts disulfures intramoléculaires [48]. Cette protéine est retrouvée sous deux formes principales. Un homodimère, la forme la plus abondante, associé aux membranes intracellulaires et à la membrane plasmique [48,49] et une forme soluble hexamérique, composée de trois dimères de NS1 et sécrétée dans le milieu extracellulaire [50]. La protéine NS1 joue de multiples rôles au cours de l'infection. En particulier son rôle dans la réplication de l'ARN a été montré en bloquant la production d'ARN par mutation dirigée dans le gène NS1 [51,52]. Ce rôle dans la réplication s'est confirmé par son interaction avec NS4 et le complexe de réplication dont la protéine NS1 pourrait contrôler l'activité [53]. La protéine NS1 joue également un rôle important dans la réponse immunitaire antivirale. La forme sécrétée de la NS1 induit une forte réponse humorale. Les anticorps dirigés contre cette protéine ne sont pas neutralisants mais l'immunité qu'ils induisent, due à la lyse par le complément des cellules infectées qui présentent la protéine NS1 à leur surface, est protectrice chez le singe [54,55].

La protéine NS2a des flavivirus est une protéine d'environ 22kDa ancrée dans la membrane du RE. Sa fonction n'est pas encore bien définie à l'heure actuelle. Elle interagit avec les protéines NS3, NS5 et la partie 3' non codante. La protéine NS2a jouerait un rôle dans la réplication virale et la production de particules virales infectieuses. Il a de fait été montré que des mutations dans la séquence de NS2a bloque la réplication et l'assemblage des particules virales [56,57]. La protéine NS2a jouerait également un rôle dans la réponse immunitaire antivirale [58,59].

La protéine NS2b des flavivirus est une protéine d'environ 14 kDa ancrée dans la membrane du RE. Cette protéine est un cofacteur indispensable à la fonction sérine-protéase de la protéine NS3 avec qui elle forme un complexe. Le domaine central de la protéine NS2b, très conservé au sein des flavivirus, serait impliqué dans cette interaction avec la protéine NS3 et est indispensable à l'activité protéase du complexe NS2b-NS3 [60]. La protéine NS2b joue également un rôle dans la réponse immunitaire cellulaire puisqu'un épitope présenté par des lymphocytes T CD8+ a été identifié dans la protéine NS2b du virus de la fièvre jaune [58].

La protéine NS3 est une protéine cytoplasmique d'environ 70 kDa. Elle se trouve associée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) par son interaction avec la protéine virale NS2b [30]. La protéine NS3 est associée à trois réactions enzymatiques. C'est une sérine-protéase virale impliquée dans le clivage co- et post- traductionnel de la polyprotéine virale. La partie N-terminale, de 180 aa, comprend l'activité sérine protéase au travers d'un domaine catalytique en triade, His51-Asp75-Ser135 [30]. Cette activité est dépendante de l'association au cofacteur viral NS2b [61]. La partie C terminale possède les caractéristiques d'ARN hélicase et d'ARN triphosphatase respectivement impliquées dans la dissociation des brins d'ARN et structures secondaires pendant la réplication virale et dans la modification de l'extrémité 5' du génome viral pour préparer l'ajout de la coiffe [62]. A l'instar des autres protéines décrites, NS3 est également une cible importante de la réponse immunitaire lors de l'infection et participe à la régulation du devenir de la cellule infectée. Des épitopes T CD4+ et CD8+ ont été identifiés et des études *in vitro* ont montré l'induction d'apoptose par le site catalytique de la protéase [44,58].

Les protéines NS4a et NS4b sont des protéines de 16 et 27 kDa respectivement, ancrées dans la membrane du RE. La protéine NS4a interagit avec la protéine NS1 [53] et contrôle l'activité du complexe de réplication virale en ancrant les composants dans les membranes cellulaires [62]. La fonction de la

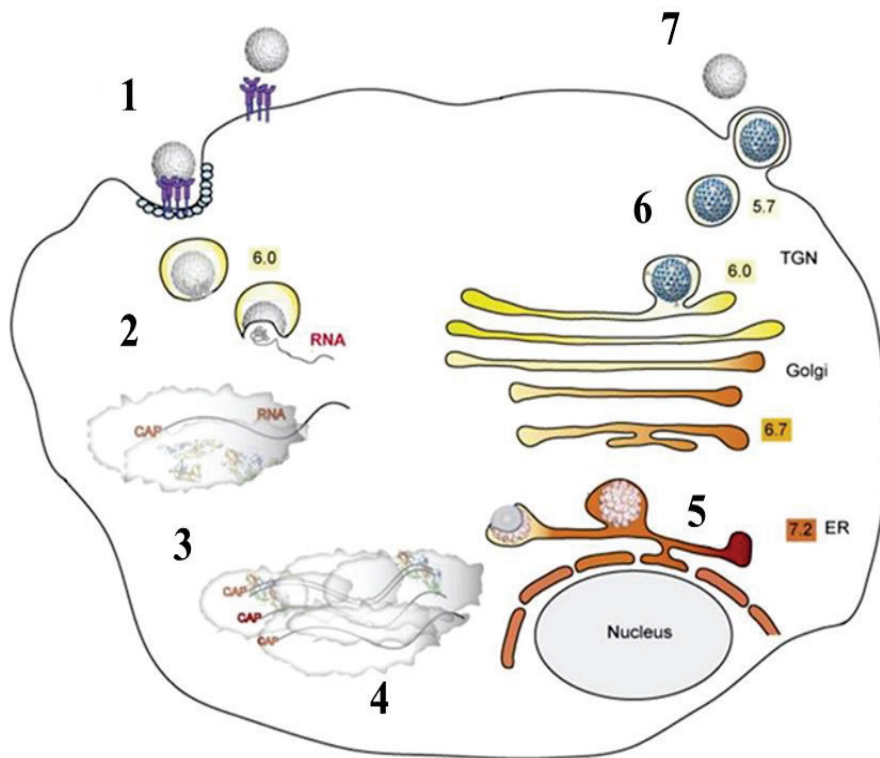
protéine NS4b dans le cycle viral est encore inconnue mais son rôle dans l'antagonisme de la réponse IFN est connu [63] au même titre que pour les protéines NS2, NS4a et NS5 [64].

La protéine NS5 est une protéine de 103 kDa. Elle est très conservée parmi les flavivirus et possède deux fonctions majeures. Elle assure le rôle, entre les résidus 270 et 900, d'ARN polymérase ARN-dépendante lors de la réplication virale [65]. Elle présente par ailleurs une activité méthyltransférase qui participe à la méthylation de la coiffe de l'ARN viral [66]. Enfin, la protéine NS5 des flavivirus peut être phosphorylée, régulant ainsi les interactions avec la protéine NS3 [67,68].

3. Cycle viral des flavivirus

Le cycle de réplication du virus comprend plusieurs étapes, dont l'attachement et l'entrée du virus, la synthèse et la maturation des protéines virales, la réplication du génome et la formation et la libération des virions nouvellement formés. Ce cycle est entièrement cytoplasmique et implique des interactions étroites avec les membranes de la cellule hôte. La phase de latence du cycle réplcatif est généralement de 12h avant que les premiers virions synthétisés ne soient détectés en extracellulaire (Figure 5).

Figure 5. Cycle réplcatif du virus de la fièvre jaune.



1-Attachement et entrée. 2-Fusion et décapsidation. 3-Traduction et clivage protéique. 4-Réplication du génome. 5-Assemblage de la particule virale. 6-Maturation par clivage de la protéine prM. 7-Bourgeonnement.

TGN : réseau trans-golgien (trans-golgi network) ; ER : réticulum endoplasmique

Figure adaptée de <https://www.bio.purdue.edu/lab/kuhn/research.html>

a) *Attachement et entrée du virus*

La liaison du virus à son récepteur spécifique apparaît être un facteur majeur du tropisme cellulaire et de la pathogénie observée. Aucune étude n'a à l'heure actuelle permis d'identifier un récepteur spécifique du virus de la fièvre jaune. Il apparaît que les glycosaminoglycanes soient nécessaires à cet attachement. Le virus 17D se lie ainsi aux héparanes sulfates à la surface des cellules VERO (cellules de rein de singe). Mais cette liaison ne représente qu'une interaction initiale entre le virus et la cellule et sert de phase de

concentration des particules virales à la surface des cellules, facilitant ainsi la liaison à un récepteur spécifiquement reconnu par l'enveloppe virale. De nombreux récepteurs potentiels ont été identifiés pour d'autres flavivirus comme le DENV, le WNV, le JEV ou le TBEV [47]. Un second mécanisme de liaison du virus à la cellule a été démontré pour un grand nombre de flavivirus y compris le virus de la fièvre jaune. Ce mécanisme est couramment appelé ADE pour « antibody-dependent enhancement », c'est-à-dire facilitation de l'infection dépendante d'anticorps. Une fois formé, le complexe anticorps-particule virale se lie à un récepteur cellulaire via la partie « Fc » de l'anticorps, est internalisé et le cycle viral peut se déclencher. Ce phénomène est cependant moins fréquent que le mécanisme classique [69].

Dans le foie, qui demeure la cible principale de l'infection, les hépatocytes et les macrophages résidents, les cellules de Kupffer, supportent la réplication du virus [70–73]. L'infection des cellules dendritiques semblent être restreinte bien que le virus y soit internalisé et utilisé pour la présentation d'antigènes [74]. Des études sur cellules endothéliales ont également montré que le virus s'y répliquait et induisait des libérations de médiateurs pro-inflammatoires potentiellement impliqués dans les manifestations hémorragiques observées *in vivo* [75].

Une fois fixé à son récepteur, le virus entre dans la cellule selon deux modes. Par endocytose, dans quel cas les virions se trouvent dans des vésicules enrobées de clathrine puis des vésicules pré-lysosomales dans lesquelles a lieu la fusion des membranes virales et cellulaires [76]. Le pH acide de ces vésicules induit un changement de la conformation de la protéine E. les dimères de E sont dissociés en monomères et réassociés en trimères. Le peptide de fusion se trouve alors exposé et initie la fusion des membranes virales et cellulaires suite à quoi la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme [29]. Le deuxième mode d'entre se fait par fusion directe des membranes virales et cellulaires au site d'attachement du virion [77].

b) La traduction et la maturation des protéines virales

Une fois le complexe nucléocapsidique dans le cytoplasme cellulaire, l'ARN génomique viral est décapsidé. Il est pris en charge par la machinerie cellulaire pour être traduit en polyprotéine au niveau du réticulum endoplasmique (RE).

Les protéines virales résultent de clivages co- et post-traductionnels de la polyprotéine virale. Ces clivages sont assurés par des signalases cellulaires ou la protéase virale NS2b-NS3 [62]. Les signalases cellulaires catalysent les clivages entre les protéines C et prM, prM et E, E et NS1 et NS4a et NS4b. Cependant, pour les clivages C/prM et NS4a/NS4b, un clivage en amont de la protéase virale semble conditionner la reconnaissance des sites de clivage par les signalases cellulaires [78,79]. Le clivage entre les protéines NS1 et NS2a est également effectué par une protéase du RE [30,80]. La séparation des protéines non structurales NS2a-2b, 2b-3, 3-4a et 4b-5 est catalysée par le complexe protéasique viral NS2b-NS3 [30,80]. Après clivage de la polyprotéine, la protéine C se trouve ancrée dans la membrane du RE [34]. En revanche, les protéines structurales prM et E sont quant à elles transloquées, via un peptide signal en N-terminal, dans la lumière du RE puis dans le réseau trans-golgien où elles subissent des glycosylations [30,80]. Cette maturation va permettre leur assemblage en hétérodimères qui se retrouveront par la suite à la surface des virions immatures. Enfin, après clivage, les protéines NS3 et NS5 sont cytosoliques, tandis que les protéines hydrophobes NS2a, NS2b, NS4a et NS4b sont membranaires [62].

c) La réplication de l'ARN viral

Après la traduction et la maturation des protéines, le complexe de réplication, intégrant les protéines non structurales et des facteurs cellulaires, est assemblé au niveau de la région 3' de l'ARN viral [81]. Une interaction entre les protéines NS1 et NS4a est également décrite pour son rôle dans la formation et le fonctionnement du complexe de réplication [53]. La réplication virale s'effectue au niveau des

membranes du RE de la cellule infectée. La fixation du complexe de réplication initie la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire de polarité négative. Lors de la réplication, des complexes ARN de formes différentes sont détectées dans les cellules infectées [82]. Des ARN doubles brins ou formes réplcatives (FR), qui sont un appariement des ARN sens (polarité positive) et anti-sens (polarité négative). Des formes intermédiaires de réplication (IR), issues des FR et qui sont constituées d'ARN doubles brins et de simples brins naissants. Dans les formes intermédiaires, le brin de polarité négative ou brin matrice sert de base pour l'amplification des brins positifs. Les brins positifs sont ainsi synthétisés en excès (environ 10 fois) par rapport au brin d'ARN négatif. Les ARNs viraux néo-synthétisés servent alors à la production des protéines virales ou sont associés à la protéine C pour former la nucléocapside incorporée dans les nouvelles particules virales [83].

d) Assemblage des particules

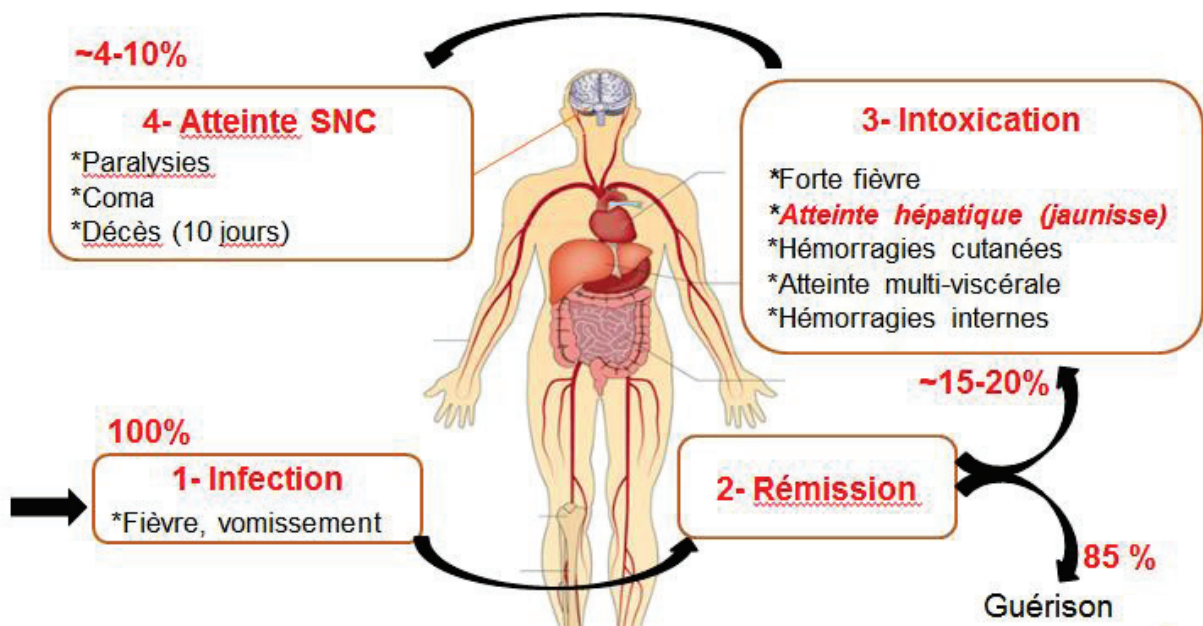
La morphogénèse des particules virales se produit principalement en association avec les membranes intracellulaires de la cellule infectée. La formation de la nucléocapside constitue la première étape de cet assemblage. Les protéines prM et E sont transloquées dans la lumière du RE. Elles s'assemblent en hétérodimères et migrent dans le réseau trans-golgien où elles subissent des glycosylations. La protéine prM protège ainsi les peptides de fusion des protéines E durant l'exocytose des particules virales [39]. L'assemblage des particules au niveau du RE est vraisemblablement un évènement très rapide et un processus coordonné entre la capsid, associée à la membrane et à l'ARN génomique, et l'hétérodimère prM-E [29,30,80]. Les particules immatures migrent ensuite au travers des compartiments de la voie de sécrétion dans des vésicules de transport. Puisqu'aucun virus mature, c'est à dire avec une protéine M clivée, n'a été observé en intracellulaire, le clivage de la prM par une protéase cellulaire de type furine se fait juste avant ou pendant le relargage des virions lors de la fusion

des membranes de ces vésicules post-golgiennes avec la membrane plasmique. Ce clivage est indispensable à la production de virus infectieux, dits matures.

D. Pathologie

La maladie de la fièvre jaune est provoquée par l'infection de l'hôte par le virus de la fièvre jaune suite à la pique du moustique vecteur. La pathologie se décline sous un large panel de symptômes allant d'une maladie pseudo-grippale non spécifique jusqu'à une atteinte pan-systémique avec des fièvres, une jaunisse, une décompensation rénale, des hémorragies et des atteintes neurologiques souvent létales. Cette variabilité dans les symptômes rend la caractérisation clinique difficile pour les cas isolés et explique en partie les sous-estimations régulièrement reportées (Figure 6).

Figure 6. Evolution de la pathologie Clinique.



La période d'incubation varie entre 2,3 et 8,6 jours suivant la pique du moustique [84], les premières raideurs et maux de tête se font alors ressentir. La pathologie se divise alors en trois phases. La première phase ou période d'infection dure de 3 à 4 jours. L'ensemble des personnes infectées développent cette

phase. Le virus est retrouvé dans le sang des patients et peut, lors d'un repas sanguin, infecter un moustique ou présenter des risques pour le personnel hospitalier. Cette phase a été démontrée comme plus longue pour les patients développant les formes fatales [85]. La seconde phase ou « période de rémission » s'étend sur une durée de 2 jours. Les symptômes s'estompent ou disparaissent. Dans de nombreux cas, la pathologie s'arrête à cette phase et les personnes infectées sont protégées à vie contre une nouvelle infection. La troisième phase concerne environ 15% des personnes infectées. Cette période dite « d'intoxication » se caractérise par le développement d'une jaunisse. Les individus atteints développent une forte fièvre, des nausées, des vomissements sanguins et des hémorragies. A ce stade le virus disparaît de la circulation sanguine et les premiers anticorps apparaissent. Un dysfonctionnement multi organique est alors observé avec des atteintes hépatiques, rénales et cardiovasculaires importantes. Les taux sériques d'aspartate et d'alanine aminotransférase (AST et ALT) sont élevés et positivement corrélés avec la sévérité de la maladie et 1,5 à 3 fois plus élevés dans les formes fatales de la pathologie [86]. L'atteinte rénale se caractérise par une protéinurie ainsi qu'une augmentation des taux d'albumine et de créatinine dans le sérum [87]. Enfin une forte thrombocytopénie, un prolongement des temps de coagulation et des taux élevés de facteurs pro-inflammatoires sont associés aux manifestations hémorragiques [27]. Dans 20 à 50 % des cas de formes sévères, la maladie évolue vers une forme neurologique. Le coma et le décès des patients surviennent entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour de la maladie.

Si la plupart des singes développent une infection asymptomatique, certains singes d'Asie (*Macaca Mulatta* et *Rhesus*) et d'Amérique du Sud développent des infections létales associées à une hépatite fulminante, des atteintes rénales et cardiovasculaires qui ressemblent à la pathologie humaine [88]. La cinétique d'infection apparaît cependant plus courte que pour l'homme avec une moyenne de 5 à 6 jours pour les formes létales contre 7 à 10 jours chez l'Homme [88]. La phase de rémission n'a pas été observée chez le singe.

1. Diagnostic de la pathologie

La principale difficulté du diagnostic de la maladie se présente pour les cas isolés. La manifestation d'une pathologie bi- ou tri-phasique, pour des individus non vaccinés ayant récemment voyagé en zone endémique, avec développement de conjonctivites, d'une jaunisse ou encore de vomissements sanguins est caractéristique de la pathologie. Néanmoins, tous ces symptômes ne sont pas perceptibles chez l'ensemble des individus infectés. De plus, des pathologies, comme la leptospirose, présentent un tableau clinique semblable, rendant difficile la distinction dans les mêmes zones géographiques [13]. Une épidémie d'hépatite E a par ailleurs été observée concomitamment à celle de la fièvre jaune au Darfour en 2012 [89].

Le diagnostic spécifique nécessite donc l'isolement du virus, la détection d'ARN viral ou d'antigènes viraux dans le sang, ou encore la détection des anticorps. Ainsi le virus peut être isolé dans le sang dans les 4 à 12 jours suivants l'infection par le virus (revue dans [12]). L'amplification du virus peut être réalisée de différentes façons. *In vivo*, par injection intracérébrale chez lesouriceau ou l'injection intrathoracique chez le moustique. *In vitro*, après infection de cultures cellulaires de moustiques, cellules C6/36 ou AP61, ou de mammifères, cellules VERO ou SW13 [90]. Une technique de RT-PCR est actuellement très utilisée pour les diagnostics rapides de l'infection [91]. Les amorces ciblant une région conservée de la protéine E sont utilisées et permettent d'obtenir une sensibilité de détection de 1,15 PFU/ml. Cette méthode a été utilisée pour détecter le virus dans les séra et de nombreux tissus de primates humains et non humains [92,93]. Une détection rapide des antigènes viraux ou des complexes anticorps-antigènes peut également être faite par ELISA, bien que la sensibilité du test ne soit que de 3 log₁₀ PFU/ml [90]. Par ailleurs, la détection des complexes immuns nécessite l'analyse de deux échantillons distincts afin d'évaluer l'évolution des taux sériques d'IgM et d'IgG. Ces deux techniques ne nécessitent pas une conservation particulière des échantillons, facilitant ainsi les diagnostics en zone endémique. De nouvelles méthodes d'ELISA et d'immunofluorescence ont été développées mais

présentent encore des problèmes de réactions croisées dans les zones de co-circulation entre les différents flavivirus [94,95]. La détection des antigènes NS1 est largement utilisée dans le cas des infections par le DENV et doit être appliquée dans le cadre de l'infection par le virus de la fièvre jaune [96]. Enfin, l'analyse post-mortem des foies d'individus décédés peut également faire acte de diagnostic. La présence de foyers nécrotiques dans la zone médio globulaire ainsi que la détection par immunohistochimie d'antigènes viraux sont des marqueurs évidents de l'infection [97].

Dans les zones endémiques où la vaccination est utilisée, il est difficile de distinguer les effets secondaires viscérotropiques dus à la vaccination (discuté dans la partie vaccination, ci-après) et les formes viscérotropiques dues à l'infection naturelle [98]. Dans ce cas, la différenciation ne se fait que par l'intermédiaire d'un séquençage du virus isolé, d'un marqueur post-mortem des tissus infectés ou encore d'un anticorps monoclonal spécifique [99].

1. Pathogénèse

Le virus de la fièvre jaune est associé à deux propriétés biologiques majeures : le viscérotropisme et le neurotropisme. Le viscérotropisme, se caractérise par la capacité du virus à développer une virémie importante atteignant ainsi un ensemble d'organes tels que le foie (la cible majeure), le rein, la rate ou le système cardiovasculaire. Le neurotropisme, résume la capacité du virus à franchir la barrière hématoencéphalique (BHE), infecter le parenchyme cérébral et causer des encéphalites. Les souches sont classiquement viscérotropiques chez les primates humains et non humains. Cette aptitude a été démontrée dans plusieurs espèces de singes, sensibles à l'infection, après inoculation intracérébrale du virus. La mortalité était en effet principalement due à des hépatites plutôt qu'à des encéphalites.

Le virus se réplique au niveau du site d'inoculation après la pique du moustique puis est transporté jusqu'aux ganglions lymphatiques avoisinants par les cellules dendritiques et lymphocytes locaux [100].

Après réplication, le virus se retrouve dans la circulation sanguine dès le deuxième jour et atteint les organes cibles dès le troisième jour (foie, moelle osseuse, reins, ganglions centraux).

L'atteinte hépatique est une caractéristique de l'infection par le virus de la fièvre jaune. Observée précocement, son intensité augmente graduellement au cours de l'infection. Cette atteinte est directement liée à l'infection du virus puisque de forts taux d'antigènes viraux ont été détectés dans les nécropsies hépatiques de deux individus européens [92]. L'infection des cellules de Kupffer est le premier événement observé après inoculation intra-péritonéale du virus chez le singe rhésus. Cette observation est également faite après inoculation sous-cutanée [88]. Dans les dernières 48 heures précédant le décès, une dégénérescence massive, impliquant en moyenne 80 % des hépatocytes, est observée chez l'homme [70]. D'autres données démontrent une perte importante de l'architecture hépatique et une atteinte majoritaire de la région midzonale hépatique [101–103]. L'observation de corps apoptotiques, aussi appelés corps de Councilman, correspondant à des cellules éosinophiles aux noyaux condensés est caractéristique d'une apoptose induite par le virus de la fièvre jaune [101–103]. Cette dégradation hépatique concorde avec les détectations sériques d'aminotransférase (AST et ALT) dont les forts niveaux sont observés dans les formes sévères de la pathologie [104]. D'autres modifications hépatiques sont observées comme l'accumulation de lipide (stéatose) et les dépôts de céroïdes ou de lipofuscine (accumulation lysosomale). La mort cellulaire par apoptose plutôt que par nécrose semble expliquer la limitation de la réponse inflammatoire et des infiltrations au niveau hépatique [101–103]. Ces infiltrations impliquent un grand nombre d'effecteurs cellulaires comme les macrophages, des cellules « natural killer » (cellules NK), les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les cellules de Kupffer CD68+ et les cellules CD20+ [86,101–103].

Tout comme pour l'atteinte hépatique, l'infection rénale se caractérise par une dégénérescence épithéliale, l'accumulation de lipide et une inflammation modérée. Ces lésions sont majoritairement

associées à un choc hypotensif tardif [88]. En revanche, contrairement aux compartiments hépatiques et systémiques, la quantité de virus détectée reste très limitée [97]. La découverte de virus vaccinal dans les urines de 44% de sujets vaccinés lors d'une étude suggère que les reins sont un site de réplication important du virus de la fièvre jaune [105]. Néanmoins, il pourrait s'agir d'une élimination des virus en provenance d'autres organes puisqu'il a été montré que les ganglions lymphatiques restaient positifs pour le virus après la clairance du virus de la circulation sanguine par les anticorps neutralisants [106]. D'autres organes comme le thymus, la rate ou les ganglions, sont également affectés. Une nécrose au niveau des centres germinatifs est observée sans qu'un lien avec la réplication virale n'ait encore été établi. [88,107]. Enfin, des dysfonctionnements cardiovasculaires et insuffisances circulatoires sont observés. La diminution de la synthèse des facteurs de coagulation par le foie mais également de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de TNF- α par les macrophages infectés et/ou activés sont décrits comme responsables de la formation de radicaux oxygénés, des altérations vasculaires et des chocs [27,108].

Outre l'aspect viral de la pathologie, une réponse immunitaire exacerbée, inappropriée ou non contrôlée est donc potentiellement à l'origine d'évènements pathologiques lors de l'infection par le virus de la Fièvre jaune. De fait, les anticorps apparaissent dans les 7 à 8 jours qui suivent l'infection. Cette synthèse se faisant en même temps que l'initiation des réponses cellulaires mais également que la période d'intoxication. Par ailleurs des équipes ont identifié un panel de cytokines pro- et anti-inflammatoires (IL-6, TNF- α , MCP-1, IL1-RA, IL-10) dans les séra d'individus avec une forme fatale de fièvre jaune alors que seuls des taux élevés de cytokines anti-inflammatoires étaient retrouvés pour les formes non létales [109]. De manière intéressante, la phase répliquative du virus chez le hamster est caractérisée par une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2, l'IFN- γ ou le TNF- α alors que la phase finale de la pathologie se caractérise par une élévation de ces cytokines et la mort de l'animal. Ces observations démontrent l'association étroite de ces facteurs immunitaires avec la pathogénèse virale

[110]. Ainsi, les anticorps, des facteurs du complément, la forme soluble de NS1 ou encore des cytokines pro-inflammatoires sont retrouvés en même temps chez l'individu infecté et peuvent contribuer aux atteintes vasculaires et au choc.

2. Réponse immunitaire suite à l'infection

Les principales informations sur la réponse immunitaire induite suite à l'infection par le virus de la fièvre jaune sont obtenues au niveau de la réponse systémique (Figure 7). En particulier la réponse humorale est caractérisée par l'apparition d'immunoglobulines M (IgM) durant la première semaine de la maladie [111]. Le taux d'IgM est maximal durant la deuxième semaine et décroît sur les deux mois post-vaccination. La réponse IgM est d'autant plus intense lors d'une primo-infection. Les anticorps IgG neutralisants apparaissent également dans la première semaine de la pathologie [112]. La protéine E de l'enveloppe est la cible majeure des anticorps neutralisants. Des épitopes ont été identifiés dans les domaines I (E155), II (E71/E72) et III (E305/325) [113],[114,115]. Un ensemble d'épitopes pan flavivirus ont également été identifiés [116]. Outre contre la protéine d'enveloppe, des anticorps dirigés contre la protéine NS1, présente à la surface des cellules infectées, seraient responsables de la lyse par recrutement des facteurs du complément ou par un mécanisme d'ADCC (cytotoxicité dépendante des anticorps) via les cellules NK [55].

Figure 7. Cinétique de la réponse immunitaire suite à l'infection par le virus de la fièvre jaune.

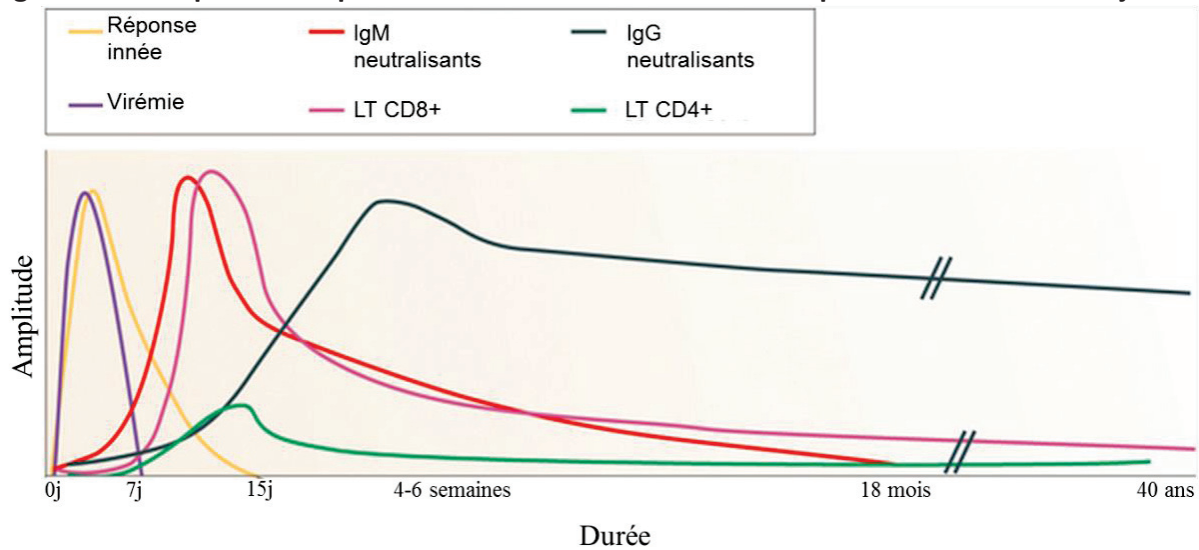


Figure issue [117]

En parallèle de ces réponses humorales, les données cliniques témoignent néanmoins de l'importance des réponses innées dans l'évolution de la pathologie. Il a ainsi été établi que les patients évoluant vers des formes sévères étaient déficients ou faiblement compétents dans l'établissement de ces réponses [109]. Des facteurs de l'hôte, du virus voire même environnementaux sont potentiellement impliqués dans ces modulations. L'existence d'une pré-immunité chez des singes immunisés contre le DENV a par exemple augmenté la résistance de ces singes à l'infection contre le virus de la fièvre jaune [118]. Une étude rétrospective sur une population de militaire a permis de montrer la forte diminution des formes sévères de la pathologie pour les individus possédant une pré-immunité contre le sérotype 2 du DENV [119]. Si d'autre croisement ont été observés, l'immunisation par le virus YFV ne protège pas contre les infections par le WNV, confirmant de précédentes observations sur les formes hémorragiques de dengue à la suite d'une vaccination contre le virus de la fièvre jaune [120,121].

A la fin de l'infection, l'ensemble des personnes infectées par le virus développent une immunité protectrice sur plus de 30 à 40 années [122].

En parallèle des réponses humorales, des taux élevés de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-1RA ont notamment été mesurés au tout début de la période de virémie [108,123]. Ces trois facteurs et le MCP-1 ont par ailleurs été détectés significativement plus élevés dans les individus avec des formes fatales de la pathologie [109]. Dans la circulation sanguine, des augmentations du pourcentage de cellules dendritiques myéloïdes, plasmacytoïdes ou encore des monocytes CD14+ CD16+ inflammatoires sont observées [124]. L'implication des cellules NK a été suggérée lors d'une étude sur cellules mononuclées du sang périphérique de sujets vaccinés [125]. Des études ultérieures sur le DENV dans un modèle souris ont montrées l'importance des cellules NK dans la clairance de l'infection [126]. Leur rôle a également été décrit pour les infections par le JEV et par le WNV [127,128]. Finalement peu d'informations sont disponibles au regard du développement des réponses innées compte tenu de la difficulté de diagnostic de la maladie et de l'apparition tardive des symptômes caractéristiques.

II. PARTIE II : Le Foie

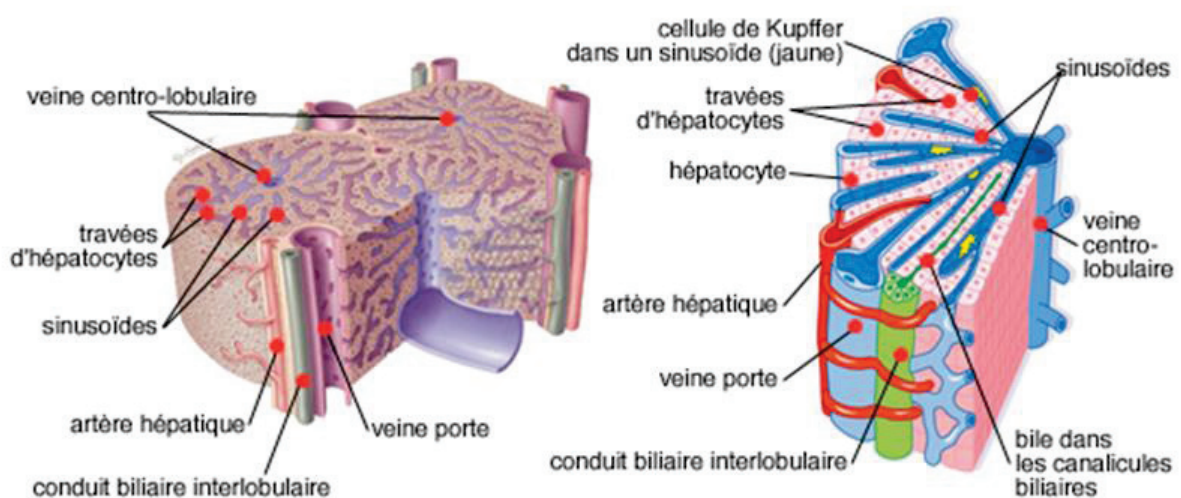
Le foie est un organe vascularisé composé de plusieurs populations cellulaires distinctes assemblées en une structure tridimensionnelle complexe. Organe essentiel du corps humain, il exerce un ensemble de fonctions essentielles.

A. Structure et organisation du foie

43

Le foie est entouré d'une capsule conjonctive fibreuse, ou capsule de Glisson, dont les prolongements divisent le foie en de nombreux lobules d'environ 1 à 2 millimètres qui représentent l'unité fonctionnelle et structurelle du foie. Chaque lobule hépatique, de forme polyédrique est constitué d'une série de travées d'hépatocytes, irriguées par un réseau de sinusoides qui confluent au centre du lobule dans la veine centrolobulaire. Au carrefour de plusieurs lobules hépatiques, une zone conjonctive plus importante se forme pour donner la formation des espaces portes de Kiernan. Chacun de ces espaces portes contient la veine porte, une artère hépatique et un canal biliaire interlobulaire (Figure 8).

Figure 8. Architecture hépatique.



Adaptée de <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/appareil-digestif/cancers-du-foie/maladie/anatomie-physiologie.html>

Les hépatocytes, aussi appelés cellules parenchymales, sont les principales cellules du foie. Ils conditionnent et supportent les principales fonctions hépatiques. Chaque travée d'hépatocytes s'étend de l'espace porte jusqu'à la veine centroglobulaire et est séparée des autres lames par les sinusoides. Cette architecture particulière permet de maintenir les hépatocytes sous une forme polarisée, essentielle pour la sécrétion biliaire et le métabolisme hépatique, et définie par la présence de trois domaines cellulaires différents. La partie apicale ou domaine sinusoidal, interagit avec la matrice extracellulaire ou MEC (Collagène de type I-IV, ténascine, laminine, fibronectine et protéoglycanes) et les cellules endothéliales sinusoidales au niveau de l'espace de Disse. Le domaine latéral consiste en une interaction inter-hépatocytes. La liaison est assurée par la cadhérine E et les communications intercellulaires sont médiées via des desmosomes et hémidesmosomes. Enfin la partie basale ou « domaine canaliculaire » contient les canalicules biliaires essentiels pour la sécrétion de bile.

Un ensemble de cellules non parenchymales comme les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Kupffer (Figure 8), les cellules épithéliales biliaires ou les cellules étoilées. Les cellules sinusoidales constituent la paroi du sinusoides hépatique. Des espaces intercellulaires existants permettent le transfert de molécules entre la voie systémique et l'espace de Disse. Les cellules de Kupffer sont des macrophages hépatiques résidents. Ils sont attachés à la paroi sinusoidale et jouent le rôle de phagocytes et de sécréteurs de protéases et de cytokines. Enfin les cellules étoilées, aussi appelées lipocytes ou cellules de Ito, sont retrouvées dans l'espace de Disse. Elles présentent de volumineuses inclusions lipidiques et de longs prolongements cytoplasmiques qui peuvent se retrouver entre deux hépatocytes. Elles sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire ainsi que de facteurs de

croissance comme le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ou encore le facteur de croissance hépatocytaire (HGF).

1. Fonctions

Le foie est un organe filtrant essentiel au métabolisme et à l'assimilation d'un ensemble de molécules. Ces dernières proviennent à la fois de la circulation sanguine et des voies digestives. Elles peuvent être endogènes, exogènes, pathogènes ou encore chimiques et nécessitent des réponses appropriées et rapides. Parmi ces fonctions, on retrouve donc le métabolisme des xénobiotiques, des protéines, des stéroïdes, ou encore des acides gras. Une fonction de détoxification sanguine est également caractéristique du foie ainsi que la sécrétion de composants de la bile et du sang comme les sels biliaires, le cholestérol ou l'albumine. Enfin une fonction de stockage des sucres et des vitamines a également été décrite [129].

2. Différenciation hépatocytaire

Les capacités métaboliques des hépatocytes sont liées au maintien d'un statut polarisé et différencié de ces cellules. Ces problématiques représentent d'ailleurs l'enjeu majeur dans le développement actuel des modèles d'étude.

La spécialisation des hépatocytes est ainsi le résultat d'une régulation précise et séquencée d'un ensemble de gènes par l'intermédiaire de protéines et de facteurs de transcription définis. Ces régulateurs incluent les facteurs nucléaires hépatocytaires (HNF) HNF1 α/β , HNF3 $\alpha/\beta/\gamma$, HNF4 α , and HNF6 mais également une protéine de liaison à l'ADN, la protéine C/EBP (CAAAT/enhancer binding protein). Par ailleurs cette différenciation est aussi médiée par l'architecture hépatique et par un ensemble de facteurs de croissance, d'hormones, de cytokines et de molécules de la MEC [129].

3. Le métabolisme hépatique

Bien que les reins, les poumons ou encore la circulation sanguine aient des capacités métaboliques décrites, le foie reste l'organe majoritaire de ce métabolisme. Les hépatocytes produisent ainsi un grand nombre d'enzymes hépatiques. Elles sont majoritairement retrouvées au niveau du réticulum endoplasmique lisse, dans les microsomes.

Les enzymes hépatiques jouent un rôle essentiel dans la transformation des composés organiques et chimiques exogènes et leur élimination via l'urée ou les voies biliaires. La majorité des transformations effectuées consistent à augmenter la solubilité du composé. Ces propriétés peuvent également être mises à profit pour rendre active une drogue (diamorphine ou codéine par exemple).

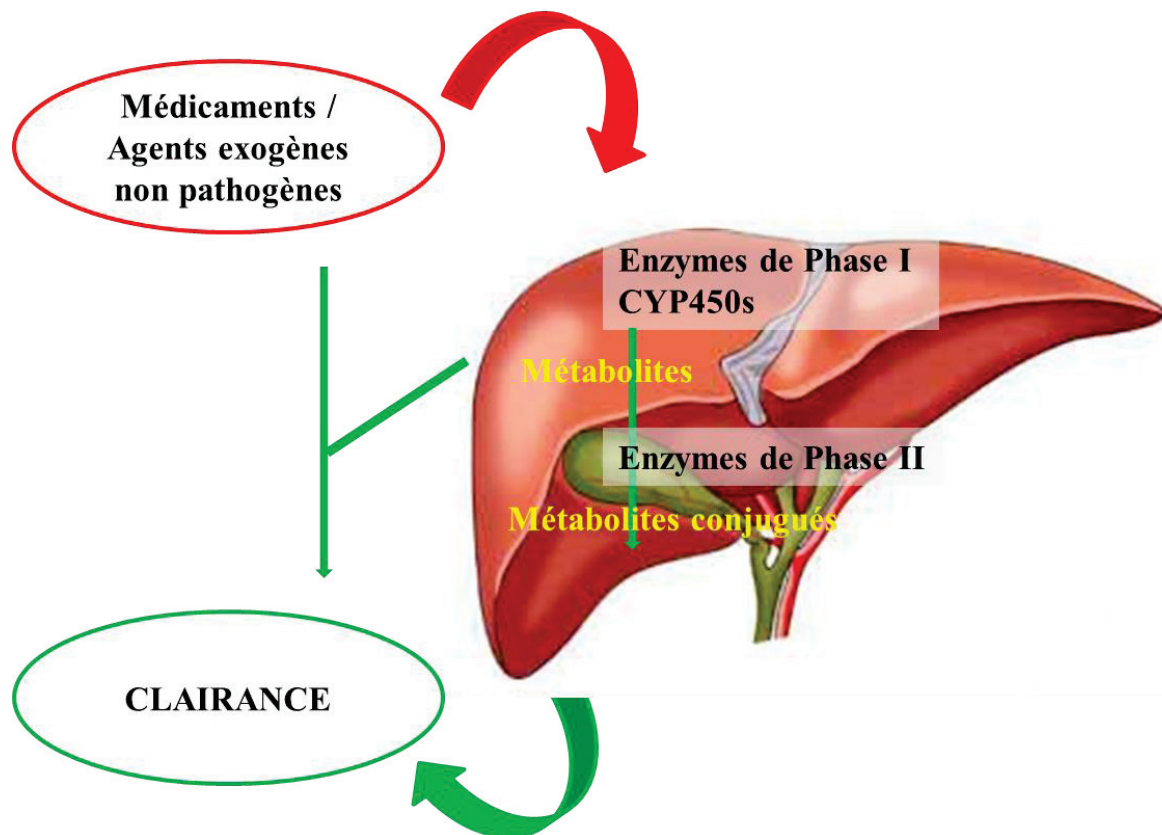
Le métabolisme hépatique est sensible à un ensemble de paramètres physico-chimiques liés à l'âge, au sexe, la flore intestinale, un contexte pathologique ou encore à un polymorphisme génétique. Des pathologies ont ainsi été associées à la réduction de certaines activités métaboliques au même titre que la sénescence des cellules qui induiraient un contexte pro-inflammatoire limitant les activités métaboliques [130,131]. Le polymorphisme génétique, résultant parfois d'une simple substitution d'acide aminé, peut également expliquer des variabilités de réaction aux traitements anesthésiques et analgésiques [132].

Bien que les reins, les poumons ou encore la circulation sanguine aient des capacités de métabolisme, le foie reste l'organe majoritaire de ce métabolisme. Les hépatocytes produisent ainsi un grand nombre d'enzymes hépatiques. Elles sont majoritairement retrouvées au niveau du réticulum endoplasmique lisse, dans les microsomes.

Le métabolisme hépatique est classiquement divisé en deux phases (Figure 9). La phase I regroupe des réactions d'oxydation (ajout d'un atome d'oxygène), de réduction et d'hydrolyse. Ces réactions sont assurées majoritairement par les cytochromes P450 (CYP450s). Ces enzymes, aussi appelées enzymes de

phase I, sont composées d'une chaîne protéique et d'un site actif contenant un motif hème ferrique responsable de la liaison et de l'activité métabolique sur le substrat. Plus de 50 cytochromes P450 ont été identifiés et sont classés selon leur séquence en acide aminés. Ils peuvent par ailleurs avec une action simultanée sur le même substrat. L'hydrolyse est la dernière étape de la phase I du métabolisme. Elle implique des estérases et des amidases qui ne sont pas des cytochromes P450. Ces enzymes sont exprimées en quantité abondante dans les tissus et conditionnent les temps d'élimination du composé métabolisé. La seconde phase du métabolisme ou phase II, est une étape de conjugaison de groupements ionisés au composé ciblé afin d'augmenter sa solubilité. Des réactions de glucuronidation (ajout d'acide glucuronique), de sulfatation (ajout d'un groupement sulfate), d'acétylation (ajout d'un groupement acétyle -CO-CH_3) ou encore de méthylation (ajout d'un groupement méthyle -CH_3) sont ainsi observées et sont assurées par un ensemble d'estérases, d'hydrolases ou encore de transférases.

Figure 9. Différentes étapes du métabolisme hépatique.



B. La réponse immunitaire dans le foie

Le foie est un organe présentant une immunité développée. En plus des barrières physico-chimiques classiques, le foie contient un ensemble d'effecteurs cellulaires et humoraux capables d'engendrer des réponses efficaces et rapides contre une invasion pathogène, un développement carcinogène ou une inflammation [133]. Dans ce contexte, l'importance de la réponse innée et de ces systèmes de détection semble être un paramètre essentiel de la réponse immunitaire hépatique.

1. Détection des pathogènes

Les récepteurs TLR sont largement exprimés par les cellules hépatiques [134]. Ils sont associés positivement ou négativement à plusieurs pathologies hépatiques [135,136]. Leur rôle dans les défenses

contre un pathogène donné reste à définir. Parmi les TLR exprimés, on retrouve le TLR2 à la surface des cellules de Kupffer, des cellules de Ito ou des cellules LSEC (Liver sinusoidal endothelial cells). Le TLR4 a également été décrit sur l'ensemble des populations cellulaires hépatiques où il capte les endotoxines et induit la synthèse de cytokines inflammatoires et radicaux oxygénés [135,136]. Plusieurs TLRs ont par ailleurs été décrits comme inhibiteurs des infections HCV (virus de l'hépatite C) et HBV (virus de l'hépatite B) [137,138]. Des récepteurs cytoplasmiques comme les récepteurs NOD- et RIG-like sont également décrits. Le récepteur RIG-1, un senseur de l'ARN est par exemple associé à une régulation de la permissivité des hépatocytes à l'infection par le virus de l'hépatite C [139].

L'élimination des facteurs solubles de la circulation sanguine par les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer est également un élément clé de la réponse immune hépatique. Si des mécanismes de phagocytose sont associés aux cellules de Kupffer, les cellules endothéliales exercent cette fonction via l'expression de 5 types de récepteurs d'endocytose [133]. Comme décrit en amont, le foie possède également un ensemble de populations lymphocytaires capables de détecter les pathogènes et d'orienter les réponses immunitaires. Une variabilité importante de ces populations est observée en fonction du contexte inflammatoire et en fonction de l'espèce [140].

2. Les acteurs cellulaires de la réponse immunitaire hépatique

Les cellules endothéliales des sinusoides, les hépatocytes et les cellules de Kupffer sont des acteurs majeurs de l'immunité hépatique (Figure 10).

Figure 10. Réponse immunitaire dans le foie : homéostasie versus inflammation et infection du tissu hépatique.

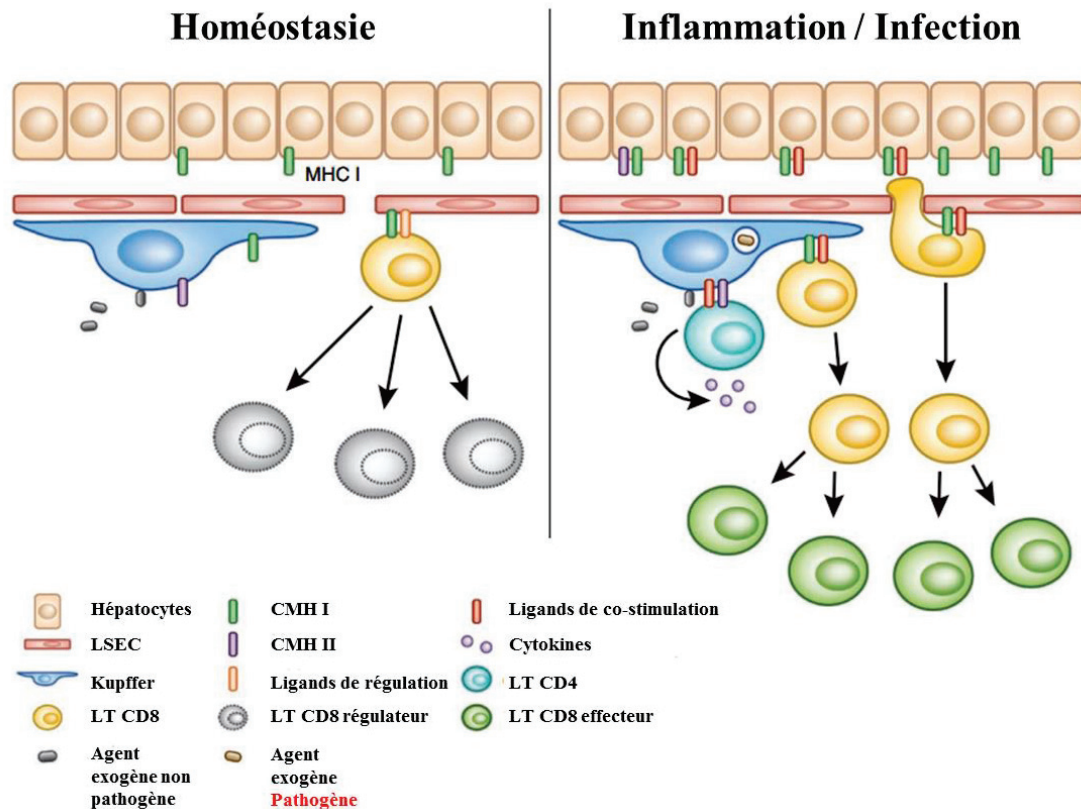


Figure traduite de [141]

Les cellules endothéliales (LSEC), jouent à la fois le rôle de cellules présentatrices d'antigènes et de sentinelles. Elles expriment une variété de récepteurs au pathogènes (TLRs, RLR, NLR) initiateurs des réponses immunitaires mais également de récepteurs d'internalisation (« scavenger » en anglais) capables de se lier et d'internaliser des molécules issues de la digestion ou des complexes immuns de tailles très variées [142]. Par ailleurs, elles présentent à la surface les complexes CMH I (Complexe d'Histo-Compatibilité de type I) et CMH II (Complexe d'Histo-Compatibilité de type II) ainsi que les molécules de co-stimulation (CD80 et CD86 par exemple) nécessaires à la présentation des antigènes et

aux interactions requises pour la maturation des lymphocytes CD4 et CD8 (Figure 10) [143]. Cette aptitude de présentation et d'interaction avec les lymphocytes a été particulièrement observée pour les antigènes dérivés de la circulation sanguine, souvent non pathogènes, entraînant une différenciation des lymphocytes en lymphocytes régulateurs, tolérogènes [144].

Les hépatocytes possèdent également un ensemble de récepteurs capables de reconnaître les pathogènes et d'initier une réponse immunitaire innée. Les hépatocytes sont également capables d'engendrer des réponses adaptatives par présentation des antigènes via les CMH I et CMH II aux lymphocytes environnants [145]. Néanmoins l'importance de l'activation des cellules lymphocytaires par les hépatocytes n'est pas connue en comparaison des activations générées par d'autres cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques ou les cellules de Kupffer. Enfin il est important de noter que les hépatocytes sont les premiers producteurs des molécules de la phase de réponse aigüe (« acute phase response » en anglais) et du système du complément de l'organisme [141]. Cette aptitude permet ainsi aux hépatocytes d'exercer une activité immunitaire au-delà des limites architecturales du foie.

Les cellules de Kupffer sont quant à elles capables de capturer les antigènes dans la circulation sanguine, les différenciant ainsi des autres macrophages de l'organisme qui fixent ces mêmes antigènes mais en condition statique [141]. Une fois fixé, les antigènes sont internalisés et orientés vers les voies de clairance. Il a été montré que la destruction des antigènes n'était pas du fait de ces cellules de Kupffer mais plutôt des cellules leucocytaires, comme les cellules NK, recrutées par la suite [146]. Comme indiqué précédemment, les cellules de Kupffer sont également des présentatrices d'antigènes via leur expression des CMH I et CMH II ainsi que la production de facteurs de co-stimulation (Figure 10).

Finalement, un ensemble d'autres acteurs cellulaires ont un impact sur l'immunité hépatique. Ainsi les cellules stellées (cellules de Ito), des cellules dendritiques ou encore des sous-populations

lymphocytaires sont ainsi capables de conditionner des réponses contre les pathogènes. L'ensemble de ces réponses est néanmoins conditionné par le microenvironnement tolérogène du foie, constamment soumis aux antigènes issus de la circulation sanguine et des voies digestives.

C. La tolérance hépatique

52

Le foie joue un rôle central dans l'organisme. Il reçoit approximativement 1,5 litre de sang toutes les minutes en provenance du tractus gastro-intestinal via la veine porte ou de la circulation sanguine via l'artère hépatique. Ces apports sanguins sont chargés à la fois d'antigènes et de produits de la flore commensale qui ne représentent pas de danger particulier mais également de potentiels pathogènes (virus, bactéries, parasites, cellules cancéreuses) qui doivent être captés, interprétés et éliminés rapidement. La distinction entre ces deux apports nécessite au foie la mise en place d'un mécanisme et d'un seuil de tolérance (Figure 10). Cette capacité tolérogène du système immunitaire hépatique fut décrite pour la première fois en 1969 par Calne qui travaillait sur les allogreffes de foie chez le porc [147]. Une tolérance déficiente ou détournée peut par ailleurs être associée aux développements de pathologies auto-immunes (cholangite, hépatite, cirrhose) et d'infection persistante (HBV, HCV, *Plasmodium falciparum*) [148,149].

Parmi les cellules hépatiques tolérogènes, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) jouent un rôle central de par leur capacité détruire ou inactiver les lymphocytes T CD4+ et CD8+, à induire la maturation de lymphocytes T régulateurs (Treg) et donc à limiter la mise en place d'une réponse adaptative et mémoire. Le foie contient une multitude de CPA, parmi lesquelles on retrouve une majorité cellules dendritiques myéloïdes (mDC), plasmacytoïdes (pDC), mais également des cellules résidentes comme les cellules de Kupffer, les cellules endothéliales sinusoidales ou les cellules de Ito.

Les cellules dendritiques, dites tolérogènes, conservent leur capacité de présentation des antigènes au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Néanmoins cette présentation est accompagnée de la sécrétion de cytokines suppressives (IL-10, IL-27, TGF- β) ou de récepteurs inhibiteurs comme le PD-L1 (programmed death ligand-1). Cette présentation particulière mènera une perte des facteurs de stimulation, l'apoptose des lymphocytes T ciblés ou à la maturation des Treg. Ces cellules Treg sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD4, CD25 et FoxP3 mais aussi par la synthèse d'une enzyme, la IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), qui catalyse le tryptophane pour former la kynurénine, un facteur immunosuppresseur [150].

Les cellules de Kupffer sont également capables d'effectuer cette présentation mais celle-ci est fréquemment associée à une surexpression des expressions ou sécrétions du ligand FAS (FasL), de PD-L1, d'IL-10, de TGF- β ou encore de la prostaglandine E2 (PGE2) et d'IDO, résultant ainsi de la suppression des lymphocytes T activés et de l'induction de Treg [151,152].

Les cellules endothéliales et les cellules de Ito, moins décrites pour leur rôle dans l'immunité innée, sont également capables de présenter des antigènes et d'exprimer des molécules de co-stimulations pour les T CD4+ et T CD8+ menant à leur différenciation en Treg ou à la tolérance. A nouveau les productions d'IL-10, de TGF- β de PD-L1 et de PGE2 sont décrites [144,153,154].

La présence permanente de différentes populations et sous populations de lymphocytes sentinelles permet d'assurer une détection rapide et effective de pathogènes et d'engendrer les réponses adaptées [155]. Parmi ces lymphocytes, on retrouve les cellules NK, les cellules NKT, les lymphocytes $\gamma\delta$ ou encore les MAIT (mucosal-associated invariant T). Ces lymphocytes T innés possèdent des aptitudes non spécifiques de reconnaissance des pathogènes ou des cellules cancéreuses (incluant les glycosylations ou les pyrophosphates). Leur réactivité et leur capacité à stimuler et promouvoir la maturation des cellules

dendritiques, des lymphocytes B, CD4+ et CD8+, des neutrophiles ou des macrophages les rendent centraux dans le phénomène de rupture de tolérance hépatique.

Les cellules NK sont les plus abondantes et représentent 50% des lymphocytes hépatiques [156]. Le recrutement de ces cellules au niveau hépatique se fait notamment via les cellules dendritiques et les hépatocytes ainsi que par la sécrétion d'IFN, d'IL-12, d'IL-15 et d'IL-18 [157]. Caractérisées par leurs expressions du marqueur CD56, on distingue deux populations, les lowCD56 et les highCD56. Les lowCD56 ont une capacité cytotoxique plus prononcée que les highCD56 qui sécrètent plus particulièrement des cytokines comme l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-10 avec pour objectif de polariser et de réguler les réponses immunitaires [158]. La cytotoxicité est quant à elle médiée par la sécrétion de granules cytolytiques (perforine, granzyme B) et du facteur TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), un inducteur d'apoptose [159]. L'activité des cellules NK est par ailleurs régulée par les niveaux d'expression de CMH de classe I sur les cellules infectées ou cancéreuses et des ligands stimulateurs ou inhibiteurs à la surface des cellules NK [160].

Les MAIT (mucosal-associated invariant T) humains représentent 20 à 40% des lymphocytes hépatiques [161]. Ils expriment un TCR invariant au niveau de la chaîne alpha (Va7.2-J α 33) et reconnaissent des ligands bactériens présentés sur un analogue du CMH de classe I, le MR1 [162]. Leur recrutement au niveau du foie est notamment assuré par l'expression de récepteurs de chémokines, comme les CCR5, CCR6, CCR9 ou encore CXCR6 [163]. Leur rôle dans la reconnaissance de monocytes ou de cellules dendritiques infectés par divers bactéries et champignons a été démontré [162]. Une fois activés, ils produisent un ensemble de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-17A et l'IL-22 ainsi que le granzyme B pour détruire les cellules infectées [164].

Les cellules NKT se composent de deux classes chez l'homme et la souris bien que des différences existent entre les deux espèces [165]. Les NKT de type 1, aussi appelés NKT invariants (iNKT) représentent environ 2% des lymphocytes T hépatiques chez l'homme, contre 50% chez la souris. La plupart des NKT hépatiques (10-15%) sont de type 2 et expriment une variété de TCR reconnaissant des glycolipides présentés sur un analogue du CMH de classe I, le CD1d [166]. Ils sont recrutés au niveau hépatique dans un contexte de réponse pro-inflammatoire Th1, via leur expression des récepteurs CXCR3 et CXCR6 [167]. Une fois actifs, les lymphocytes NKT produisent un panel de cytokines Th1 (IFN- γ et TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13), Th9 (IL-9), Th17 (IL-17A et IL-22) et Treg (IL-10) de façons simultanées ou non. Ces sécrétions contribuent à l'activation des lymphocytes T, des cellules NK ou encore des macrophages et des cellules dendritiques [168,169].

Enfin les lymphocytes T $\gamma\delta$ représentent 1 à 5% des lymphocytes T du sang périphérique mais peuvent être fortement enrichis au niveau d'un site infectieux. Ils sont divisés en trois groupes en fonction de l'expression de leur chaîne δ et reconnaissent des facteurs de stress comme le MICA et le MICB ainsi que des glycolipides présentés par les analogues du CMHI, les CD1c et CD1d [170,171]. Leur expansion a été montrée dans plusieurs infections par les virus HIV et HBV [172,173]. Leur activation contribue à l'activation et la différenciation des lymphocytes T et B, des cellules dendritiques ou encore des neutrophiles [174].

D. Les modèles d'étude pour le foie

Les cellules primaires, bien que présentées comme le modèle de référence sont difficilement obtenues et restent dépendantes de l'historique, souvent mal documenté, du patient dont elles proviennent. L'entretien de ces cellules est par ailleurs délicat et des études ont montrées la perte rapide du statut différencié et de fait, des activités métaboliques de phase I et de phase II [175]. Les lignées cellulaires issues d'hépatocarcinome ou immortalisées sont déficientes sur certaines voies de signalisation de

l'immunité innée mais également sur certaines voies métaboliques. Une déficience du senseur d'ARN double brin, RIG-1 est ainsi décrite dans les cellules huh7 (hépatocytes issus d'un hépatocarcinome humain) et l'expression des cytochromes P450 est fortement réduite dans les cellules HepG2 (hépatocytes issus d'un hépatocarcinome humain) [139,176,177]. Enfin, au-delà des déficiences métaboliques et immunes de ces modèles, la complexité du système hépatique nécessite la reproduction d'un environnement pluricellulaire et d'un agencement particulier.

Depuis 15 ans, les technologies utilisant les cellules souches pluripotentes ont été largement développées. Elles permettent d'avoir un accès illimité à des cellules de différents tissus. Des hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires et présentant les mêmes caractéristiques que les cellules primaires ont ainsi été développées [178–181]. Ces cellules ont notamment été utilisées dans le cadre de l'infection par le virus de l'hépatite C. Elles supportent la réplication complète du virus et sont capables d'induire des réponses cellulaires spécifiques [182]. L'utilisation des cellules embryonnaires présentant des problèmes d'éthique, les récentes avancées technologiques permettent à présent d'utiliser les hiPS (cellules souches pluripotentes induites) pour la différenciation en hépatocytes. Ces cellules différenciées présentent la plupart des caractéristiques physiques et métaboliques des hépatocytes primaires [183]. De la même façon, ces cellules ont été utilisées pour l'étude du virus de l'hépatite C [184,185]. Par ailleurs, elles permettent d'étudier la variabilité génétique de chaque individu, un point majeur dans l'efficacité des thérapies hépatiques.

La limitation majeure de ces différents modèles se situe enfin dans la diversité des populations cellulaires hépatiques et la nécessité avérée de leurs interactions pour reproduire un microenvironnement hépatique fonctionnel [186].

Les premiers travaux de co-culture entre hépatocytes et cellules non parenchymales datent de la fin des années 1970s avec comme objectif premier de maintenir les fonctionnalités hépatiques [187]. Bien que

dépendant de leur disponibilité, les cellules non parenchymales issues de biopsies humaines se sont montrées supérieures en terme de fonctionnalité en comparaison des cellules dérivées [188]. Un ensemble de système 3D de co-culture sont maintenant commercialisés [189]. La plupart d'entre eux utilisent une approche par sandwich ou la formation de sphéroïdes car ils favorisent le maintien du statut polarisé des hépatocytes (via des interactions cellulaires étroites). La formation de sphéroïdes est notamment permise par l'utilisation de matrice. Aussi appelées hydrogel, ces matrices non adhésives sont composées d'éléments de la matrice extracellulaire et sont décrites pour maintenir la polarité et la fonctionnalité des hépatocytes [190]. Ces supports représentent néanmoins un problème pour l'accessibilité des nutriments et des drogues mais également pour l'isolement ultérieur des populations cellulaires. Une autre approche pour la formation des sphéroïdes consiste en l'utilisation du système de "drop gravity" (Figure 11).

Figure 11. « Système gravity drop ».

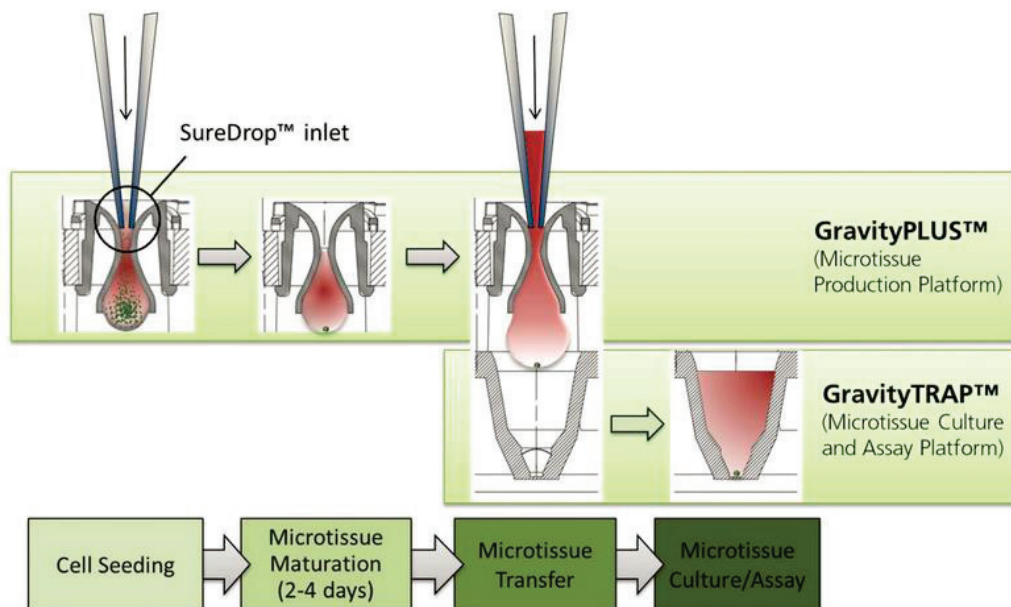


Figure issue de <http://www.insphero.com/technology/scaffold-free-3d-technology>

Cette technologie utilise la capacité théorique des cellules à reformer une configuration 3D en l'absence d'adhésion à un substrat donné. Les sphéroïdes ainsi formés avec les hépatocytes présentent des interactions cellulaires marquées, une conservation des polarités hépatocytaires mais également la formation des canalicules biliaires [191]. Par ailleurs cette technologie permet d'obtenir des sphéroïdes hépatiques de tailles homogènes, avec un nombre défini de cellules puisqu'un seul tissu hépatique est formé par goutte de milieu. Enfin, ce modèle permet de co-cultiver les hépatocytes avec des cellules non parenchymales telles que les cellules de Kupffer ou les cellules sinusoidales endothéliales [186].

Pour finir sur les modèles hépatiques, les problématiques actuelles se portent sur l'inclusion d'un modèle hépatique au sein d'un modèle plus représentatif de l'organisme étudié mais aussi sur l'aspect architectural du système hépatique ou encore sur l'impact des infiltrations de cellules immunitaires (non discuté ici). Si des méthodes comme le bio-printing sont actuellement développées pour mimer l'architecture hépatique (Organovo), les avancées technologiques permettent à présent d'inclure les différents modèles actuels dans des systèmes de micro-fluidiques multi-organes (TissUse). Chaque modèle tissulaire est ainsi relié aux autres par des systèmes de canaux. Un flux continu de milieu est ainsi apporté aux différents tissus et l'impact d'une production systémique de facteurs par un tissu sur les autres peut être évalué dans un contexte infectieux, une étude d'efficacité ou encore de toxicité.

III. PARTIE III : Vaccin contre le virus de la fièvre jaune

A. Traitements existants

Il n'existe pas de traitement antiviral spécifique contre le virus. Compte tenu de la rareté des cas d'infections, de l'imprévisibilité des épidémies et des installations hospitalières précaires dans les zones endémiques, il est difficile de prévoir et d'optimiser les soins. Les consignes se limitent à l'utilisation de supports nutritifs, oxygénatifs ou sanguins et à l'administration de drogues pour limiter les hémorragies ou les réactions inflammatoires excessives. L'utilisation de corticostéroïdes a été décrite comme bénéfique pour les individus développant des formes viscérotropiques après la vaccination [192].

L'administration de sera produits sur chevaux, macaques ou chimpanzés à des singes rhésus après 1 à 3 jours d'infection par une souche sauvage du virus de la Fièvre jaune est protectrice. En revanche, cette administration s'avère inefficace une fois la pathologie déclarée [193]. Les essais d'immunothérapies passives chez l'homme sont rares et n'ont été utilisées qu'en dernier ressort, sans efficacité, que ce soit après une infection sauvage ou après le développement d'une forme sévère post vaccination [194,195]. De la même façon, l'administration d'un inducteur des IFNs, l'acide polyinosinique : polycytidilique (poly I : C), ne s'est révélée efficace chez le singe rhésus que dans les 8 heures suivants ou précédents une infection avec le virus sauvage. Enfin, l'utilisation récente d'un adénovirus de type 5 portant le gène IFN- α , dans un modèle hamster, a montré son efficacité en une seule injection et jusqu'à 2 jours après le challenge. Une telle stratégie pourrait alors être envisagée dans le cadre d'une épidémie, le temps de la mise en place de la campagne vaccinale [196]. Des drogues ciblant des facteurs viraux et de l'hôte ont également été étudiées [197,198]. De précédents travaux utilisant la ribavirine, résultant en une diminution des concentrations intracellulaires de guanosine triphosphate (GTP), ont montré son efficacité *in vitro* mais à des concentrations trop élevées pour être appliquées *in vivo* [199]. Finalement, des ARN interférents (ARNi) ont été utilisés *in vitro* et *in vivo* chez la souris. En ciblant les protéines E et

NS1, 12 heures avant challenge viral, les souris sont protégées [200]. Aucune étude chez l'homme n'a à l'heure actuelle été menée et les formulations et voies d'administration de ces ARN restent à déterminer.

B. Historique du vaccin

Le vaccin contre la fièvre jaune est un vaccin vivant atténué. Il s'agit du seul produit actuellement autorisé pour l'immunisation contre ce pathogène.

60

Le vaccin est dérivé d'une souche sauvage isolée du sang d'un patient, nommé Asibi, en 1927. Il a été obtenu au début des années 1930 par des passages empiriques sur tissus animaux, cultures cellulaires et moustiques [201,202]. Ce procédé a permis la sélection progressive de variants ayant des propriétés biologiques altérées par rapport à la souche originelle et, grâce à des cultures sur embryons de souris broyés, ne présentant aucune neuroadaptation. Après 18 passages sur embryons de souris, le virus fut cultivé durant 40 cycles sur embryons de poulet. A partir du 59^{ème} passage, le virus, désigné à ce stade comme sous culture 17D, fut cultivé sur embryons de poulet auxquels les cerveaux et cordes spinales avaient été retirés. Les pertes de neurovirulence et du viscérotropisme sont par la suite observées entre les passages 89 et 114 pour le singe alors que la perte de neurovirulence chez la souris n'a été observée qu'à partir du passage 114 jusqu'au passage 176. Les premiers essais chez l'homme furent menés en 1936 sur des sujets non immunisés ou ayant déjà rencontré le virus. A ce stade des virus au passage 227 et 229 furent administrés [203]. Le vaccin est dit polyclonal car composé d'un ensemble de sous type. Des variations de séquences et de taille de plages induites ont ainsi été historiquement observées [204].

1. Marqueurs de l'atténuation

La première comparaison entre les séquences des souches vaccinales et sauvages a été faite par Hahn. Sur les 10862 nucléotides, 67 changements ont été observés résultant de 31 mutations sur les 3411 acides aminés [205]. La majorité des changements se trouvent au niveau des gènes E, NS2A et NS2B ainsi

que dans la région 3' non codante. En comparant l'ensemble des souches vaccinales 17D-204 et 17DD, seulement 20 changements au niveau des acides aminés sont conservés [12] (Figure 12).

Figure 12. Mutations en acides aminés entre la souche YFV Asibi et la souche YFV 17D.

Nucléotides	Gènes	Acide aminé	YFV Asibi	YFV 17D
854	M	36	Leu	Phe
1,127	E	52	Gly	Arg
1,482		170	Ala	Val
1,491		173	Thr	Ile
1,572		200	Lys	Thr
1,870		299	Met	Ile
1,887		305	Ser	Phe
2,112		380	Thr	Arg
2,193		407	Ala	Val
3,371	NS1	307	Ile	Val
3,860	NS2A	118	Met	Val
4,007		167	Thr	Ala
4,022		172	Thr	Ala
4,056		183	Ser	Phe
4,505	NS2B	109	Ile	Leu
6,023	NS3	485	Asp	Asn
6,876	NS4A	146	Val	Ala
7,171	NS4B	95	Ile	Met
10,142	NS5	836	Glu	Lys
10,338		900	Pro	Leu
10,367	(3' NCR)		U	C
10,418			U	C
10,800			G	A
10,847			A	C

Protéine d'enveloppe
8 mutations

Protéines non structurales
8 mutations

Région non codante
4 mutations

Description des 20 mutations en acide aminé communes entre toutes les souches dérivées de la souche YFV 17D. Figure traduite et adaptée de [12].

La protéine E qui contient les caractéristiques nécessaires à l'entrée du virus compte 8 mutations. Celles-ci sont observées dans les trois régions de la protéine. Parmi les 8 mutations, 4 entraînent des changements dits non conservateurs (E52 Gly→Arg, E200 Lys→Thr, E305 Ser→Phe et E380 Thr→Arg). La conservation de ces acides aminés dans les souches sauvages séquencées suggèrent leur rôle dans l'atténuation [204]. Les mutations E52, E173 et E200 sont localisées dans le domaine II de la protéine

d'enveloppe et peuvent jouer un rôle dans l'interaction avec le récepteur et/ou les propriétés d'attachement du virus. Par ailleurs une réversion sauvage de la mutation E173 a été observée dans le cadre d'une neuroadaptation de la souche 17D [206,207]. Des mutations présentes dans le domaine II de la protéine d'enveloppe ont montré des effets variables sur le neurotropisme et le viscérotropisme de certains virus comme le JEV [208]. D'autres mutations, présentes dans le domaine III, comme la E305, la E380 ou encore la E299, sont potentiellement impliquées dans le tropisme du virus. [115,206,207]. Une mutation E303, proche de la position E305 a été identifiée dans une souche isolée du cerveau d'un enfant décédé d'une maladie neurotropicque associée à la vaccination (YEL-AND). Bien qu'associée à deux autres mutations E155 et NS4B76, cette mutation peut expliquer la réversion vers un phénotype neurovirulent [209]. La mutation E380 altère le motif RGD du domaine III, essentiel à la liaison du virus aux intégrines cellulaires. La nouvelle composition, Arg-Gly-Asp (contre Thr-Gly-Asp pour Asibi) pourrait expliquer une modification des capacités d'attachement du virus sans pour autant la supprimer ou empêcher la réplication [205]. Enfin la présence d'une Arginine en position E380 permet d'augmenter les capacités de liaison du virus 17D aux glycosaminoglycans, limitant ainsi la dissémination et expliquant l'atténuation [210].

Les protéines non structurales présentent quant à elles 11 changements d'acides aminés. Une dans la protéine NS1, quatre dans la protéine NS2A, une dans NS2B, NS3, NS4A, et NS4B ; et enfin deux dans NS5. Les mutations de la protéine NS2A sont associées à une limitation de l'assemblage et du relargage des particules infectieuses [211]. Les mutations des protéines NS3 et NS5 influenceraient la réplication virale [12].

Enfin la région 3' non-codante, décrite pour son rôle dans la réplication, abrite une mutation qui contribue à l'atténuation. Une variabilité dans la longueur de cette séquence et dans le nombre de séquences répétées est en effet variable selon les souches virales [33].

Bien que les mutations soient identifiées, les déterminants associés au viscérotropisme sont encore inconnus. La principale difficulté réside dans la disponibilité d'un modèle de singe pour étudier le viscérotropisme. Le modèle « golden hamster » développe des hépatites mimant les symptômes de la fièvre jaune humaine. La nécessité d'utiliser une souche adaptée sur foie pour obtenir un viscérotropisme dans ce modèle rend l'identification des déterminants difficiles. Néanmoins, la souche adaptée présente des mutations de la protéine d'enveloppe et dans les protéines NS2A et NS4B par rapport à la souche Asibi permettant d'orienter les études vers ces régions spécifiques [212,213]. Les modèles de souris déficiente en récepteurs des IFN- α/β (souris A129) ou pour le facteur de transcription STAT1 (souris STAT129) développent des formes viscérotropiques. Après plusieurs passages sur cellules HeLa, le virus Asibi perd le neurotropisme et le viscérotropisme. Ces pertes se décrivent par l'apparition de 10 mutations, 5 dans la protéine E, une dans la protéine NS2A et 3 dans la protéine NS4B à l'instar des mutations observées pour la souche adaptée au modèle hamster [214]. Trois mutations de la protéine d'enveloppe, E27, E155 et E331 sont d'ailleurs partagées entre ces souches [212]. Finalement, la perte de dissémination du virus 17D dans les tissus du moustique vecteur *Aedes aegypti* a également été étudiée par l'utilisation de virus chimères Asibi et 17D. La présence du domaine III de la souche vaccinale semble essentielle pour la perte de dissémination bien que d'autres facteurs, et pas seulement génétiques, soient probablement impliqués [215,216].

2. Modèles animaux

Comme décrit précédemment, les singes d'Asie (*Macaca Mulatta* et *Rhesus*) et d'Amérique du Sud développent des infections létales associées à une hépatite fulminante, des atteintes rénales et cardiovasculaires présentant des similitudes avec la pathologie humaine [88]. Bien qu'aucune phase de rémission n'ait été décrite et que la cinétique de la pathologie soit réduite à 5 ou 6 jours, le singe représente un acteur majeur du développement vaccinal. Son utilisation est de plus en plus limitée en raison d'une augmentation de la réglementation et de leur coût élevé. Des modèles alternatifs sont

utilisés à la fois dans les validations et contrôles des productions vaccinales mais également dans la compréhension des mécanismes d'atténuation, de pathogénèse et des réponses immunitaires. Le produit vaccinal final subit ainsi un dernier test d'innocuité par injection intra crâniale chez le souriceau. Ce dernier présente en effet une létalité variable suivant les souches utilisées [217]. Un modèle de souris déficientes pour les récepteurs des IFN- α/β (souris A129) ou pour le facteur de transcription STAT1 (souris STAT129) développent des formes viscérotropiques [218–220]. Le modèle « golden » hamster développe des hépatites mimant les symptômes de la fièvre jaune humaine. L'utilisation d'une souche adaptée sur foie est cependant nécessaire pour observer la pathologie [212,213].

3. Vaccins commerciaux

Le marché actuel représente 60 millions de doses annuelles. Dérivées de la même souche 17D, deux souches vaccinales sont actuellement utilisées pour les productions vaccinales. Ces productions sont faites sur œufs embryonnés de poule. Les souches 17D-204 et 17DD, dérivées respectivement des passages 204 et 195 de la souche originale, sont produites en grande quantité en France, au Brésil et au Sénégal. La souche 17DD, actuellement au passage 286 est utilisée par Bio-Manguinhos pour la vaccination au Brésil.

La souche 17D-204, actuellement utilisée entre les passages 233 et 239, est incluse dans les vaccins Stamaril et YF-VAX produits par Sanofi Pasteur. D'autres producteurs utilisent également la souche 17D-204 comme résumé dans la figure 13 [12]. Un vaccin, nommé 17D-213-77, produit en 1977 est un stock de référence disponible pour d'éventuels nouveaux fabricants et pour répondre à des situations d'urgence exceptionnelles [221,222].

65



Le vaccin est administré par voie sous-cutanée. Il est commercialisé sous forme lyophilisée et doit être repris en eau stérile ou dans une solution saline immédiatement après reconstitution. Une dose de 3,7 à 4,7 log₁₀ PFU (plaque forming unit) est injectée [223]. La vaccination se fait dans un centre accrédité, environ 10 jours avant le séjour en zone endémique et pour une protection officielle de 10 ans. Une administration simultanée à d'autres vaccins comme le vaccin poliomyélite, le vaccin hépatite B ou encore les vaccins tétanique, diphtérique et coquelucheux n'est pas contre-indiquée.

4. Effets secondaires de la vaccination

La vaccination est fortement recommandée pour tout séjour en zone endémique. Elle peut être obligatoire chez les personnes non vaccinées se rendant d'une zone endémique vers une zone réceptive, abritant des réservoirs du moustique vecteur.

Des variabilités dans les réponses ont été observées et des contre-indications à la vaccination sont émises pour les enfants de moins de 9 mois, les personnes immunodéprimées et les femmes enceintes [224]

Les enfants de moins de 9 mois ont en effet présenté des réponses immunitaires plus faibles et un risque accru d'encéphalites à la suite de vaccination [222,225]. Une étude menée au Pérou en 2005 a par ailleurs montré que les séroconversions chez les jeunes enfants étaient de 5 à 8 % plus basses que celles observées chez l'adulte après vaccination par le vaccin YF-VAX ou le vaccin ArilVax [226]. Dans un essai clinique impliquant des jeunes enfants et des personnes âgées (plus de 60 ans), aucune différence de séroconversion n'a été observée [222,225].

En 1993, une étude prospective sur les taux de séroconversion chez la femme enceinte a été menée. Seulement 38,6% des femmes ont développé des anticorps neutralisants contre 81,5 à 93,7% dans les autres groupes [227]. Bien qu'aucune étude n'ait démontré d'effets indésirables chez le fœtus ou la femme enceinte, le risque accru d'encéphalite chez le jeune enfant limite l'utilisation du vaccin chez la femme enceinte [12].

Les personnes immunodéficientes présentent également un risque important. L'absence de réponse immunitaire présente le double risque de ne pas contrôler l'injection d'un pathogène vivant, même atténué, et de ne pas engendrer de réponse protectrice suite à la vaccination. Les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) présentent en effet une déclinaison du nombre de cellules CD4+. Une forme encéphalique de la pathologie a été reportée chez un patient VIH+ [228]. De

plus, seulement 70% des individus vaccinés développent une réponse neutralisante et dans un temps plus important même si l'amélioration des traitements antirétroviraux permet d'augmenter l'efficacité de la vaccination [229].

a) Effets adverses

Toutes formes d'effets indésirables doivent être rapportées au niveau des centres régionaux de pharmacovigilance (Ministère de la santé et de la protection sociale).

En plus des inflammations au niveau du site d'injection, des raideurs cervicales, maux de tête ou fatigues excessives sont observés entre le 4^{ème} et 7^{ème} jour suivant la vaccination. Ces observations sont classiquement associées à la période de virémie, l'activation des populations lymphocytaires et la production de cytokines pro-inflammatoires [123]. Une augmentation des taux sériques d'AST et d'ALT de 3,5% à 4,6% est observée dans les 11 jours suivant la vaccination avant un retour à la normale. En comparaison d'un groupe placebo, le risque pour un groupe vacciné de développer des effets secondaires locaux ou systémiques est en moyenne de 2,5 à 7,5% plus élevé [12].

Des formes sévères d'effets secondaires sont également rapportées en raison de réactions allergiques (aux protéines d'œufs notamment) qui apparaissent dans les 20 minutes. Aux Etats-Unis, l'incidence d'une telle forme de réaction est inférieure à 2 cas pour 100 000 doses injectées (1,8 pour 100 000).

b) Effets adverses neurotropiques et viscérotropiques

Depuis 2001, de rares cas de pathologies neurotropes et viscérotropes sont rapportés après vaccination [230]. Ces cas sont définis comme maladie viscérotropique associée à la vaccination (YEL-AVD) ou maladie neurotropique associée à la vaccination (YEL-AND).

Entre 1989 (étude rétrospective) et 2011, 113 cas de YEL-AND ont été déclarés. Pour 66 % d'entre eux, il s'agit d'encéphalites ou de méningites. L'incidence de cette forme est de 0,4 pour 100 000 doses

infectées. Cette incidence est plus élevée chez le jeune enfant avec une moyenne de 0,5 à 4 cas pour 1000 doses injectées. Le taux de mortalité est alors de 2,7%. Les cas sont apparus de façons variables entre 2 et 24 jours après la vaccination. L'encéphalite est due à une neuroinvasion et une réplication de la souche vaccinale. Le virus a en effet été isolé dans le cerveau d'un enfant de 3 ans décédé d'une encéphalite [231] et le génome détecté par PCR dans deux cas d'encéphalite et de méningite [12]. Enfin des maladies dite auto-immunes comme le syndrome de Guillain-Barré et l'ADEM (Acute disseminated encephalomyelitis) sont également décrites et impliquent les IgM et les lymphocytes T [232,233].

Les formes YEL-AVD correspondent à une infection importante par le virus 17D du foie et d'autres organes. Cette pathologie mime l'infection naturelle et présente un taux de mortalité important de 63%. L'incidence n'est cependant que de 0,4 pour 100 000 doses infectées. En Mars 2011, le nombre total de cas rapportés suite à la vaccination était de 65 individus. Des cas ont été reportés suite à la vaccination par la souche 17D-204 (32 cas) et la souche 17DD (32 cas) plus un cas dont la souche utilisée n'est pas connue. Les premiers symptômes apparaissent en général 4 jours après l'inoculation. Une augmentation des taux sériques d'ALT, d'AST, de bilirubine ou encore de créatinine est observée. Par ailleurs une diminution du nombre de plaquettes et une augmentation de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires sont décrites. Le virus a été retrouvé dans le foie, le cœur et les reins. Les taux d'anticorps neutralisants sont de plus anormalement élevés par rapport aux observations post-vaccinales [234]. Les mutations de la souche vaccinale ne sont pas mises en cause. Une analyse des séquences de 12 productions de Stamaril entre 1990 et 2002 n'a démontré aucune variabilité [235]. L'âge avancé et des déficiences immunitaires sont associés à un risque plus élevé de développer une YEL-AVD. En effet, environ 17% des cas (11/65) présentaient une maladie auto-immune comme le lupus érythémateux, la maladie d'Addison, le lupus cutané, la maladie de Crohn ou encore des hypothyroïdies [234,236]. Néanmoins, les maladies auto-immunes ne représentent que 3% de la population des Etats-Unis,

suggérant qu'une association de différents facteurs soit impliquée dans le déclenchement de cette forme sévère.

C. La réponse immunitaire à la vaccination

La vaccination déclenche une virémie. De la même façon que pour l'infection naturelle, elle est observable dès le 4^{ème} jour et pour une durée de 1 à 3 jours [123]. Les anticorps neutralisants apparaissent dès les 8^{ème} et 9^{ème} jours suivant la vaccination. Tout comme pour la virémie, les taux d'anticorps induits sont moins importants que lors d'une infection naturelle. Ces observations pourraient s'expliquer par une réplication moindre et donc une présentation d'antigènes viraux limités suite à la vaccination [222]. La faible virémie justifie par ailleurs les risques limités de transmission materno-fœtal et d'encéphalites YFV-AND chez l'adulte (« Yellow Fever vaccination-associated neurotropic disease ») suite à la vaccination [12]. Néanmoins, la séroconversion est de 100% pour les personnes vaccinées et seulement deux cas d'infection par le virus suite à la vaccination ont été répertoriés. Par ailleurs, une étude rétrospective a permis de montrer que 80% des individus vaccinés conservent une réponse efficace après 38 années [122].

1. Anticorps neutralisants

Les réponses neutralisantes, considérées comme le marqueur de l'efficacité de la vaccination contre la fièvre jaune, sont classiquement plus faibles que celles induites lors d'une infection naturelle. Le taux minimal d'anticorps induit après vaccination a ainsi été mesuré chez le singe rhésus par des études de challenge après immunisation. Une valeur de réduction des tailles de plages supérieure à 0.7 LNI (Log neutralization index) est considérée comme protectrice. Cette valeur est utilisée comme « surrogat » de protection et recommandée par la FDA [226]. Des immunisations passives peuvent également être utilisées pour mesurer le taux d'anticorps neutralisants nécessaire pour protéger contre une infection naturelle. Ainsi des valeurs de PRNT₅₀ (Plaque reduction neutralization titers) de 40 ou plus sont décrites

comme protectrices dans un modèle de hamster. Cette méthode détermine le taux d'anticorps nécessaire pour diminuer de moitié les plages d'infection. Des protections partielles sont observées avec des valeurs de PRNT₅₀ de 10 ou 20 [196].

2. Réponses cellulaires

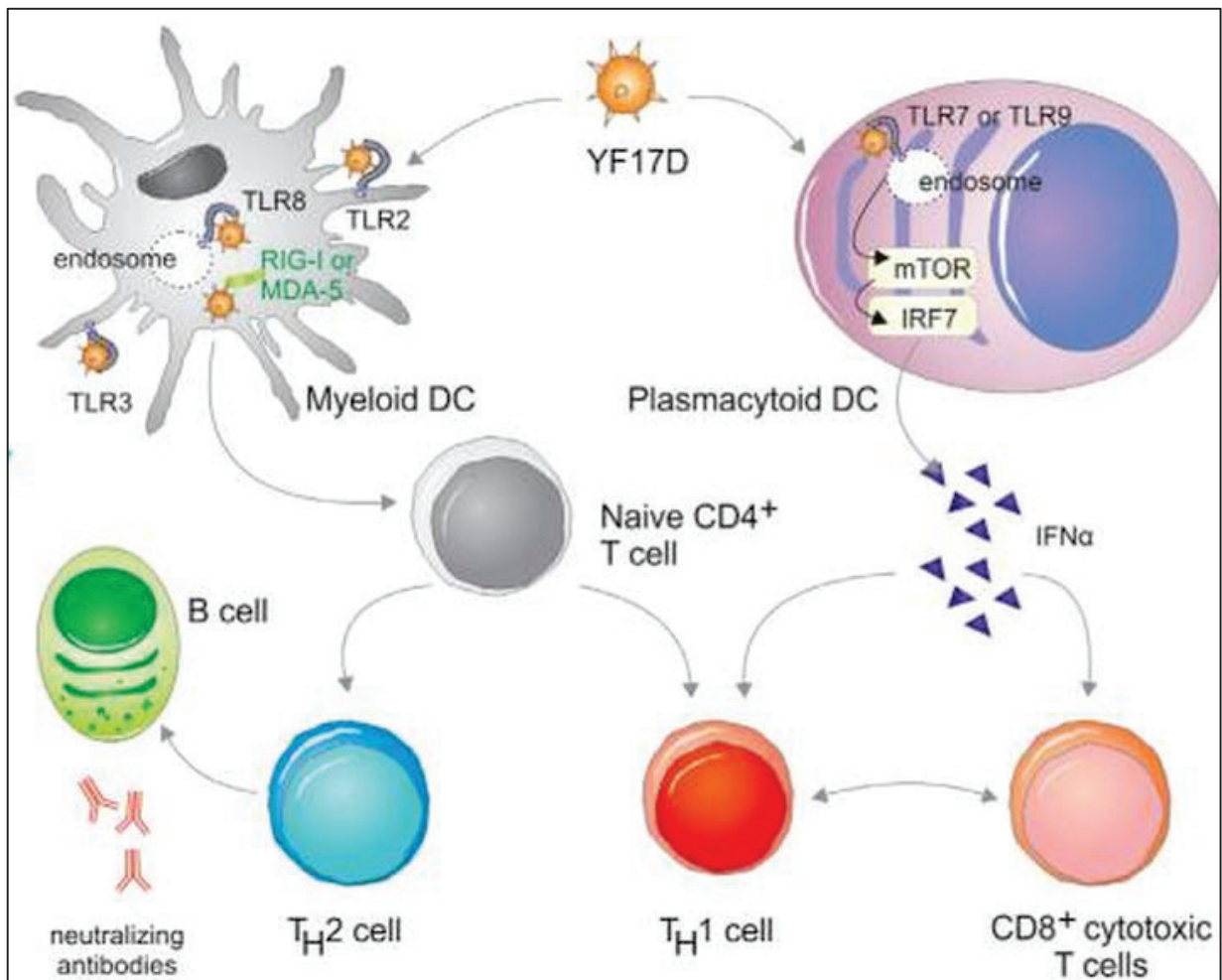
Le vaccin induit des réponses CD4+ (Th1/Th2) helper qui participent au développement des réponses cytotoxiques CD4+ et CD8+ mais également à la production d'anticorps neutralisants. Tout comme pour les réponses anticorps, l'induction des réponses cellulaires par le virus de la fièvre jaune peut être modulée par l'existence d'un environnement immunitaire déjà actif [237]. Ces réponses ne sont que très peu caractérisées. Il est établi qu'une réponse T spécifique, polyclonale et de longue durée (plusieurs années) est induite dès la première semaine de la vaccination. La réponse CD4+ Th1/Th2 apparaît plus rapidement que la réponse CD8+, avant les inductions de cellules CD45RA+ T mémoires [58,124,238]. L'activation des cellules CD8+ est caractérisée par l'expression en surface des marqueurs CD38, CD127, CCR7 et HLA-DR et par l'induction de protéines cytotoxiques comme le Ki-67, la perforine ou le granzyme B. Une perte de l'expression du marqueur anti-apoptotique Bcl-2 est également observée, suggérant une augmentation de la sensibilité à l'apoptose de ces cellules. Après 2 à 4 semaines, les marqueurs d'activation sont progressivement supprimés et les cellules T CD8+ se différencient en cellules T mémoires exprimant les marqueurs CD127, Bcl-2, and CD45RA. Ces cellules mémoires sont capables de produire de multiples cytokines comme l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL2 ou encore le MIP-1 β , de proliférer après une stimulation et d'induire une protection de longue durée contre les réexpositions au virus de la fièvre jaune [238].

3. Réponse innée

La mise en place d'une réponse immunitaire innée est un aspect primordial dans l'infection par le virus de la Fièvre jaune. Elle confère une protection relative immédiate contre le pathogène et permet

l'initiation des réponses cellulaires et humorales, adaptatives et mémoires [124,239,240]. Les approches par système biologique permettent maintenant d'identifier les gènes régulés suite à la vaccination. Près de 125 gènes ont été identifiés dans différentes études comme induits par la vaccination [124,239–242]. Durant les premiers jours de la vaccination, une forte réponse innée est induite avec un plateau atteint après 7 jours. Cette réponse permet une protection immédiate, évitant une réplication trop importante, mais également la stimulation d'une réponse adaptative impliquant les lymphocytes T CD4⁺ (Th1/Th2) et la rapide activation des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ [58] (figure 14).

Figure 14. Réponse immunitaire suite à la vaccination



Issue de [243]

Un ensemble de réponses comme la détection par les Toll like récepteurs (TLR), la détection par les non-TLR, la réponse IFN, l'activation des cellules NK ou encore la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires apparaissent durant la phase de réplication du virus. L'analyse des signatures transcriptionnelles induites après vaccination chez l'homme a montré une forte réponse interféron de type I, l'activation de l'inflammasome et des facteurs du complément [124]. Des IFNs sont détectables dans le sérum de patients vaccinés environ 24h après l'apparition de la virémie. La synthèse des IFNs induit l'expression d'un ensemble de protéines avec des activités antivirales ou anti-répliquatives. La synthèse de PKR (dsRNA-activated protein kinase), OAS2, OAS3, de TRIM5 (tripartite motif-containing protein 5), EIF2AK2, MX1 ou encore MX2 ont ainsi été décrites [242]. De même, un taux élevé de l'enzyme 2', 5'-oligoadenylate synthétase (2', 5'-oas), induite par les IFNs, a été identifiée dans les lymphocytes B et T de ces patients [244]. L'IFN- γ , un interféron de type II, est également important dans l'inhibition de la virémie et de la nécrose hépatique chez le singe [245]. Un lien avec l'établissement de la réponse adaptative a également été évoqué [246].

Depuis 2006, les connaissances sur l'immunité innée induite par le virus de la Fièvre jaune ont été améliorées. L'intégration d'un ensemble de données issues d'études cliniques vaccinales ont permis d'identifier certains marqueurs essentiels de la réponse [239]. L'infection par le virus de la fièvre jaune active plusieurs TLR à la surface (TLR2) ou dans les endosomes (TLR7, 8, 9 et TLR3) des cellules dendritiques [239]. Des activations des senseurs cytoplasmiques d'acide nucléique, comme MDA-5 et RIG-I, ont également été observées [240]. Une déficience en récepteur TLR2 augmente le temps de mise en place de la réponse chez la souris suite à la vaccination YF-17D [239]. Ces activations sont principalement associées à la voie MyD88 et au facteur de transcription NF- κ B. Des souris déficientes en MyD88 sont en effet limitées dans la production de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ [239]. Les voies

d'activation des cellules peuvent varier selon les populations cellulaires. De par leurs signalisations par les TLR7 et TLR9 et la voie mTOR, les cellules dendritiques plasmacytoïdes induisent des réponses IFN de type I et T cytotoxique importantes [247].

Les facteurs du complément comme les molécules C1Qa, C1Qb, C3AR1, and SERPING1 sont également induits suite à la vaccination. Ce système complexe a été décrit comme critique pour l'établissement des réponses T et B dans l'infection par le virus West Nile [248]. L'inflammasome, dont l'implication dépend en partie des TLRs et de facteurs de transcription comme IRF3 et NF- κ B, entraîne l'expression des caspases 1 et 5 ainsi que la production d'IL-1 β . Deux gènes impliqués dans le déclenchement de l'apoptose, FOXO3A and E2F1, sont également décrits et peuvent être reliés à l'induction plus précoce d'apoptose dans les cellules HepG2 suite à l'infection par la souche vaccinale 17D, un potentiel marqueur d'atténuation, par rapport à la souche sauvage Asibi [249]. Des gènes associés à l'activation de la réponse B sont détectés plus tardivement, en même temps que l'apparition des anticorps neutralisants.

L'ensemble de ces activations semblent être corrélées avec l'activation spécifique des facteurs STAT1, ETS2 ou IRF7 qui sont impliqués dans un grand nombre des inductions décrites. Ces études suggèrent ainsi la coordination de différentes branches de la réponse immunitaire innée pour la mise de cette réponse robuste suite à la vaccination [124].

Enfin l'activation de certains gènes corrèle avec l'intensité des réponses adaptatives induites. Ainsi un gène de la superfamille des récepteurs au TNF, le TNFRSF17, ciblé par le facteur activateur des cellules B (BAFF ou TNFSF13B) voit son induction corrélée à 100% avec les inductions d'anticorps neutralisants. Les inductions de deux autres gènes, EIF2AK4 (aussi appelé GNC2) et le facteur du complément C1qB, corréleraient avec l'amplitude de la réponse CD8+ sans prédire de l'efficacité de ces réponses [240].

IV. Objectifs du travail de thèse

Bien que la vaccination contre le virus de la fièvre jaune soit très efficace et que les réponses neutralisantes induites soient connues, la connaissance sur la pathogénèse reste limitée. Les données sont généralement obtenues sur des stades tardifs de la pathologie ou sur des modèles *in vivo* et *in vitro* qui présentent un certain nombre de limitations. Un ensemble d'études incluant des lignées immortalisées ou des cellules primaires ont été menées pour comparer les infections, les répliquations et les réponses induites par les souches sauvages et vaccinales du virus de la fièvre jaune au niveau hépatique. Ces études se sont à l'heure d'aujourd'hui focalisées sur les hépatocytes, les cellules de Kupffer et des cellules endothéliales. Les lignées hépatocytaires sont pour la plupart issues d'hépatocarcinomes humains ou immortalisées par le virus SV40. Les lignées HepG2, huh7, PH5CH8 et THLE-3 ont ainsi été utilisées. Si la répllication dans les lignées THLE-3 et huh7 n'a été démontrée qu'avec la souche vaccinale 17D [250], cette dernière se réplique mieux que la souche sauvage Asibi dans les cellules HepG2 [249,250] et inversement dans les cellules PH5CH8 [71]. Des informations contradictoires ont également été observées sur les macrophages U937 et les cellules de Kupffer primaires. La souche YF17D se répliquant mieux que la souche sauvage dans les cellules U937 et inversement dans les cellules de Kupffer [71,72,251]. Enfin une étude sur des cellules endothéliales de la lignée HUVEC, issues d'un cordon ombilical humain, a montré une infectivité supérieure de la souche sauvage Asibi [75].

L'induction des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , IL-6, l'IL-8, RANTES (CCL5) ou encore le TNF- α et les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-10 sont systématiquement induites plus fortement par la souche vaccinale dans les cellules hépatiques Ph5CH8 et HepG2, aux niveaux ARN et protéique [71,249]. En revanche les inductions dans les macrophages et les cellules endothéliales sont supérieures avec la souche sauvage Asibi [72,75]. Ces phénomènes inflammatoires sont également associés à la mise en place d'une réponse IFN. Les cellules HUVEC, infectées par les souches sauvages ou vaccinales voient en effet une transcription augmentée des gènes de réponse aux IFNs comme le gène

p78 et le gène Cig5 [75]. L'induction par les cellules endothéliales de l'IL-6 a notamment été étudiée pour son effet en aval sur les cellules de Kupffer et les hépatocytes. Une pré-stimulation des cellules de Kupffer par l'IL-6 a montré que la souche Asibi induisait une production réduite d'IL-10 et augmentait les productions d'IL-8, de RANTES et de TNF- α . Ce phénotype pro-inflammatoire associé à une limitation des régulations pouvant expliquer la pathologie observée au niveau hépatique [72]. Un phénomène semblable est également observé dans les hépatocytes PH5CH8 suite à une stimulation par l'IL-6. Une diminution de la réplication des deux souches et une limitation des mécanismes régulateurs avec la souche Asibi ont été observées [71].

Compte tenu des dégradations majeures observées au niveau hépatique, les marqueurs de mortalité cellulaire ont également été étudiés dans ces modèles. Si le TGF- β , précédemment décrit comme inducteur d'apoptose au cours de l'infection sauvage [101] n'est pas spécifiquement activé par l'une ou l'autre des souches dans le modèle PH5CH8 [71], des marqueurs précoces d'apoptose ont été décrits avec la souche 17D (IEX-1, IRF-1, DEC-1) dès 1 heure post infection dans les cellules HepG2 [249]. Une variation de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl2 a également été décrite suite à l'infection des cellules HUVEC par la souche 17D [75]. Enfin des éléments de réponse sur les phénomènes de coagulopathies ont été apportés par une étude récente sur les cellules PH5CH8 [73]. Des marqueurs comme le fibrinogène ou le facteur inhibiteur de l'activation du plasminogène (PAI-1), un élément essentiel de la coagulation, sont décrits comme surexprimés dans le contexte infectieux. La pré-stimulation avec l'IL-6 augmentant une fois de plus la transcription de ces facteurs [73].

Le manque de modèles d'études et la difficulté de suivre les temps précoces ou précédents l'infection hépatique limitent effectivement la compréhension des mécanismes associés. Par ailleurs si des études distinctes ont démontrées l'effet de l'infection sur les hépatocytes, les cellules de Kupffer ou encore les

cellules endothéliales, l'interaction de ces populations cellulaires demeure hypothétique dans ce contexte infectieux.

Afin de mieux comprendre le rôle de la réponse innée du foie qui amène dans le futur établissement d'un état antiviral ou pathogène, nous avons mené une étude comparative entre la souche atténuée YFV 17D et la souche sauvage parentale YFV Asibi. Afin d'intégrer la complexité du modèle hépatique, nous avons utilisé différents modèles cellulaires d'étude et en particulier un modèle 3D incluant des hépatocytes primaires et des cellules de Kupffer assemblés par la technologie « gravity drop ». Un modèle d'hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires a également été utilisé.

Une approche transcriptomique globale a été menée par utilisation des technologies de séquençage et de PCRarray, nécessitant la définition de critères d'analyses de données multiples.

Nous avons focalisé nos objectifs sur l'étude de la dynamique des dérégulations immunitaires, cellulaires et métaboliques induites par les deux virus, l'identification de signatures spécifiques de chacune des souches et la compréhension des réponses immunitaires hépatiques avec la volonté de proposer un modèle et des tests permettant la caractérisation et la compréhension ultérieures de nouveaux candidats vaccins

V. Matériel et Méthodes

A. Virus et modèles cellulaires

1. Virus de la fièvre jaune

La souche sauvage YF Asibi, isolée d'un patient ghanéen en 1927 a été fournie par le Dr Marianneau de l'institut Pasteur (Lyon, France) après un passage sur cellules VERO. La souche vaccinale YF 17D-204 a été fournie par le Dr Bouloy de l'institut Pasteur (Paris, France). Les souches ont été amplifiées 1 à 2 fois sur cellules VERO. L'ensemble des protocoles d'infections sont détaillés dans les matériels et méthodes de chacune des études.

2. Modèle 2D : hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines

Les hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires ou d'iPS sont développées par la société Takara Bio Inc et envoyées en culture, prêtes à l'emploi. Ces cellules ont été utilisées dans le cadre de l'étude n°1.

3. Modèle 3D : co-culture entre hépatocytes et cellules de Kupffer primaires

Le modèle développé par la société InSphero utilise le système « gravity drop » pour permettre l'agrégation de deux populations cellulaires hépatiques entre elles : les hépatocytes et les cellules de Kupffer. Ce modèle cellulaire a été utilisé dans le cadre des études n°2 et n°3.

a) Origine des cellules

Les cellules utilisées dans ces modèles sont des cellules primaires isolées d'individus décédés avec un historique médical connu (Tableau 1)

	Lots	Donneurs	Décès	Drogues/Tabac/alcool	Divers	Sérologie
Hépatocytes primaires	IPHH_01 / IZT	Femme Caucasienne 44 ans	Crise cardiaque	Aucune information	Diabète de type 2; suspicion de carcinome rénal	EBV- CMV+ HBV- HIV- HCV-
	IPHH_02	Femme Caucasienne 78 ans	Accident cardio-vasculaire	Tabac quotidiennement	Traitements (calcium, levothyroxine, insuline...)	EBV- CMV+ HBV- HIV- HCV-
Cellules non parenchymales (Cellules de Kupffer)	IPHN_03 / RHV	Femme Caucasienne 27 ans	Overdose	héroïne, cocaïne, marijuana / Tabac quotidiennement / Consommation excessive d'alcool	Diabète insulino-dépendant	EBV- CMV+ HBV- HIV- HCV-
	YOA	Homme Caucasien 57 ans	Accident cardio-vasculaire	Aucune information	Diabète de type 2; traitements (Insuline...)	EBV+ CMV- HBV- HIV- HCV-
	JJB	Homme Caucasien 22 ans	Accident cardio-vasculaire	marijuana / Tabac quotidiennement	double greffe rénale	EBV+ CMV- HBV- HIV- HCV-
	ZAR	Femme Caucasienne 42 ans	Anoxie / accident cardiovasculaire	Aucune information	Obésité, Anémie, Fibromyalgie	EBV+ CMV+ HBV- HIV- HCV-

Tableau 1. Récapitulatif de l'origine des cellules primaires incluses dans le modèle 3D de foie.

b) Entretien des microtissus hépatiques

Les microtissus hépatiques sont entretenus jusqu'à 5 semaines en milieu de culture. Le milieu de culture est produit par le fournisseur et la concentration des éléments communiqués ci-après n'est pas

communiquée. Le milieu contient un mélange de DMEM et de MEM (Gibco^{BRL}), de l'albumine de sérum de bœuf (1g/L), du galactose, de la glutamine, de l'ornithinhydrochloride, de la proline, du sélénite de sodium, du chlorure de zinc (ZnCl₂), du sulfate de cuivre (CuSO₄), du sulfate de zinc (ZnSO₄), du sulfate de manganèse (MnSO₄), de l'insuline, de la transferrine, du dexaméthasone, du HGF (facteur de croissance hépatique), de l'EGF (facteur de croissance épidermique), de l'HEPES, de la gentamycine et de l'amphotéricine. Le fournisseur met également à disposition un milieu pour les études de toxicologie (milieu « TOX ») et pour les études des processus inflammatoires (milieu « INF »). Le milieu « TOX » contient du milieu Williams E (Gibco^{BRL}), de l'insuline, de la transferrine, du sélénium, de la glutamine, du dexaméthasone, de l'HEPES, de la gentamycine et de l'amphotéricine. Le milieu « INF » contient les mêmes éléments mais en absence de dexaméthasone.

B. Analyse transcriptomique

1. PCRarray

Afin d'analyser l'effet de l'infection par les virus de la fièvre jaune sur l'expression d'un panel de gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme des drogues, les chémokines ou encore des interférons des tests de PCR en temps réel relative ont été réalisés avec des plaques prédéfinies commercialisées par la société QIAgen (Drug Metabolism Réf : PAHS-002Z, Interferon & Receptors Réf : PAHS 064Z ; Chemokines & Receptors PAHS-022Z). Pour cela, environ 10 à 20 ng d'ARN totaux extraits sont rétro-transcrits en ADNc à l'aide du kit RT² Microfluidics qPCR Reagent System (QIAgen, Réf : 330431). Brièvement, une nouvelle étape d'élimination de l'ADN génomique est effectuée par incubation de l'ARN cellulaire avec le tampon GE2 (gDNA eliminator2) pendant 5 minutes à 37°C. Les ARNs sont ensuite rétro-transcrits en ADNc par incubation avec le tampon BC4 (Mix transcriptase reverse) dans un thermocycler (AppliedBiosystem) avec un unique cycle de 60 minutes à 42°C, suivies de 5 minutes à 95°C. Les ADNc sont ensuite pré-amplifiés spécifiquement à l'aide des mix RT² PreAMP

Primer Format H pour chaque voie de signalisation précédemment citées (Drug Metabolism PAHS-002Z ; Interferon & Receptors PAHS 064Z ; Chemokines & Receptors PAHS-022Z). Brièvement, les ADNc sont incubés avec le mix d'amorces et la polymérase PA-30 dans un thermocycler (AppliedBiosystem) avec un programme de 10 minutes à 95°C, suivies de 14 cycles de 15 secondes à 95°C et 2 minutes à 60°C. Les amorces résiduelles sont ensuite dégradées à l'aide du side reduction reducer (Sr1) pendant 15 minutes à 37°C suivies de 5 minutes à 95°C. Enfin les ADNc amplifiés sont dilués au 1/5 ème en tampon low EDTA (0,1mM)

La PCR est alors réalisée grâce à la technologie fluidigm sur l'appareil Biomark. Sur des puces dédiées, permettant plus de 9000 réactions indépendantes simultanées, 96 amorces issues des plaques spécifiques (RT² Profiler™ PCRarray) et 96 échantillons différents sont déposés et mélangés au mix RT² Microfluidics qPCR Master Mix (QIAGEN, REF : 330431) contenant la sonde EvaGreen®. Le programme suivant est effectué (2 minutes à 50°C ; 30 minutes à 70°C ; 10 minutes à 25°C ; 10 minutes à 95°C et 40 cycles (95°C 15s / 60°C 1min).

Pour chaque plaque, 84 puits contiennent chacun un couple d'amorces spécifiques de gènes de la voie analysée. Afin de pouvoir interpréter les résultats plusieurs contrôles sont effectués. L'expression de 5 gènes de ménage a été mesurée. Les gènes codant pour la β -2-microglobuline (B2M), l'hypoxanthine (HPRT1), la protéine ribosomale LPO (RPLP0), la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et l'actine (ACTB) sont des gènes constitutifs, leur expression est considérée stable d'un échantillon à l'autre. D'autres contrôles sont réalisés afin de vérifier l'absence de contaminations par de l'ADN génomique (HGDC : Human genomic DNA contamination), l'efficacité de la reverse transcription (RTC : Reverse transcription control) ainsi que la reproductibilité de la PCR (PPC : Positive PCR control). Les échantillons présentant un contrôle HGDC positif (CT > 27) sont éliminés au même titre que les échantillons qui présentent des contrôles PPC et RTC anormaux.

Les données de qRT-PCR sont pré-analysées à l'aide du logiciel Fluidigm Real-Time PCR. Un seuil minimal de qualité est fixé à 0.65, une correction basale linéaire dérivative est utilisée et le threshold de CT est déterminé automatiquement sur l'ensemble des courbes d'amplification. Pour chaque gène un CT est ainsi obtenu. Les données sont traitées à l'aide du pack Office Excel puis implémentées dans le logiciel d'analyse RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis (PCR Array Data analysis V4). La méthode des $2^{-\Delta\Delta CT}$ décrite pour l'analyse des variations dans l'expression des gènes entre différentes conditions par qRT-PCR a été privilégiée (RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis). Brièvement les CT supérieurs à 27 sont remplacés par 27 et les résultats de CT obtenus pour chaque gène sont intégrés avec la liste des gènes correspondants afin d'effectuer une comparaison entre les échantillons tests et contrôles. Le logiciel affiche automatiquement la différence de variation de l'expression de chaque gène entre l'échantillon test et contrôle. Une valeur statistique est obtenue à l'aide d'un T-Test effectué dans le logiciel. Aucune correction n'a été apportée aux *p* value obtenues.

C. Microscopie électronique

Cette approche a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire CBMN (Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets) -UMR5248 et l'intervention du Dr Marion DECOSSAS.

Les microtissus hépatiques sont fixés dans un tampon phosphate 0,1 M/L (Euromedex™); glutaraldéhyde 1,6% (Delta Microscopie™) pendant une nuit à +5°C. Après plusieurs rinçages en tampon phosphate 0,1 M/L, les microtissus hépatiques sont inclus en agarose 1% (Sigma-A0169). Après plusieurs rinçages en eau, les échantillons sont contrastés à l'aide de tétroxyde d'osmium 1% (OsO₄) pendant 2h à température ambiante. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans un gradient croissant d'éthanol puis d'oxyde propylène. Les échantillons déshydratés sont ensuite imprégnés dans un mélange (2 :1) d'oxyde de propylène et de résine (Epon) puis inclus et polymérisés en Epon pur pendant 48h à 62°C. Des coupes semi-fines de 500 nm sont obtenues à l'aide d'un vibratome et colorées au bleu de toluidine

(Merck Millipore-115930). Des coupes ultra-fines de 70 nm sont obtenues à l'aide d'un vibratome, recouvertes d'un film de butvar (EMS/Delta microscopie-11850) puis contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. L'observation des coupes a été faite à l'aide du microscope électronique à transmission FEI CM120 (Philips) et les images acquises à l'aide d'une caméra 2kx2k Ultra Scan Gatan (Philips).

D. Immunofluorescence

Les microtissus hépatiques ont été fixés au paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 1 heure à température ambiante puis rincés 3 fois au PBS 1X (Eurobio, Réf : CXXPBS01-07). Une perméabilisation a été effectuée avec du Triton (SIGMA, Réf : 9002-93-1) à 0,2%, pendant 1 heure à température ambiante. Après deux lavages en PBS 1X, les sites aspécifiques ont été saturés à 37°C pendant 30 minutes avec un mélange PBS additionné de 5% de sérum de chèvre (Abcam, ab7481). Après deux nouveaux lavages, l'anticorps monoclonal primaire de souris (KRT8, KP1, MRP2 ou CD26) dilué dans le tampon de saturation a été ajouté, les cellules incubées à 4°C pendant 1 nuit, puis lavées à nouveau deux fois. L'anticorps secondaire de chèvre anti-souris (anti-IgG couplé à l'Alexa 488, anti-IgG2a couplé à l'Alexa555 ou anti-IgG2b couplé à l'Alexa 555) dilué dans le tampon de saturation a été ajouté et les microtissus incubés à température ambiante pendant 4 heures.

Anticorps utilisés et non mentionnés dans les matériels et méthodes des 3 études suivantes (Fournisseur/Référence/Dilution) :

-anticorps monoclonal de souris anti CD68/KP1 et couplé à l'Alexa fluor 647 (Santa Cruz Biotechnology/SC20060AF647_L2706/1000^e).

- anticorps monoclonal de souris anti KRT8 et couplé à l'Alexa fluor 555 (antibodies-online GmbH/ABIN874954/dilution 500^e).

- anticorps monoclonal de souris anti CD26 (BA5) est un monoclonal IgG2a de souris fourni à une concentration de 200 µg/ml. (Santa Cruz Biotechnology® Référence sc-19607/ dilution 100ème)
- anticorps monoclonal de souris anti MRP2 (M2 III-6) est un monoclonal IgG2a de souris en 0.25 mg/ml. (Abcam® Référence ab3373/dilution 100ème)
- anticorps secondaire de chèvre anti IgG2a de souris (Life technologies A-21131/ dilution 1000ème)

VI. Résultats

A. ETUDE N°1 : Etude de la dynamique des réponses immunitaires contre les souches sauvages et vaccinales du virus de la fièvre jaune dans un modèle *in vitro* d'hépatocytes dérivés de cellules souches humaines

1. Problématique

Le choix d'un modèle cellulaire relevant et présentant les caractéristiques métaboliques hépatiques est un aspect primordial de de notre étude. L'amélioration des techniques de différenciation cellulaire à partir de cellules souches a permis le développement accéléré des cellules humaines présentant des caractéristiques semblables aux cellules primaires et une potentielle source illimitée.

L'approche a donc été de comparer dans un premier l'infection et l'induction des réponses immunes par les virus vivants atténués (YFV 17D) ou sauvages (YFV Asibi) dans un modèle d'hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines.

Les souches virales utilisées correspondent aux virus historiques de la fièvre jaune. La souche « YFV Asibi » est en effet la première souche de virus sauvage isolée en 1927 sur un patient ghanéen. C'est à partir de cette souche que l'atténuation du virus a été réalisée pour obtenir le virus vivant atténué de base vaccinale « YFV 17D ». Ces souches sont conservées en laboratoire depuis des générations et cultivées sur cellules VERO. En raison du taux d'erreur de la polymérase virale, ces phases de réplication sont génératrices de mutations qui peuvent altérer l'efficacité de l'infection (profil atténué) ou occasionner des retours vers des formes virulentes (profil sauvage). La vérification des séquences des génomes des virus utilisés est donc une étape clé dans l'initiation de ces études.

Les séquences des virus étudiés ont été alignées sur les séquences de référence [65]. Aucune mutation majeure n'a été observée. Par ailleurs la pathogénicité de la souche YFV Asibi a été vérifiée en interne sur des souris A129, classiquement sensibles à l'infection par le virus de la fièvre jaune (communication interne). Des résultats similaires aux études menées par Meier en 2009 ont été retrouvés et les souris ont dû être euthanasiées dans les 9 jours suivants l'injection car elles présentaient des signes de prostration, d'atteinte neurologique et des troubles alimentaires majeurs [219].

Les hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires ou d'iPS sont développées par la société Takara Bio Inc et envoyées en culture ou cryopréservées, prêtes à l'emploi. Les caractéristiques physiques et métaboliques de ces cellules ont été documentées par le fournisseur et vérifiées en partie au laboratoire. Les hépatocytes présentent les caractéristiques morphologiques des hépatocytes primaires avec une structure cuboïde et des bi-nucléations. Une expression constante des marqueurs du métabolisme hépatique comme les enzymes hépatiques de phase I et de phase II est également observée. Par ailleurs, contrairement aux hépatocytes primaires, ces cellules conservent un statut d'hépatocytes différenciées en culture *in vitro* [179,180].

2. Principales observations de l'étude

La souche YF 17D présente une meilleure infection de ces hépatocytes par rapport à la souche sauvage YF Asibi, confirmant ainsi de précédentes données obtenues sur lignées cellulaires. L'augmentation de la dose infectieuse ne modifie pas ces observations et n'impacte que faiblement les profils de réponses immunitaires induites par les deux virus.

Une forte sécrétion des Interférons (IFN) de type III, aussi appelés IFN lambda (IFN- λ) est observée. En particulier, les IFN- λ 1 / IL-29 et λ 2 / IL-28A, connus comme les principaux médiateurs de foie de clairance virale chez les patients atteints d'hépatite C chronique, sont décrits ici pour la première fois dans un modèle d'étude hépatique pour le virus de la fièvre jaune. D'une manière générale les deux virus induisent un profil antiviral mais systématiquement plus haut et plus précoce (dès 4 heures) suite à l'infection par la souche YF 17D que par la souche sauvage YF Asibi. Cette dernière induit en effet un profil incomplet, avec des niveaux de transcription inférieurs, la perte de certains marqueurs de l'inflammation et d'induction de la mort cellulaire par apoptose. Enfin des dérégulations métaboliques

différentes sont observées suite à l'infection par les deux souches avec une down-régulation des enzymes de la transcription des enzymes de phase I et de phase II avec la souche YFV 17D.

Dynamics of innate immune responses to wild-type or attenuated yellow fever virus in human metabolically competent hepatocytes: implications for liver pathogenesis

91

Nicolas Masse-Deragon¹, Julie Fine¹ and Veronique Barban¹

¹ Department of Research and Development, Sanofi Pasteur, 1541 Avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France

Corresponding author :

Veronique Barban, Sanofi Pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France

Tel +33 437373758; Fax: +33 437370481; E-mail: veronique.barban@sanofipasteur.com

Short title: Innate immune responses to yellow fever virus in human liver cells

Abstract

Background: Yellow fever (YF) is a human viral disease transmitted by arthropod vectors and characterized by an acute and lethal systemic involvement affecting the liver. Vaccines based on live attenuated strain YF 17D have been used since the 1950s with an excellent record of safety and efficacy. However, mechanisms regulating liver pathogenesis are still poorly understood.

Methodology/Principal Findings: In the present study, human hepatocytes derived from embryonic stem cells, recapitulating major immune and metabolic properties of primary hepatocytes, were used in a transcriptomic approach to investigate post-infection events elicited by YF viruses. Hepatocytes were more permissive to attenuated YFV 17D than to wild-type YFV Asibi infection (YFV 17D, $45\pm 19\%$, YFV Asibi, $13\pm 7\%$), independently of the viral load applied and with low/no viral spread. YFV 17D infection induced transcription of a full antiviral pathway including viral clearance (induction of apoptosis-related genes), while controlling hepatic metabolism. In contrast, YFV Asibi infection elicited incomplete, delayed transcription of antiviral genes, and did not interfere with hepatic clearance function. Both viruses activated double stranded RNA sensing, signaling and transcription of type III ($\lambda 1$ and $\lambda 2$) and type I (α and β) interferons and associated genes. Kinetics and levels of activation differed and depended on the initial infection dose. Secretion profiles for inflammatory (Interleukin(IL)6, IL8/CXCL8, IL1 α , TNF- α) and regulatory factors (IL1RA, IL4, IL12) as well as chemoattractants proteins (CXCL10/IP-10, MCP-1/CCL2, MIP-1, RANTES/CCL5) followed the same trend, except for IL2, IL3 and IL5 that were detected only after YFV Asibi infection.

Conclusions/Significance: We suggest that induction by YFV 17D of a strong antiviral response in hepatocytes, the major cell type in the liver, could contribute to in vivo efficacy of the vaccine strain; additionally, the kinetics of the immune responses, in combination with viral load, may determine the balance between recovery and immunopathology after wild-type infection.

Author summary

YFV live-attenuated vaccine strain 17D elicits limited viremia in human, with no signs of liver infection, contrarily to wild-type YFV. Several studies however have reported more efficient infection of hepatic cell lines by YFV 17D than by wild-type YFV Asibi. We confirmed this observation in a cell model physiologically close to fully competent human hepatocytes, suggesting that such infection may also occur too. Further transcriptome analysis of immune and metabolic responses elicited by the two viruses in time-course infection studies supported a new mechanism, whereby infection of hepatocytes by YFV 17D *in vivo* could play a role in establishing local protection in the main tissue targeted by natural infection. In addition, we raise the hypothesis that the dynamics of innate responses, and potentially the infecting dose, may determine the ability, or inability, of wild-type virus to overcome liver tolerance, thus leading to full viral clearance and recovery, or alternatively to incomplete viral clearance and severe immunopathology symptoms, respectively. These findings may have implications for immune therapy and new vaccine development.

Introduction

Yellow fever virus (YFV) is a human flavivirus endemic to South America and sub-Saharan Africa. The virus is transmitted by mosquitos and harbored by non-human primate (NHP) reservoir hosts. Epizootic circulation results in periodic outbreaks in endemic regions and among travelers. Despite an effective vaccine being available, YF virus thus remains a major threat for human health [1]. Most YF clinical infections induce mild disease followed by a brief period of remission, with some infections resolving without further complication. However, 15% to 20% patients develop severe acute illness with fever, nausea, vomiting, hepatitis with jaundice, and multi-organ failure and shock; death occurs in 20%–60% of these cases. Excessive production of pro-inflammatory cytokines, in association with viral replication, determine disease severity, in humans and in experimentally infected macaques [2–4].

Damage by YF virus infection is most severe in the liver, and can lead to fulminating hepatitis and liver dysfunction. Hyperbilirubinemia can occur as early as the third day but usually peaks toward the end of the first week of illness. Elevated levels of serum transaminases and serum albumin precede the appearance of jaundice; levels may remain elevated for up to 2 months after onset. Lesions in the midzone area, steatosis, inflammation, inflammatory cells infiltrates (NK, T and B lymphocytes, DCs) and typical Councilman bodies have been observed in liver biopsies from hospitalized subjects, with complete return to normal histology upon resolution of infection [5,6]. The liver naturally develops immune tolerance due to a constant level of exogenous non pathogen stimulation. Both hepatocytes, accounting for approximately 70%–85% of the mass of a healthy liver, and non-parenchymal cells (Kupffer cells, lymphocytes, liver sinusoidal endothelial cells) regulate the magnitude of this response [7]. Studies in which infectious virus was recovered from liver necropsies also detected viral antigen in Kupffer cells and hepatocytes [4,6,8–10]. Since rodents primary hepatocytes support YFV infection *in vitro* [11,12], human primary hepatocytes may be a valuable *in vitro* model to investigate innate and metabolic disorders elicited by YFV infection *in vivo* [13–15]. However, the use of these cells is limited by

the extreme shortage of healthy human liver biopsies and donor-to-donor variation; additionally, human primary hepatocytes are not readily cultured *in vitro* [16]. Human hepatoma cell lines or immortalized hepatocytes have been largely used [17–19] despite these cells having defects in key immune and metabolic signaling pathways [20–22] and thus not fully recapitulating all aspects of YFV replication in the human liver. More recent progress in stem-cell technology allows potentially unlimited access to functionally active hepatocyte-like cells [23–28]. Human embryonic stem cell-derived hepatocytes (hES-HEP) support the full life cycle of hepatic viruses, such as hepatitis C virus (HCV) or hepatitis B virus (HBV), which are known to poorly replicate in most hepatic cell lines and elicit functional, tissue-specific immune responses [29].

We assessed infection and replication characteristics of wild-type and attenuated yellow fever viruses within hES-HEP cells in time-course experiments at two different multiplicities of infection (m.o.i). The transcription of about 400 genes, spanning 5 major cellular pathways, was analyzed. Cytokine secretion was also studied. Dynamics of interferon induction and interferon signaling and disruption of liver functions in hES-HEP cells infected with wild-type YFV Asibi or attenuated YFV 17D strains are reported here for the first time. This study may help to better understand the contribution of hepatocyte immune responses to liver pathogenesis or protection.

Methods

Cells

Human embryonic stem cell-derived hepatocytes (hES-HEP, Takara Bio, Japan) were delivered in ready-to-use 6 or 24-well plates, or in 25 cm² flasks. These cells had a lifespan of about 7–10 days after reception and were included in experiments within the week following their delivery. Cells were cultured at 37°C/5% CO₂ in Williams medium E with Glutamax-1 (Gibco) supplemented with HEP additive (Takara Bio, Japan), dexamethasone 40 ng/ml (Sigma), human recombinant growth factor 20 ng/ml (Promokine), human oncostatin M 10 ng/ml (Promokine), antibiotics 0.1% (Gibco), and HCM™ SingleQuots™ Kit (Lonza) containing ascorbic acid, Bovine Serum Albumin-Fatty Acid Free, hydrocortisone, human Epidermal Growth Factor, transferrin and insulin (Lonza). VERO cells used were from an internal seed lot produced at Sanofi Pasteur (Marcy-l'Etoile, France) and derived from ATCC #CCL81 cells. Vero cells were grown in Iscove's Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Glutamax 1% (Gibco), fetal bovine serum 4% (Hyclone) and penicillin/streptomycin mix 0.1% (Gibco).

Viruses and Infections

YF Asibi and YF 17D viruses were amplified in Vero cells. Their nucleotide sequences were tested after infection and were similar to published sequences [30,31]. YF Asibi and YF 17D viral viscerotropism and pathogenic properties were confirmed in type I interferon (IFN) receptor-deficient mice A129 (data not shown). For infection experiments, 1 million human ES-HEP cells were infected at the indicated m.o.i. for 4 hours in a total volume of 3 mL. Residual inoculum was removed in 3 successive washes, each followed by a 10-minute incubation in PBS. Cells were then incubated in complete medium at 37°C/5% CO₂ cells for 72 to 96 hours. Supernatants were collected at indicated time points and stored at –80°C until analysis. Secreted virus was quantified in the supernatant by standard PFU assay on Vero cells [30], or by YF NS5-specific quantitative RT-PCR, as described previously [32].

Ethics statement

Wild-type YFV strain Asibi (originally isolated from a male YF Ghanaian patient in 1927) was obtained from the Pasteur Institute Paris strains collection maintained by passage in mouse brain. It was provided by Dr Philippe Marianneau from the Pasteur Institute (Lyon, France) after one passage on Vero cells. Dr. Michele Bouloy from the Pasteur Institute (Paris, France) provided the vaccine strain, 17D-204, which was derived from a 17-D infectious clone [33].

Flow Cytometry

Flow cytometry was used to determine the percentage of YFV antigen-positive cells at 4, 24, 48, 72 and 96 hours post-infection (hpi) after infection. 200,000 cells were incubated in Cytofix/Cytoperm™ reagent (BD Biosciences) for 20 minutes at 4°C. Cells were then incubated at 4°C for 45 minutes with primary monoclonal antibodies, followed by 45 minutes at 4°C with fluorescent labeled conjugate, and stored at 4°C in CellFIX™ Buffer (BD Biosciences) until analysis. At least 10,000 events/sample were collected in Accuri® C6 Flow cytometer (version 1.0.264.15).

***In situ* immunofluorescence**

The relationship between infection and replication rates was assessed in YFV antigen-immunostained cells. Cells were fixed in Acetone 85% (Sigma) for 10 minutes at –20°C. Cells were then incubated at room temperature for 45 minutes with primary monoclonal antibodies, followed by 45 minutes at room temperature with fluorescent labeled conjugate. Nuclei were then stained in a dark chamber with DAPI for 5 minutes and viewed under fluorescent microscope (Axio Observer D1, Zeiss).

Antibodies

For flow cytometry, cells were stained with mouse monoclonal antibody (mAb) anti E-YFV (OG5, Abcam) or with rabbit mAb anti hepatocyte nuclear factor (HNF) 4a (EPR3648, Abcam) diluted 1:5000 and 1:500

in blocking buffer and revealed with F(ab')₂ goat anti mouse-Alexa Fluor® 488 conjugate, or goat anti rabbit-Alexa Fluor® 647 (Invitrogen), respectively.

For *in situ* immunofluorescence, cells were also stained with mAb OG5 and revealed with F(ab')₂ goat anti mouse-Alexa Fluor® 555 conjugate. Nuclei were labelled with DAPI (D21490, Life Technologies®).

Analysis of endocytosis pathways

To explore the endocytosis pathways employed by the viruses to enter the cells, hepatocytes were pre-treated for 1 hour with either 15 µg/mL chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis, or 2 µg/mL filipin III (Sigma), an inhibitor of caveolae-mediated endocytosis, diluted in culture medium. Infections were performed in the same drug-containing medium. Supernatants were collected at indicated time points and stored at –80°C until analysis.

RT-qPCR analysis

Infected and non-infected cells (controls) were obtained from three to four independent infections. Cells were harvested at 4, 24 and 48 hours post infection and incubated for 5 minutes in EDTA 0.02% then in Accumax™ solution (Millipore) for 20 minutes at 37°C/5% CO₂. Total RNA was extracted with RNeasy® mini kit (QIAgen) and reverse-transcribed into cDNA with RT² Microfluidics qPCR Reagent System (QIAgen), followed by cDNA pre-amplification in RT² PreAMP cDNA Synthesis Kit (QIAgen). PCR amplifications were performed on BioMark™ microfluidic qPCR platform (Fluidigm) using RT² Profiler™ PCR arrays (QIAgen). Five different PCR arrays, each one containing amplification primers for 84 human genes plus 12 controls, were tested in this study: #PAHS-093Z (hepatotoxicity), #PAHS-002Z (drug metabolism), #PAHS-012Z (apoptosis), #PAHS-021Z (cytokines), and #PAHS-064Z (IFNs & receptors), representing a total of about 400 unique genes. For each gene, the specific amplification fold-change between infected and non-infected cells was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [34]. A customized version of this method (PCR Array Data analysis V4), available online in QIAgen Data Analysis Center

([https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=d8d1813e-e5ba-4d29-8fdf-](https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=d8d1813e-e5ba-4d29-8fdf-07a3f4227e0a&lang=en)

[07a3f4227e0a&lang=en](https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=d8d1813e-e5ba-4d29-8fdf-07a3f4227e0a&lang=en)), was used for analyses. Cut-off cycle threshold (Ct) values obtained in replicates were normalized, based on 5 housekeeping genes present on the array. Non-infected cells at T0, also analyzed in replicates, were used as the reference for calculation of relative fold changes (RFC). Differentially expressed genes were defined as genes with a relative fold-increase (RFI) ≥ 3.0 and the false-positive error-rate was set at 1% ($p < 0.01$).

Multiplex ELISA

The transcription of innate immune factors elicited after YFV 17D or YFV Asibi infection was followed in a time-course experiment. Luminex™ kits (Millipore; ref #: HCYTOMAG-60K, HCYTOMAG-62K, HCYPMAG-63K, HTH17MAG-14K), were used to quantify a panel of 35 different IFNs, cytokines and chemokines in the supernatants of infected and non-infected cells after 2 days of culture. Supernatants (25 μ l), from 3 independent assays, were tested undiluted according to manufacturer's instructions. Data were acquired with Bio-Plex Suspension Array System Luminex™ 100 and analyzed with Bio-Plex Manager 4.0 Security Edition software. Values below the positivity threshold determined by the manufacturer (lower limit of detection (LOD) + 2SD) were assigned a value equivalent to half this threshold ($T_s/2$) for calculations. To facilitate reading of individual graphs, all vertical axes start at $T_s/2$, rounded down to the closest unit. Protein RFIs were also calculated versus non-infected cells at T0 with a positivity threshold of 1.5-fold.

Statistical analyses

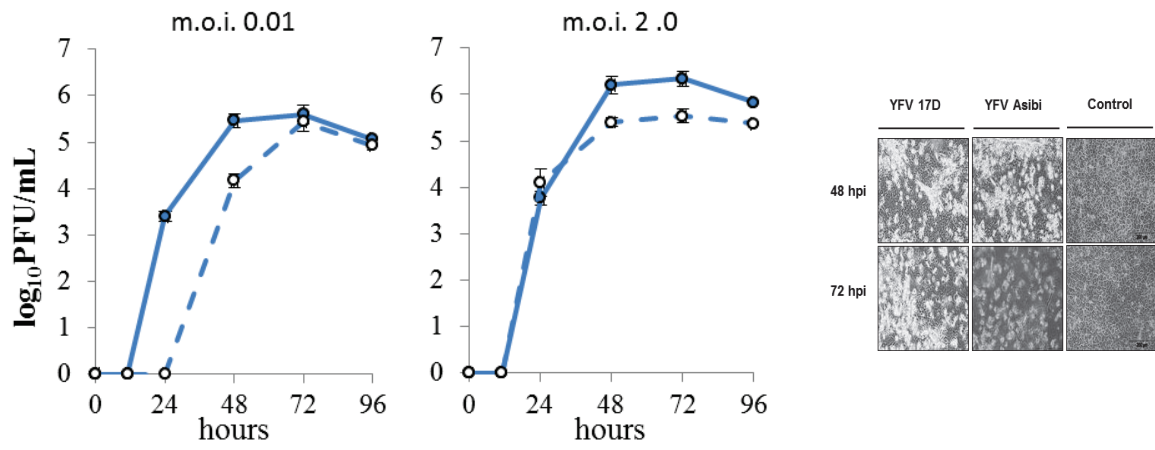
A series of Fisher tests were used to determine relevant differences in the number of detected genes. Unless otherwise stated, statistical analyses were conducted in SAS® v9.2. Student's paired t-tests were used to identify differentially expressed genes, and Wilcoxon's tests were used to determine significant differences in gene expression intensity (p value < 0.05).

Results

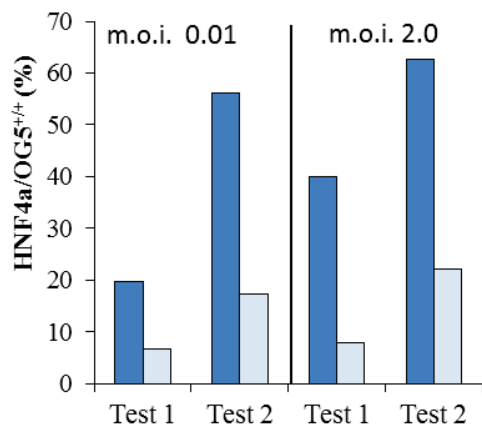
hES-HEP cells are less permissive to YFV Asibi than to YFV 17D infection.

Viral amplification curves were established at m.o.i. 0.01 and at m.o.i. 2, in 5 independent assays. At m.o.i. 0.01, YFV Asibi replication was delayed compared to YFV 17D replication but both viruses reached similar maximum titers: 72 and 48 hpi, respectively. At m.o.i. 2, the kinetics of replication were similar, but YFV 17D reached a maximum titer about 5 times higher than YFV Asibi (1.6×10^6 PFU /mL vs 3.4×10^5 PFU /mL, respectively; p value <0.01). Neither virus induced clear cytopathic effects in this model, but clusters of round, refringent cells were detected at later time points (96 hpi) (Fig 1A).

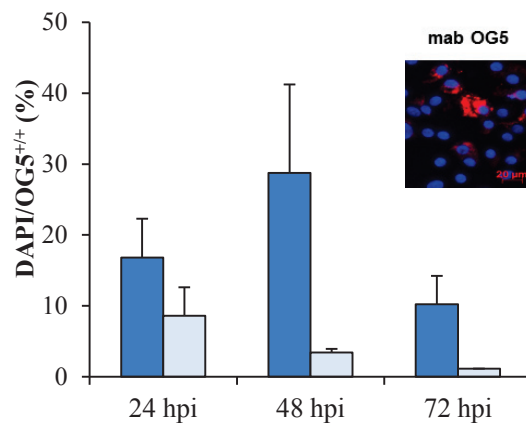
A



B



C



D

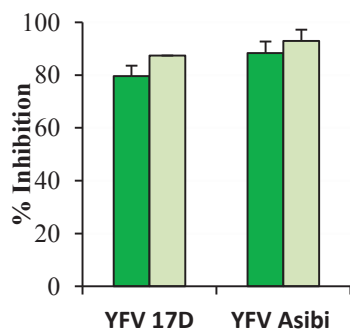


Figure 1. Replication of YFV Asibi and YFV 17D viruses in hES-HEP cells. **A:** Graphs: Secreted virus amplification curves. Each point is the median of 5 biological replicates; vertical bars represent standard deviation (SD). Plain lines, YFV 17D; dotted lines YFV Asibi. Right panel: Cell monolayers observed at 48 hpi and 72 hpi by optical microscopy (x40). **B:** Flow cytometer analyses. hES-HEP cells infected at m.o.i. 0.01 or at m.o.i. 2 were collected at the plateau phase of replication (72 and 48 hpi, respectively). Cells were fixed, co-labelled with anti-hepatic nuclear factor (HNF) mAb HNF4a (Abcam) and anti-YFV mAb OG5 (Abcam). Percentages of HNF4a+/OG5+ cells were measured in two independent experiments using Accuri® C6 Flow cytometer. Dark blue bars: YFV 17D; light blue bars: YFV Asibi. **C:** In situ immunofluorescence. hES-HEP infected cells were fixed at different time points, incubated with anti-YFV mAb OG5 (red) and revealed with fluorescent conjugate. Nuclei were labeled with DAPI (blue). The percentages of YFV-labeled/non-labeled nuclei are shown; 150–450 events were counted in 3 different areas of a well. **D:** Inhibition of endocytosis. Cells were pre-treated for 1 hour with either 15 µg/mL of chlorpromazine, or 2 µg/mL of filipin III, diluted in culture medium. Infections were performed in the same drug-containing medium. Supernatants were collected at 24 hpi and analyzed by YF NS5-specific quantitative RT-PCR. Percentages of inhibition compared to non-treated infected cells are shown. Dark green bars, chlorpromazine-treated cells; Light green bars, filipin III-treated cells.

90% of total cells were positive for hepatocyte nuclear factor (HNF) 4a, a marker of differentiated hepatocytes (data not shown). The percentage of these cells that were YFV antigen-positive was determined by flow cytometry at the peak of infection (72 hpi for m.o.i. 0.01 and 48 hpi for m.o.i. 2). At m.o.i. 0.01, YFV antigen was detected in 13±7% of mature hepatocytes after YFV Asibi infection and in 45±19% after YFV 17D infection. Increasing the m.o.i. to 2 resulted in small mean fold-increases of 1.4±0.6 for YFV 17D and 1.2±0.1 for YFV Asibi (Fig 1B). At m.o.i. 2, 29% of YFV 17D-infected hepatocytes and 9% of YFV Asibi-infected hepatocytes were antigen-positive at 48 hpi. These numbers had decreased rapidly by 72 hpi, probably because of cell exhaustion and impairment of protein synthesis (Fig 1C). Similar data were obtained after anti-double stranded (ds) RNA staining (data not shown), confirming that active replication was ongoing. In endocytosis inhibition analyses, viral entry was inhibited by about 1 log₁₀ by both chlorpromazine (*clathrin*-dependent endocytosis) and filipin (caveolae-mediated endocytosis), with no difference observed between the 2 viruses (Fig 1D).

Impact of infection on hepatocyte metabolism

We assessed the transcription of 84 major human liver enzymes and liver transporters at 48 hpi. Activated genes were identified by RT-qPCR, using pre-designed PCR arrays probed against the genes of interest.

Ten of the 15 cytochrome P450 (CYP) enzymes represented on the PCR array, were constitutively expressed (*CYP5B3*, *CYP19A2*, *CYP1A1*, *CYP2B6*, *CYP2C19*, *CYP2C8*, *CYP2D6*, *CYP2J2*, *CYP3A4*, *CYP3A5*), confirming that these hepatocytes were metabolically competent. Non-detected CYPs were: *CYP11B2*, *CYP17A1*, *CYP2C9*, *CYP2E1*, and *CYP2F1* (data not shown).

YFV 17D infection inhibited the transcription of canalicular ATP-binding cassette transporter B1 (ABCB1), which is part of the bile salt export pump, and of glycosylphosphatidylinositol (GPI), another biliary export protein (Fig 2). CYP3A4, the major human cytochrome, was down-regulated by YFV 17D infection (RFC: -5.4, $p=0.0005$), while CYP2C8 and CYP2B6 were up-regulated (RFCs: 5 and 4.6, respectively, p values = 0.004). YFV 17D also specifically activated transcription of microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1), involved in protecting the mitochondrial membrane from oxidative stress [35]. Finally, glutamic decarboxylase enzyme-1 (GAD-1) transcription was inhibited by about 13 folds (p value = 0.00001) after YFV 17D infection. CYP2C8, involved in reducing inflammation and promoting angiogenesis [36], was the only gene to be modified (upregulated) after YFV Asibi infection, at the limit of significance (RFC: 6.3, p value 0.040).

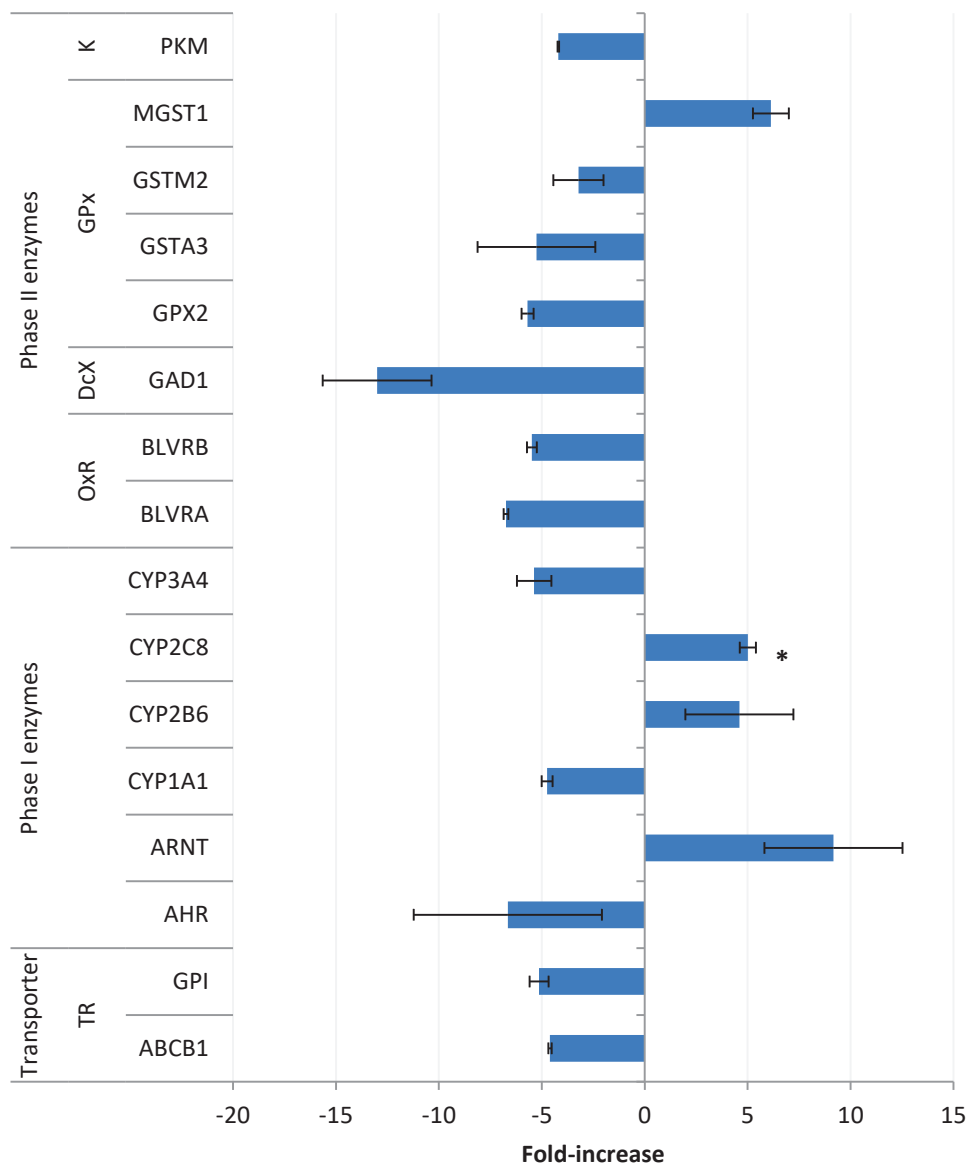


Figure 2. Liver metabolism transcriptional deregulations. hES-HEP cells were infected at m.o.i.2 for 48h with YFV 17D. Total messenger RNAs purified from infected and non-infected cells were reverse-transcribed into cDNA and analyzed in a drug-metabolism pre-designed PCR array (QIAgen, #PAHS-002Z). Non-infected cells at T0 were used as reference for calculation of RFCs. Differentially expressed genes were those with a RFI ≥ 3.0 and the false-positive error-rate was set at 1% ($p < 0.01$). *TR*, Transporters; *OxR*, Oxidoreductases; *DcX*, Decarboxylases; *GPx*, Glutathione Peroxidases; *K*, Kinases.

*Also activated by YFV Asibi (relative fold increase = 6.28).

Impact of YFV Asibi and YFV 17D infection on interferon responses

The transcription profiles of innate immune factors in cells inoculated with UV-inactivated virus (1.8 mW, 2.5 min) did not differ between infected and non-infected cells (data not shown).

Early responses

Transcriptional activation of myeloma differentiation factor 5 (*MDA5*) was detected at 4 hpi in YFV 17D-infected hepatocytes (m.o.i. 2). *MDA5*, together with retinoic-acid inducible gene-1 (*RIG-I*), has been shown to recognize flavivirus dsRNA and to further activate IFN α/β signaling, *in vitro* and *in vivo* [37,38]. Nine IFN-stimulated genes (ISGs) (see www.genenames.org for HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) for ISGs designation) were also upregulated (Fig 3). These ISGs included strong effectors of the antiviral response: 2-5A oligoadenylate synthetase *OAS1* (involved in RNA degradation); IFN-induced (IFI) GTP-binding protein *MX1*; tetratricopeptide-containing proteins *IFIT1/2/3*; transmembrane proteins *IFITM1*; ubiquitin-like modifier *ISG15*; and apoptosis regulator *IFI6*[39]. *IFIT1*, also known as *ISG56*, is also the first molecule to be induced by type I interferon after activation of *RIG-I/MDA5* pathway [40]. *MDA5*, *IFI6*, *IFIT1* and *SP110* transcripts were not detected after YFV Asibi infection; the 6 other ISG transcripts were detected but with lower levels of activation (Fig 3).

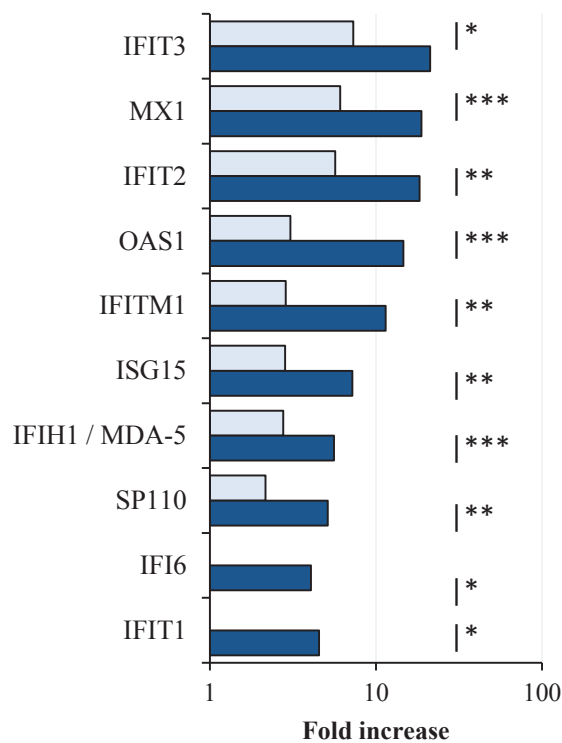


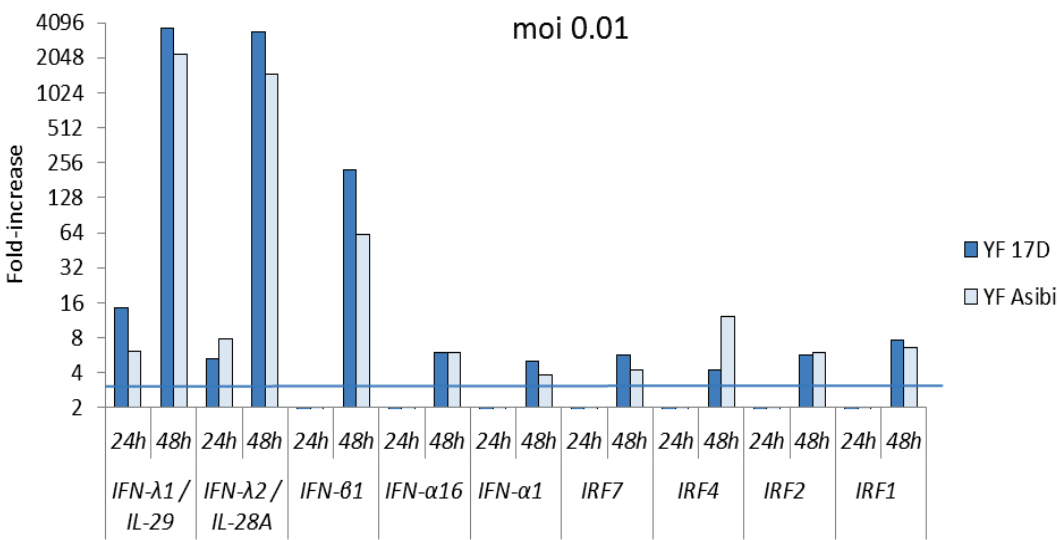
Figure 3. Transcription of interferons and cytokines at 4 hpi. hES-HEP cells were infected at m.o.i.2 for 4 hours. Total messenger RNAs purified from infected and non-infected cells were analyzed using two pre-designed PCR arrays (QIAGEN, #PAHS-021Z and #PAHS-064Z). RFCs were calculated as previously described in Fig 2. Genes with RFC values between +3.0 and -3.0 were not considered for statistical validation in series of Fisher's tests with false-positive error rate set below 1% (p value <0.01). Significant difference between YFV Asibi and YFV 17D: * ≤ 0.05 ; ** ≤ 0.01 ; *** ≤ 0.001 . Dark blue bars, YFV 17D; light blue bars, YFV Asibi.

IFNs and IFN regulators at 24 hpi and 48 hpi

At m.o.i. 0.01, both viruses induced the transcription of type III *IFNs* $\lambda 1/II29$ and $\lambda 2/II-28A$ within 24 hpi (Fig 4A). Transcription of these 2 genes markedly increased between 24 and 48 hpi (>1000 fold). *IFN* $\beta 1$ also increased >50 fold between these two time points. Activation levels were 2–4 fold higher after YFV 17D than after YFV Asibi infection (p values < 0.01). Six additional genes were moderately activated at 48

hpi (≤ 12 fold): *IFN- $\alpha 1$* and 16, *IRF1*, *IRF2*, *IRF7* and *IRF4*. *IRF1*, *IRF2* and *IRF7*, were previously shown to be associated with the antiviral response elicited in YFV 17D-based vaccine [41,42].

A



B

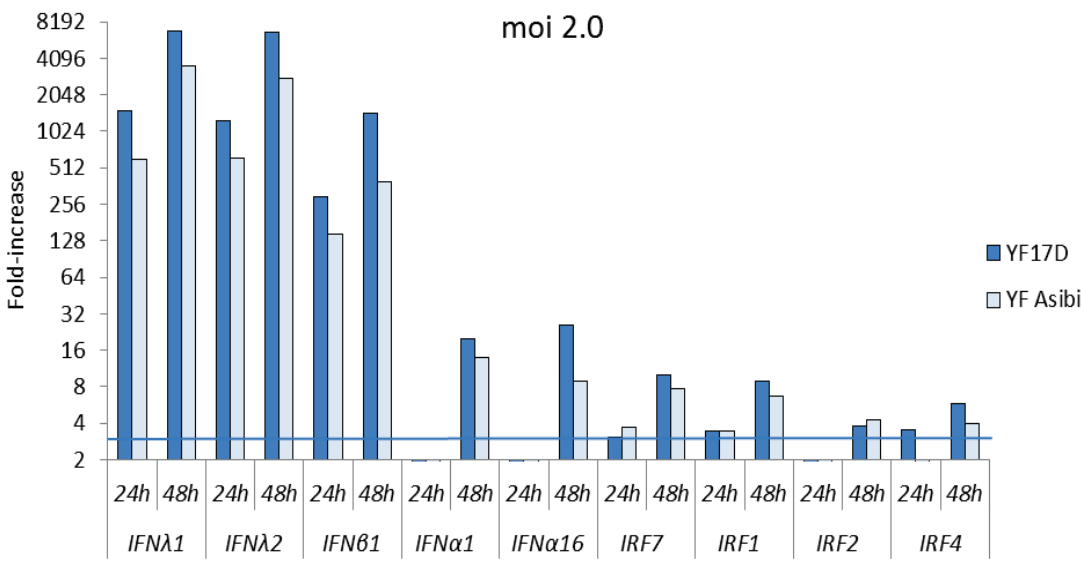


Figure 4. Transcription of interferons and interferon regulators. hES-HEP cells were infected at m.o.i. 0.01 (A) or 2 (B) for 24 and 48 hours. Total messenger RNAs purified from infected and non-infected cells were reverse-transcribed into cDNA and analyzed using a pre-designed PCR array (QIAgen, #PAHS-064Z). Non-infected cells at T0 were used as reference for calculation of relative fold changes. Differentially

expressed genes were those with a relative fold-increase ≥ 3.0 and the false-positive error-rate was set at 1% ($p < 0.01$). Dark blue bars, YFV 17D; light blue bars, YFV Asibi.

Similar transcription profiles were observed for the 2 viruses at m.o.i. 2 (Fig 4B). At 48 hpi, *IFN- α* , *- λ* s and *IRF7* transcript levels induced by YFV 17D infection were 2-3 fold higher than at m.o.i. 0.01, while *IFN- β 1* transcripts levels were about 6-fold higher compared with m.o.i. 0.01. Generally, activation levels were higher after YFV 17D than after YFV Asibi infection, and after 48 hpi than after 24 hpi (p value < 0.01 in paired Wilcoxon assay).

ISG and interferon-induced genes.

We analyzed genes for 23 prominent ISGs, 83% of which were transcribed after infection.

At m.o.i. 0.01 (Fig 5A), in addition to the 10 genes activated at 4 hpi, 7 genes were up-regulated at 48 hpi: *IFI44* and its paralog *IFI44-like (IFI44L)*, *IFI16* (same family as *IFI6*), *IFI27*, apoptosis and cell death, *IFI30* (unclear function), *IFI35*, (involved in RIG-1 signaling in vesicular stomatitis virus (VSV) infection [43]), and *CXCL10*, a pro-inflammatory cytokine and chemoattractant of monocytes and other immune cells. Transcription profiles showed similar patterns for YFV 17D and YFV Asibi infected cells, albeit with significantly higher levels of activation for YFV 17D than for YFV Asibi (mean fold-increases: 89 and 28, respectively; mean of YFV 17D/YFV Asibi genes difference: 3.2 fold, p value=0.001). The gene with the greatest difference in activation between YFV 17D and YFV Asibi was *IFI44L*, with transcription levels in YFV 17D-infected cells 12.3 times those in YFV Asibi cells.

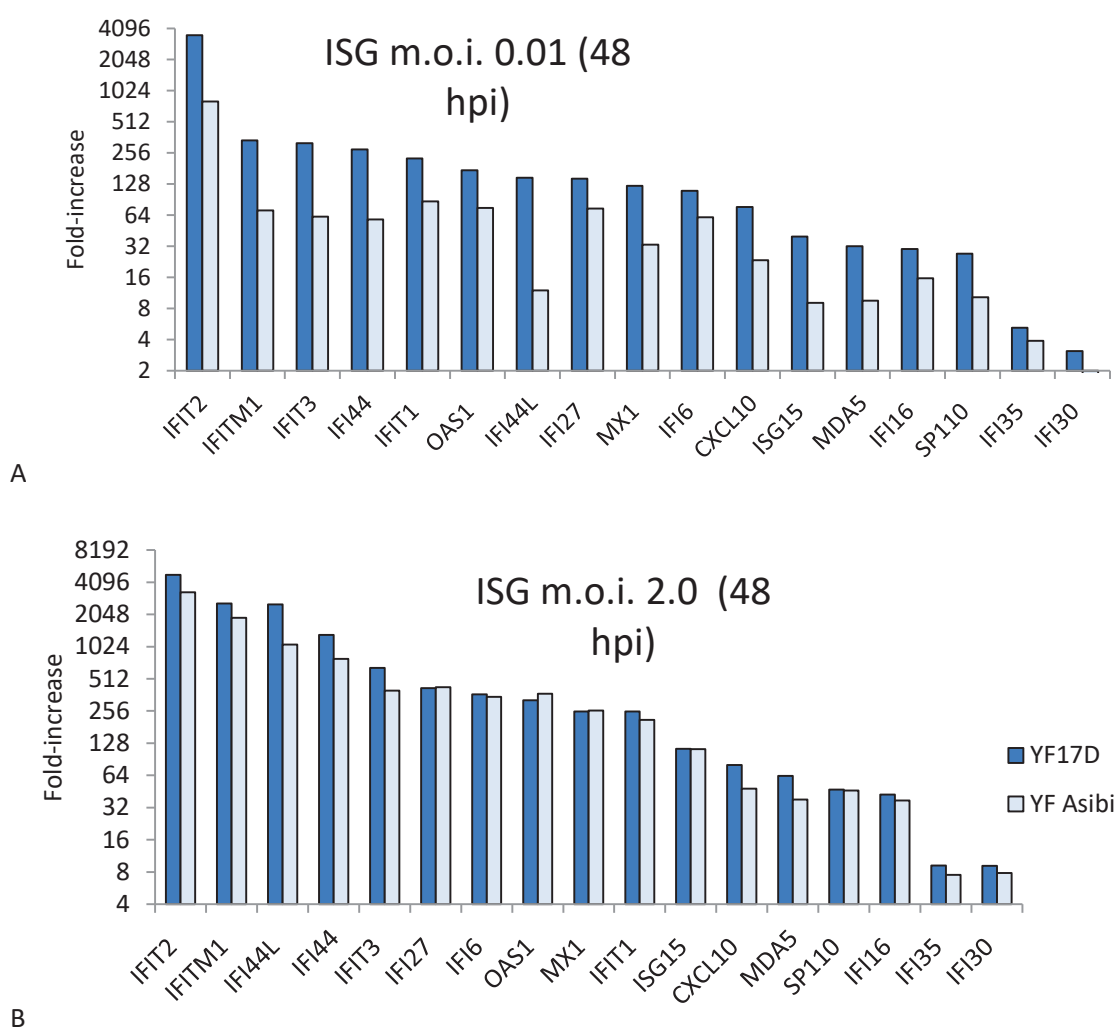


Figure 5. Activation of transcription of interferon-stimulated and interferon-induced genes. hES-HEP cells were infected at m.o.i. 0.01 (A) or 2 (B) for 24h and 48 hours. Total messenger RNAs purified from infected and non-infected cells were reverse-transcribed into cDNA and analyzed using a pre-designed PCR array (QIAGEN, #PAHS-064Z). Non-infected cells at T0 were used as reference for calculation of relative fold changes. Differentially expressed genes were those with a relative fold-increase ≥ 3.0 and the false-positive error-rate was set at 1% ($p < 0.01$). Dark blue bars, YFV 17D; light blue bars, YFV Asibi.

The individual profiles for YFV 17D and YFV Asibi remained similar at m.o.i. 2, at 24 and 48 hpi (Fig 5B). At 48 hpi, slightly higher transcription levels were again seen for YFV 17D (Fig 5B).

Increases in transcription levels for each gene between 24 and 48 hpi are shown in Table 1. Gene transcription levels increased by 5.01 fold in YFV 17D infected cells and by 5.54 fold in YFV Asibi-infected

between these time points. As at low m.o.i., the biggest increase was observed for *IFI44L* in YFV 17D: 29.49 fold *versus* 27.87 for YFV Asibi.

Table 1. Activation of interferon-stimulated gene transcription, ratio of RFCs for at 48 hpi to 24 hpi.

Gene name	Sequence reference	YFV 17D		YFV Asibi	
		48 / 24 hpi RFC ratio	<i>p</i> value	48 / 24 hpi RFC ratio	<i>p</i> value
<i>IFI44L</i>	NM_006820	29.49	0.0014	27.87	0.0151
<i>IFITM1</i>	NM_003641	17.01	0.0033	14.35	0.0026
<i>IFI27</i>	NM_005532	13.80	0.0046	16.53	0.0069
<i>IFI6</i>	NM_005531	13.05	0.0335	11.46	0.0129
<i>IFI44</i>	NM_006417	12.24	0.0277	14.13	0.0542
<i>IFI35</i>	NM_005533	4.75	0.0307	4.51	0.0081
<i>IFI30</i>	NM_006332	4.07	0.0012	3.78	0.0099
<i>ISG15</i>	NM_005101	3.86	0.0377	4.81	0.0143
<i>CXCL10</i>	NM_001565	3.55	0.0256	3.13	0.0176
<i>IFIT3</i>	NM_001549	3.37	0.1557	2.70	0.1461
<i>MDA5</i>	NM_022168	3.23	0.0262	2.89	0.0104
<i>IFI16</i>	NM_005531	2.90	0.0404	3.39	0.0210
<i>OAS1</i>	NM_002534	2.71	0.0174	5.15	0.0191
<i>SP110</i>	NM_004509	2.65	0.0053	3.78	0.0113
<i>IFIT1</i>	NM_001548	2.50	0.0199	3.99	0.0003
<i>IFIT2</i>	NM_001547	2.25	0.1079	2.22	0.0956
<i>MX1</i>	NM_002462	2.14	0.0348	3.50	0.0077

RFC, relative fold change (calculated *versus* non-infected cells at T0); RFC ratios were calculated at m.o.i.

2.

Dynamics of interleukin and cytokine responses in YFV Asibi and YFV 17D infected cells.

Transcription data

At m.o.i. 0.01, four additional cytokines were detected at 48 hpi: *IL27* and *IL10 receptor subunit alpha* (*IL10RA*), associated with down-regulation of inflammation, and *IL1 α* and *IL6* and *IL12p35* (*IL12A*), associated with up-regulation of inflammation. *IL1 α* , *IL6*, *IL7* and *IL12A* were transcribed at higher levels in YFV 17D cells than in YFV Asibi-infected cells (Fig 6A). Except for *CD40*, the profile at 48 hpi was the same after both m.o.i. (Fig 6B).

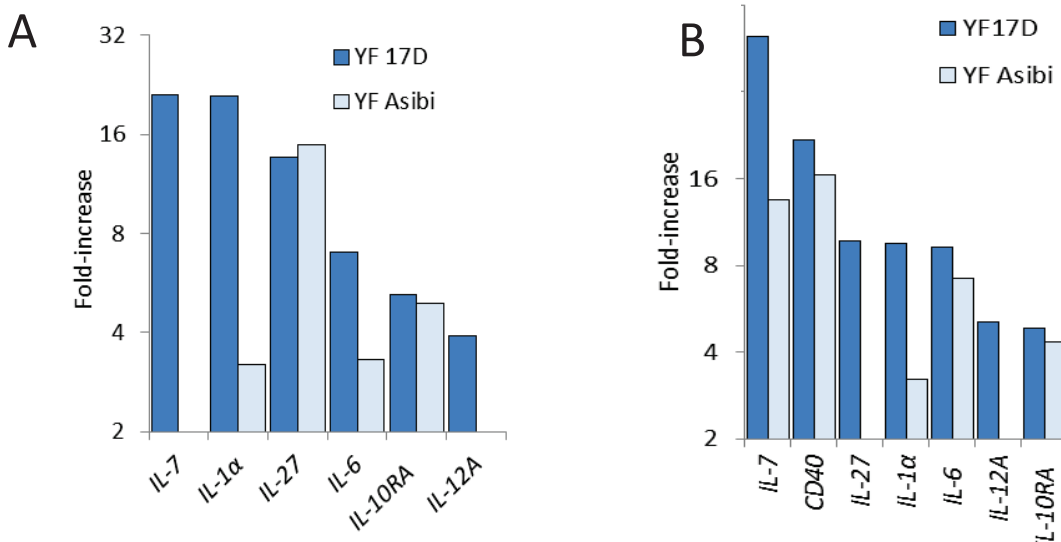


Figure 6. Transcription of cytokines and chemokines. hES-HEP cells were infected at m.o.i. 0.01 (A) or 2 (B) for 48 hours. Total messenger RNAs purified from infected and non-infected cells were reverse-transcribed into cDNA and analyzed using a pre-designed PCR array (QIAgen, #PAHS-021Z). Non-infected cells at T0 were used as reference for calculation of relative fold changes. Differentially expressed genes were those with a relative fold-increase ≥ 3.0 and the false-positive error-rate was set at 1% ($p < 0.01$). Dark blue bars, YFV 17D; light blue bars, YFV Asibi.

Secreted mediators

We tested the secretion of 19 factors identified by PCR array and 16 additional molecules previously shown to be associated with yellow fever disease resolution or progression in [47,48]. Four genes (IL2, IL3, IL5 and IL13) that showed low transcription levels (< 8) in RT-qPCR and two genes (IL7; IL27) with transcription RFCs between 10 and 50, depending on virus and viral load used, were not secreted (Fig 7). With the exception of IFN- $\lambda 1$ at m.o.i. 0.01, the secretory profiles for infected cells were consistent with the detection of factors by PCR array (not shown). Indeed, although similar transcription RFCs were observed for IFN- $\lambda 1$ after YFV 17D and YFV Asibi infection at 0.01 m.o.i. (3654 fold and 2210 fold

respectively), protein levels in YFV Asibi-infected hepatocytes were below the detection threshold (Fig 7). This may reflect the kinetics of IFN- λ 1 secretion, although further investigation would be needed to confirm this.

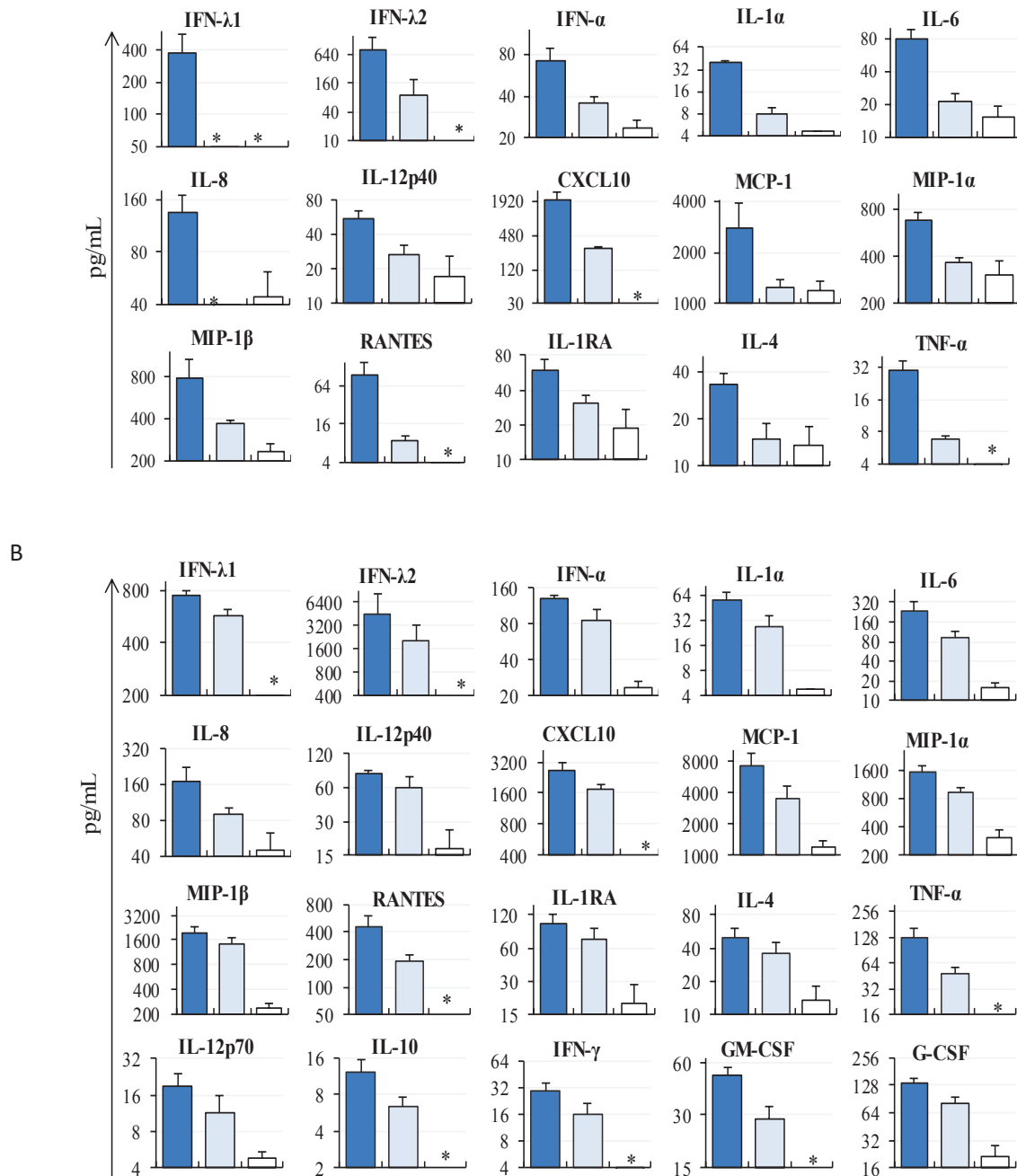


Figure 7. Quantification of secreted mediators in the supernatants of YFV 17D and YFV Asibi infected cells. hES-HEP cells were infected at m.o.i. 0.01 (A) or at m.o.i.2 (B) for 48 hours. Secreted mediators were quantified in triplicate in Luminex™ kits (Millipore; ref #: HCYTOMAG-60K, HCYTOMAG-62K, HCYPMAG-63K, HTH17MAG-14K). Dark blue bars, YFV 17D; light blue bars, YFV Asibi; white bars, control cells.

YFV 17D infection also elicited high activation levels for IFN- λ 2, RANTES/CCL5 (T- and NK-cells chemoattractant), IP-10/CXCL10 and TNF- α and MIP-1 β (Table 2). Transcription levels of these factors were consistently higher at m.o.i. 2 than at m.o.i. 0.01, and were higher in YFV 17D than YFV Asibi infected cells (Table 2). Ten cytokines were not detected at m.o.i. 0.01 after YFV Asibi infection but were detected at m.o.i. 2, at slightly lower levels than YFV 17D. These cytokines included two anti- (IL1RA and IL4) and three pro-(IL12p40, IL1 α , and IL6) inflammatory factors as well as three chemoattractant cytokine or chemokines (IL8/CXCL8, MCP-1 and MIP-1 α) and type I/III interferons (IFN- α ; IFN- λ 1) (Fig 7 and Table 2).

Table 2. Protein relative fold increase following YFV 17D or YFV Asibi infection at 48 hpi.

	m.o.i. 0.01		m.o.i. 2	
Protein	YFV Asibi	YFV 17D	YFV Asibi	YFV 17D
IFN- λ 2	22	198	512	1153
RANTES/ CCL5 ^a	15	159	320	768
IP-10/CXCL10	15	103	91	135
TNF- α	1.9	8.6	14	36
MIP-1 β /CCL4 ^a	1.6	3.4	6.2	8.4
IFN- λ 1	ND	8.0	12	16
IL1 α	ND	8.4	5.7	12
IFN- α	ND	3.0	3.6	5.5

IL6	ND	5.2	5.9	15
IL8/CXCL8	ND	3.1	2.0	3.9
IL4	ND	2.4	2.6	3.6
IL12p40	ND	3.1	3.5	4.7
IL1RA ^a	ND	3.2	3.9	5.3
MCP-1/ CCL2 ^a	ND	2.3	3.0	6.2
MIP-1 α /CCL3 ^a	ND	2.2	3.0	4.9
IFN- γ	ND	ND	5.5	9.8
IL12p70	ND	ND	2.4	4.0
IL10	ND	ND	12	22
G-CSF ^a	ND	ND	3.8	6.3
GM-CSF ^a	ND	ND	3.5	6.3

Protein relative fold increases were calculated *versus* non-infected cells at T0. The positivity threshold was set at >1.5 fold.

^ano tested in transcription analysis

ND, Not Detected

Finally, 5 cytokines were secreted at m.o.i. 2 only, for both YFV 17D and YFV Asibi-infected cells: IL10, IL12p70 and IFN- γ at low levels, consistent with their low or non significant transcription level (Fig 6), and two colony stimulating factors, G-CSF and GM-CSF, previously observed in patients with post-vaccination serious adverse events [49].

In conclusion, YFV 17D and YFV Asibi infections elicited similar expression profiles. However, YFV 17D activated a large panel of soluble factors with low viral load whereas YFV Asibi needed a high infectious load to induce the same panel of factors as induced by the YFV 17D strain at similar or lower activation levels.

Transcription analysis of apoptosis and hepatotoxicity-related factors

The following analyses were conducted on cells infected at m.o.i. 2 for 48 hours.

Apoptosis (data not shown)

YFV 17D infection triggered significant increases in the transcription of genes related to apoptosis signaling: *tumor necrosis factor* (*TNF*; RFC=17, $p<0.01$) and *TNF soluble factor 10* (*TNFSF10*; RFC=63, $p<0.001$); *CD27*, a co-stimulatory signal (RFC=6.7, $p<0.05$), and its ligand *CD70* (RFC=9.01, $p<0.01$), and *TNF-receptor soluble factor 1B* (*TNFRSF1B*) (RFC=4.9, $p<0.01$) an anti-apoptotic mediator. A marked increase in *TNFSF10* transcription, of similar magnitude to that observed for YFV 17D, was also observed after YFV Asibi infection (RFC=50, $p<0.001$).

YFV 17D infection also triggered higher, although not statistically confirmed, levels of transcription of apoptosis effector and regulator genes than YFV Asibi infection: *caspase 10* (RFCs: 5.8 vs 3.5, respectively, $p<0.01$), *BIRC3* (RFCs: 12 vs 6.8, $p<0.001$) and *BCL2L11* (RFCs: 3.0 vs 4.2, $p<0.01$).

Finally, YFV 17D infection led to higher transcription levels of *Casp1* than YFV Asibi (RFC: 112 vs 44, respectively, $p<0.01$). CASP1 is involved in pyroptosis, a programmed lytic cell death pathway, in the liver [50,51].

Necrosis and hepatotoxicity

YFV 17D infection led to transcriptional down-regulation of 5 pathways (hepatic toxicity and necrosis, excess accumulation of lipids, bile retention, and growth control) involving 13 genes (Table 3). The transcription of 4 of these genes was also modified in YFV Asibi-infected cells, to similar levels: family 214A (FAM214A) involved in protein degradation (RFC=7.1, $p=0.0141$), hydroxyacid oxidase (HA02) and SERPIN gene A3 (SERPINA3) involved in lipid degradation (RFC=4.9, $p=0.0306$ and RFC=6.9, $p=0.0001$, respectively), and thioredoxin reductase 1(TXNRD1) (RFC=-4.1, $p=0.0007$), involved in protection against oxidative stress. These the only genes transcriptionally regulated by YFV Asibi infection at this time point, again possibly due to a kinetic effect. Analyses at later time points (72 or 96 hpi) could be conducted because of the poor quality of RNA recovered from dying cells. This observation suggests that YFV Asibi-infected hepatocytes may be less able to counteract the toxic effects of infection than YFV 17D-infected hepatocytes.

Table 3. Hepatotoxicity-related differentially expressed genes after YFV 17D infection at 48 hpi and m.o.i. 2

Pathway	Sequence reference	Gene name	RFC	P value	Pathway Regulation
Necrosis	NM_019600	<i>FAM214A^a</i>	8.6	0.0004	Down
	NM_176863	<i>PSME3</i>	-5.0	0.0033	Down
Hepatocellular carcinoma	NM_005804	<i>DDX39A</i>	-4.0	0.0033	Down
Hepatotoxicity	NM_003251	<i>THRSP</i>	4.5	0.0084	Down
	NM_000706	<i>AVPR1A</i>	15	0.0062	Down
	NM_013402	<i>FADS1</i>	-5.8	0.0022	Up
	NM_016527	<i>HAO2^a</i>	3.0	0.0038	Down
	NM_000224	<i>KRT18</i>	-3.8	0.0061	Down
	NM_002273	<i>KRT8</i>	-3.9	0.0027	Down
	NM_003330	<i>TXNRD1^a</i>	-3.6	0.0008	Down
	NM_024640	<i>YRDC</i>	-4.5	0.0101	Down
	NM_000034	<i>ALDOA</i>	-4.2	0.0113	Down
Cholestasis	NM_152672	<i>SLC51A</i>	-4.6	0.0040	Down
Phospholipidosis	NM_001085	<i>SERPINA3^a</i>	3.6	0.0146	Up
	NM_001443	<i>FABP1</i>	-8.4	0.0014	Down

RFC, relative fold-changes were calculated *versus* non-infected cells at T0. Pathway regulation: see QIAgen™ site (<https://b2b.qiagen.com/fr/shop/pcr/primer-sets/rt2-profiler-pcr-arrays?catno=PAHS-093Z#geneglobe>).

^aalso detected in YFV Asibi infected cells: *FAM214A* (RFC=7.1, p=0.0141), *HAO2* (RFC=4.9, p=0.0306), *TXNRD1* (RFC=-4.1, p=0.0007) and *SERPINA3* (RFC=6.9, p=0.0001).

Discussion

The liver is an organ that is naturally biased toward immune tolerance due to the influence of a microenvironment characterized by healthy microbiota. However, eradication of viral pathogens requires the virus to elicit an efficient antiviral response involving early control of viral replication and limitation of virus dissemination in the body. As the threshold for engaging immune defenses in the liver is likely to be higher than in other organs, this presents a challenge for the clearance of hepatotropic viruses such as yellow fever virus.

121

The absence of viscerotropism in humans is a hallmark of live-attenuated YFV 17D-based vaccines; as such, no evidence of post-vaccination liver infection has been reported to date. *In vitro*, however, YFV 17D and YFV Asibi exhibit the same large spectrum of cell tropism, infecting various hepatic cells [52,53]. Due to loss of specific metabolic and immune functions during the establishment of cell lines, YFV 17D replication in these cells could be an artifact. We therefore chose to explore a more physiological model. Human embryonic stem cell-derived hepatocytes share the same major metabolic pathways as primary hepatocytes and support productive infection by viruses that are strictly dependent on liver metabolism for their replication, like HCV and HBV [29]. The time-course investigation that we conducted in parallel in these cells with m.o.i. 2 constitutes the most comprehensive analysis of YFV 17D and YFV Asibi response in hepatocytes, with identification of about 70 genes involved in immunity or liver metabolism.

We confirm that primary-like hepatocytes can support the infection and the replication of YFV 17D, implying that liver infection may also happen *in vivo*. Such infection would have to be transient and rapidly cleared to remain undetected. In a previous study, viral genome shedding in the urine of some individuals between days 4 and 7 following primary vaccination, without further pathological significance, evoked a potential link with progressive clearance of virus replicating in lymph nodes [54].

In this study, infection of YFV 17D elicited a potent antiviral response. The MDA5 signaling pathway, which has previously been shown to recognize flavivirus dsRNA and further activate IFN α / β signaling *in vitro* and *in vivo* [37,38], was activated as early as 4 hpi. At later time points, we observed the induction of high levels of type I and type III IFNs and a balanced pro-/anti-inflammatory profile from an m.o.i of just 0.01. Type III interferons are the more recently discovered members of the IFN family and share most antiviral signaling properties with type I IFN. Their distinctive characteristic is the recognition of epithelial-specific receptors [55]. Induction of IFN- λ s in another model of stem-cells derived hepatocytes was shown to be predictive of the *in vivo* immune response against HCV [29]. The capacity of YFV 17D virus to activate dsRNA sensing pathway and to elicit strong innate immune responses (including early activation of IRF7) was previously reported *in vivo* in YFV 17D-vaccinated subjects [41,42] and macaques [2], and *in vitro* in hepatic cells, but only on a few selected genes [47,48].

We also observed transcriptional activation of apoptosis-related molecules, suggesting efficient clearance of YFV 17D infection and thus reflecting a full antiviral response.

Decreased hepatic transcription and expression of CYP450s have been reported in humans during the acute phase of infection, in response to several pathogens mediated by the production of inflammatory cytokines [56,57]. To note, transcription levels of CYP450 genes *in vitro* have been shown to correlate with protein expression levels *in vivo* [58]. YFV 17D infection in our model inhibited the transcription of phase I and phase II enzymes (Fig 2), confirming the relevance of these metabolically competent hES-HEP cells for liver infection studies. This negative regulation could reflect cell attempts to increase survival, also consistent with the down-regulation of hepatotoxicity-related genes observed after YFV 17D infection.

Several chemokines involved in the recruitment of lymphocytes were activated after infection of hES-HEP cells hepatocytes [59]. NK lymphocytes are innate lymphocytes and resident cells in the liver, and are likely to be the first cells recruited. Induction of a robust NK-cell response after YFV 17D vaccination was recently positively correlated with plasma type I and type III IFN levels [60], two cytokines strongly

activated in YFV 17D infected hepatocytes. Splenic and hepatic NK cells have been recently shown to mediate antigen-specific memory responses in non-human primates [61].

hES-HEP cells were also found to be permissive to YFV Asibi infection, albeit to a lesser extent than after YFV 17D infection, as previously reported in hepatic and non-hepatic cell lines [53,62]. The most probable explanation underlying these differences in cell permissiveness resides in a genome mutation at amino acid 380 (K->R) in the E envelope, known to enhance YFV 17D binding to low-affinity cell surface receptors glycosaminoglycans, and infection efficiency [62–65]. Recent findings have shown that YFV 17D and YFV Asibi may use different endocytosis pathways [62,66], potentially explaining the differences observed in levels of infection. In the current study, both clathrin- and caveolin-dependent endocytosis pathways were involved in YFV 17D and YFV Asibi entry. The possibility of an alternative cell entry pathway being involved, for example *via* hepatic transporters or multistep mechanism, as recently described for HBV or HCV [67,68], cannot be ruled out.

After cell entry, YFV Asibi replication was more restricted than YFV 17D replication, as shown by the lower viral spread in hepatocyte cultures. The antiviral profile elicited by wild-type YFV Asibi in hES-HEP cells appears incomplete, delayed, and dependent on the viral load. At first sight, this does not appear consistent with the higher IFN levels and kinetics of induction observed after infection with YFV 17D vs YFV Asibi. The IFN-dependent innate immune response is indeed essential for protection against flavivirus infections. YFV and several other RNA viruses have developed strategies to escape the IFN response and to counteract dsRNA recognition at an early stage [69]. Non-structural viral proteins are involved in antagonizing the IFN response through various mechanisms including limitation of IFN- α transcription or down-regulation of ISG expression [70]. In addition, YFV Asibi and YFV 17D genetically differ by about 20 amino acids, distributed throughout the genome [71]. It is thus conceivable that mutations in non-structural genes may partially relieve the control exerted by the virus on IFN signaling, allowing limited dissemination.

YFV Asibi infection had little or no impact on hepatic clearance functions, or on hepatotoxicity at the tested time points. Notably, glutamic acid decarboxylase GAD-1 transcription was not down-regulated in YFV Asibi-infected cells, but was down-regulated in YFV 17D-infected cells. GAD-1 is an activator of gamma-aminobutyric acid (GABA), a major neurotransmitter in the mammalian brain. GABA increase is associated with liver failure and hepatic encephalopathy [72]. Therefore, the ability of YFV 17D to control hepatic metabolism and GABA production may be an additional mechanism underlying the absence of symptoms after vaccination. In this study, YFV Asibi infection did not interfere with transcription of the biotransformation pathway. This may reflect a kinetic effect, although we were unable to continue the analysis at later time points due to lytic effects, resulting in poor RNA quality. Additionally, cell death may occur very soon after transcription activation of liver enzymes, such that RNA levels would only represent those cells with a remaining basal level of transcription of these enzymes. This hypothesis is supported by the observation that Casp1, involved in the activation of pyroptosis, a programmed lytic cell death pathway in hepatocytes [50,51], was the only caspase transcribed after YFV infection.

An increase in viral load by 200 fold (from m.o.i. 0.01 to m.o.i. 2) had only limited effects on viral entry and replication levels, but resulted in increased intensity and quality of the innate response. Recent data suggest that efficiency of type I IFN activation by RNA viruses is determined by the intracellular concentration of RIG-I and MDA5 [73]. High concentrations of virus could increase viral avidity and fixation at low-affinity cell surface receptors, like glycosaminoglycans, resulting in the internalization of more viral particles and increased recruitment of pathogen sensors.

The minimal 50% mouse lethal dose of YFV 17D recommended by WHO for human vaccination is 3.0 $\log_{10}$, corresponding approximately to 4.0 $\log_{10}$ PFU [74]. The lowest dose used in our experiments was in the same range. The ability of YFV 17D, but not wild-type YFV Asibi, to induce strong innate immunity and to establish memory response in the liver at low dose might explain how YFV 17D-based vaccines can establish life-long protection [75,76]. We no longer detected significant differences between the two

strains from 24 hpi when cells were infected with a greater viral load, suggesting that successful antiviral response and recovery may be dependent on a minimal threshold of infection. Such observations may reflect the ability of wild-type YFV to induce an adequate and efficient response, in-line with the spontaneous resolution of infection observed in about 80% of infected patients, with a return to normal liver histology and development of protective immunity [77].

In conclusion, our data suggest that the YF17D virus can disrupt liver tolerance and elicit a robust hepatic antiviral immune response. Infection of hepatocytes *in vivo* may play a role in establishing local protection in the main tissue targeted by natural infection. Inversely, inefficient replication of wild-type virus in hepatocytes combined with the induction of a weaker innate response may contribute to incomplete viral clearance and potential persistence and reactivation, as described for other hepatic viruses [78]. The tight regulation of these processes is mediated by the liver cellular microenvironment including not only hepatocytes but also by specific immune resident cells such as Kupffer cells, NK cells or stellate cells [79]. Further studies on yellow fever virus hepatic involvement should consider interactions between these populations.

Acknowledgments

We thank Sandrine Raynaud for technical help and Aymeric De Montfort for statistical help. We also thank Fabienne Piras, PhD, and Nathalie Mantel for sharing, respectively, A129 mice infection data and sequence data of YF Asibi and YF 17D strains used in these studies, and for scientific discussions. Finally, we are very grateful to Daniel Larocque, PhD and Bachra Rokbi, PhD for their critical review of the manuscript. Medical editing services were provided by Juliette Gray, inScience Communications, Springer Healthcare. Funding for this assistance was provided by Sanofi Pasteur.

Reference List

1. Monath TP, Vasconcelos PF (2015) Yellow fever. *J Clin Virol* 64: 160-173.
2. Engelmann F, Josset L, Girke T, Park B, Barron A, Dewane J, Hammarlund E, Lewis A, Axthelm MK, Slifka MK, Messaoudi I (2014) Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3295.
3. Monath TP (2010) Suspected yellow fever vaccine-associated viscerotropic adverse events (1973 and 1978), United States. *Am J Trop Med Hyg* 82: 919-921.
4. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade HF, Jr., Vasconcelos PF, Duarte MI (2007) Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 161-168.
5. Monath TP, Barrett AD (2003) Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv Virus Res* 60: 343-395.
6. Quaresma JA, Duarte MI, Vasconcelos PF (2006) Midzonal lesions in yellow fever: a specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response. *Med Hypotheses* 67: 618-621.
7. Crispe IN (2014) Immune tolerance in liver disease. *Hepatology* 60: 2109-2117.

8. Quaresma JA, Barros VL, Fernandes ER, Pagliari C, Takakura C, Costa Vasconcelos PF, de AH, Jr., Duarte MI (2005) Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. *Acta Trop* 94: 116-127.
9. Quaresma JA, Barros VL, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, Costa Vasconcelos PF, Andrade Junior HF, Duarte MI (2006) Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus Res* 116: 91-97.
10. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF, Andrade HF, Jr., Vasconcelos PF, Duarte MI (2006) Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. *Virology* 345: 22-30.
11. Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, Klimstra WB, Ryman KD (2009) A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog* 5: e1000614.
12. Rubenstein D, Baker MR, Stott EJ, Tavill AS (1974) The maintenance of liver cells in vitro for virological and other studies. *Br J Exp Pathol* 55: 20-25.
13. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT (2007) Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem Biol Interact* 168: 30-50.
14. Hewitt NJ, Lechon MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li AP, LeCluyse E, Groothuis GM, Hengstler JG (2007) Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes

in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39: 159-234.

15. LeCluyse EL, Alexandre E (2010) Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol* 640: 57-82.
16. Shulman M, Nahmias Y (2013) Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes. *Methods Mol Biol* 945: 287-302.
17. Nakabayashi H, Taketa K, Yamane T, Miyazaki M, Miyano K, Sato J (1984) Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. *Gan* 75: 151-158.
18. Pfeifer AM, Cole KE, Smoot DT, Weston A, Groopman JD, Shields PG, Vignaud JM, Juillerat M, Lipsky MM, Trump BF, . (1993) Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5123-5127.
19. Donato MT, Tolosa L, Gomez-Lechon MJ (2015) Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol* 1250: 77-93.
20. Sumpter R, Jr., Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. (2005) Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79: 2689-2699.
21. Preiss S, Thompson A, Chen X, Rodgers S, Markovska V, Desmond P, Visvanathan K, Li K, Locarnini S, Revill P (2008) Characterization of the innate immune signalling pathways in hepatocyte cell lines. *J Viral Hepat* 15: 888-900.

22. Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV (1998) Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett* 431: 227-230.
23. Brolen G, Sivertsson L, Bjorquist P, Eriksson G, Ek M, Semb H, Johansson I, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M, Heins N (2010) Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *J Biotechnol* 145: 284-294.
24. Ek M, Soderdahl T, Kuppers-Munther B, Edsbagge J, Andersson TB, Bjorquist P, Cotgreave I, Jernstrom B, Ingelman-Sundberg M, Johansson I (2007) Expression of drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biochem Pharmacol* 74: 496-503.
25. Keller G (2005) Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 19: 1129-1155.
26. Soderdahl T, Kuppers-Munther B, Heins N, Edsbagge J, Bjorquist P, Cotgreave I, Jernstrom B (2007) Glutathione transferases in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 21: 929-937.
27. Sun P, Zhou X, Farnworth SL, Patel AH, Hay DC (2013) Modeling human liver biology using stem cell-derived hepatocytes. *Int J Mol Sci* 14: 22011-22021.
28. Szkolnicka D, Zhou W, Lucendo-Villarin B, Hay DC (2013) Pluripotent stem cell-derived hepatocytes: potential and challenges in pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53: 147-159.
29. Zhou X, Sun P, Lucendo-Villarin B, Angus AG, Szkolnicka D, Cameron K, Farnworth SL, Patel AH, Hay DC (2014) Modulating innate immunity improves hepatitis C virus infection and replication in stem cell-derived hepatocytes. *Stem Cell Reports* 3: 204-214.

30. Barban V, Girerd Y, Aguirre M, Gulia S, Petiard F, Riou P, Barrere B, Lang J (2007) High stability of yellow fever 17D-204 vaccine: a 12-year retrospective analysis of large-scale production. *Vaccine* 25: 2941-2950.
31. Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM (1987) Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2019-2023.
32. Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, Barban V (2008) Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J Virol Methods* 151: 40-46.
33. Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ (1989) Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol* 1: 285-296.
34. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25: 402-408.
35. Johansson K, Jarvliden J, Gogvadze V, Morgenstern R (2010) Multiple roles of microsomal glutathione transferase 1 in cellular protection: a mechanistic study. *Free Radic Biol Med* 49: 1638-1645.
36. Spector AA, Kim HY (2015) Cytochrome P450 epoxygenase pathway of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1851: 356-365.
37. Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M, Jr. (2008) Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *J Virol* 82: 609-616.

38. Suthar MS, Aguirre S, Fernandez-Sesma A (2013) Innate immune sensing of flaviviruses. *PLoS Pathog* 9: e1003541.
39. Schoggins JW, Rice CM (2011) Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 1: 519-525.
40. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM (2011) A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472: 481-485.
41. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, Moser JM, Mehta RS, Drake DR, III, Castro E, Akondy R, Rinfret A, Yassine-Diab B, Said EA, Chouikh Y, Cameron MJ, Clum R, Kelvin D, Somogyi R, Greller LD, Balderas RS, Wilkinson P, Pantaleo G, Tartaglia J, Haddad EK, Sekaly RP (2008) Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* 205: 3119-3131.
42. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, Pirani A, Gernert K, Deng J, Marzolf B, Kennedy K, Wu H, Bennouna S, Oluoch H, Miller J, Vencio RZ, Mulligan M, Aderem A, Ahmed R, Pulendran B (2009) Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 10: 116-125.
43. Das A, Dinh PX, Panda D, Pattnaik AK (2014) Interferon-inducible protein IFI35 negatively regulates RIG-I antiviral signaling and supports vesicular stomatitis virus replication. *J Virol* 88: 3103-3113.
44. Hou L, Jie Z, Liang Y, Desai M, Soong L, Sun J (2015) Type 1 interferon-induced IL-7 maintains CD8+ T-cell responses and homeostasis by suppressing PD-1 expression in viral hepatitis. *Cell Mol Immunol* 12: 213-221.

45. Liang B, Hara T, Wagatsuma K, Zhang J, Maki K, Miyachi H, Kitano S, Yabe-Nishimura C, Tani-Ichi S, Ikuta K (2012) Role of hepatocyte-derived IL-7 in maintenance of intrahepatic NKT cells and T cells and development of B cells in fetal liver. *J Immunol* 189: 4444-4450.
46. Sawa Y, Arima Y, Ogura H, Kitabayashi C, Jiang JJ, Fukushima T, Kamimura D, Hirano T, Murakami M (2009) Hepatic interleukin-7 expression regulates T cell responses. *Immunity* 30: 447-457.
47. Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR (2011) Differential cytokine responses from primary human Kupffer cells following infection with wild-type or vaccine strain yellow fever virus. *Virology* 412: 188-195.
48. Woodson SE, Holbrook MR (2011) Infection of hepatocytes with 17-D vaccine-strain yellow fever virus induces a strong pro-inflammatory host response. *J Gen Virol* 92: 2262-2271.
49. Bae HG, Domingo C, Tenorio A, de Ory F, Munoz J, Weber P, Teuwen DE, Niedrig M (2008) Immune response during adverse events after 17D-derived yellow fever vaccination in Europe. *J Infect Dis* 197: 1577-1584.
50. Jorgensen I, Miao EA (2015) Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev* 265: 130-142.
51. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE (2014) NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 59: 898-910.
52. Brandler S, Brown N, Ermak TH, Mitchell F, Parsons M, Zhang Z, Lang J, Monath TP, Guirakhoo F (2005) Replication of chimeric yellow fever virus-dengue serotype 1-4 virus vaccine strains in dendritic and hepatic cells. *Am J Trop Med Hyg* 72: 74-81.

53. Lefevre A, Contamin H, Decelle T, Fournier C, Lang J, Deubel V, Marianneau P (2006) Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection. *Microbes Infect* 8: 1530-1538.
54. Domingo C, Yactayo S, Agbenu E, Demanou M, Schulz AR, Daskalow K, Niedrig M (2011) Detection of yellow fever 17D genome in urine. *J Clin Microbiol* 49: 760-762.
55. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV (2005) Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 79: 3851-3854.
56. Morgan ET, Sewer MB, Iber H, Gonzalez FJ, Lee YH, Tukey RH, Okino S, Vu T, Chen YH, Sidhu JS, Omiecinski CJ (1998) Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 26: 1232-1240.
57. Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, Charles KA, Clarke SJ, Kacevska M, Liddle C, Richardson TA, Sharma R, Sinal CJ (2008) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug Metab Dispos* 36: 205-216.
58. Kirby BJ, Collier AC, Kharasch ED, Dixit V, Desai P, Whittington D, Thummel KE, Unadkat JD (2011) Complex drug interactions of HIV protease inhibitors 2: in vivo induction and in vitro to in vivo correlation of induction of cytochrome P450 1A2, 2B6, and 2C9 by ritonavir or nelfinavir. *Drug Metab Dispos* 39: 2329-2337.
59. Tian Z, Chen Y, Gao B (2013) Natural killer cells in liver disease. *Hepatology* 57: 1654-1662.
60. Marquardt N, Ivarsson MA, Blom K, Gonzalez VD, Braun M, Falconer K, Gustafsson R, Fogdell-Hahn A, Sandberg JK, Michaelsson J (2015) The Human NK Cell Response to Yellow Fever Virus

17D Is Primarily Governed by NK Cell Differentiation Independently of NK Cell Education. J Immunol 195: 3262-3272.

61. Reeves RK, Li H, Jost S, Blass E, Li H, Schafer JL, Varner V, Manickam C, Eslamizar L, Altfeld M, von Andrian UH, Barouch DH (2015) Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. Nat Immunol 16: 927-932.
62. Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Chazal M, Hafirassou ML, Dejarnac O, Zamborlini A, Despres P, Sauvonnnet N, Arenzana-Seisdedos F, Jouvenet N, Amara A (2016) Vaccine and Wild-Type Strains of Yellow Fever Virus Engage Distinct Entry Mechanisms and Differentially Stimulate Antiviral Immune Responses. MBio 7.
63. Hilgard P, Stockert R (2000) Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. Hepatology 32: 1069-1077.
64. Lee E, Lobigs M (2008) E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. J Virol 82: 6024-6033.
65. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J (2011) Flavivirus cell entry and membrane fusion. Viruses 3: 160-171.
66. Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX (2011) Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. Amino Acids 41: 1159-1163.
67. Douam F, Lavillette D, Cosset FL (2015) The mechanism of HCV entry into host cells. Prog Mol Biol Transl Sci 129: 63-107.
68. Li W (2015) The hepatitis B virus receptor. Annu Rev Cell Dev Biol 31: 125-147.

69. Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S (2013) Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine* 31: 461-471.
70. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A (2003) Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14333-14338.
71. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH (1985) Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229: 726-733.
72. Jones EA, Mullen KD (2012) Theories of the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Clin Liver Dis* 16: 7-26.
73. Akhrymuk I, Frolov I, Frolova EI (2016) Both RIG-I and MDA5 detect alphavirus replication in concentration-dependent mode. *Virology* 487: 230-241.
74. Ferguson M, Heath A (2004) Collaborative study to assess the suitability of a candidate International Standard for yellow fever vaccine. *Biologicals* 32: 195-205.
75. Jiang X, Chen Y, Peng H, Tian Z (2013) Memory NK cells: why do they reside in the liver? *Cell Mol Immunol* 10: 196-201.
76. Tse SW, Cockburn IA, Zhang H, Scott AL, Zavala F (2013) Unique transcriptional profile of liver-resident memory CD8⁺ T cells induced by immunization with malaria sporozoites. *Genes Immun* 14: 302-309.
77. Quaresma JA, Pagliari C, Medeiros DB, Duarte MI, Vasconcelos PF (2013) Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Rev Med Virol* 23: 305-318.

78. Chang M, Williams O, Mittler J, Quintanilla A, Carithers RL, Jr., Perkins J, Corey L, Gretch DR (2003)
Dynamics of hepatitis C virus replication in human liver. *Am J Pathol* 163: 433-444.
79. Doherty DG (2016) Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review. *J Autoimmun* 66: 60-75.

B. Etude N°2 : Comparaison des méthodes de normalisation appliquées aux données de séquençage de l'ARN

1. Problématique

L'utilisation de modèles miniaturisés nécessite l'adaptation des technologies associées. Dans notre première approche, nous avons conduit notre étude transcriptomique en privilégiant des primers ciblés sur les réponses immunitaires et métaboliques et précédemment associés aux réponses antivirales notamment contre le virus de la fièvre jaune. Le séquençage de l'ARN permet de s'affranchir de cette phase de pré-sélection et de randomiser l'approche transcriptomique. Cette technologie permet de détecter l'ensemble des transcrits modulés par une condition expérimentale et de les aligner sur les séquences de gènes connues et référencées. La génération d'une multitude de données oblige l'expérimentateur à contrôler activement les paramètres statistiques de l'analyse ainsi que l'approche de normalisation à utiliser. Cette normalisation des données est activement discutée dans le domaine. Des modèles sont régulièrement développés pour répondre à un besoin d'analyse, de limitation des faux positifs et de confiance sur des données qui ne bénéficieront pas nécessairement d'analyses complémentaires par la suite. Il est important de noter que la question biologique reste avant toutes choses la clé de l'expérimentateur dans ces approches et que l'implémentation de ces modèles d'analyse doit se faire en étroite collaboration.

1. Analyse transcriptomique par séquençage

Afin d'analyser l'effet des virus vaccinaux et sauvages de la fièvre jaune sur le transcriptome des cellules hépatiques, la technologie RNASeq a été utilisée. Cette dernière permet de connaître l'abondance d'un ARN transcrit donné dans les cellules infectées ou non infectées. Au sein de chaque condition testée, l'ARN est extrait, purifié et découpé en fragment de tailles identiques. Ces fragments sont alors amplifiés et lus par le séquenceur qui fournit les séquences nucléotidiques de ces fragments. L'identification du transcrit se fait par l'analyse de sa séquence nucléotidique qui sera par la suite alignée sur le génome humain de référence. Le nombre de séquences lues et alignées sur une région d'intérêt est ainsi considéré comme proportionnel au niveau d'expression de cette région d'intérêt.

Notre étude s'est portée sur l'utilisation du séquençage par synthèse (en anglais « sequencing by synthesis (SBS) »). Après amplification des librairies, ces dernières se trouvent attachées sur la « flowcell ». Quand la polymérase allonge le brin avec un dNTP (A, C, G ou T) marqué par fluorescence de couleur spécifique, une source de lumière excite le marqueur et un détecteur optique enregistre la couleur. Une fois incorporé, le fluorochrome est clivé, permettant ainsi l'ajout d'un nouveau dNTP lors du cycle suivant. Chaque cycle ne permettant l'ajout que d'un nucléotide à la fois, la méthode permet d'avoir une détermination précise de la séquence de chaque transcrit (Figure 14).

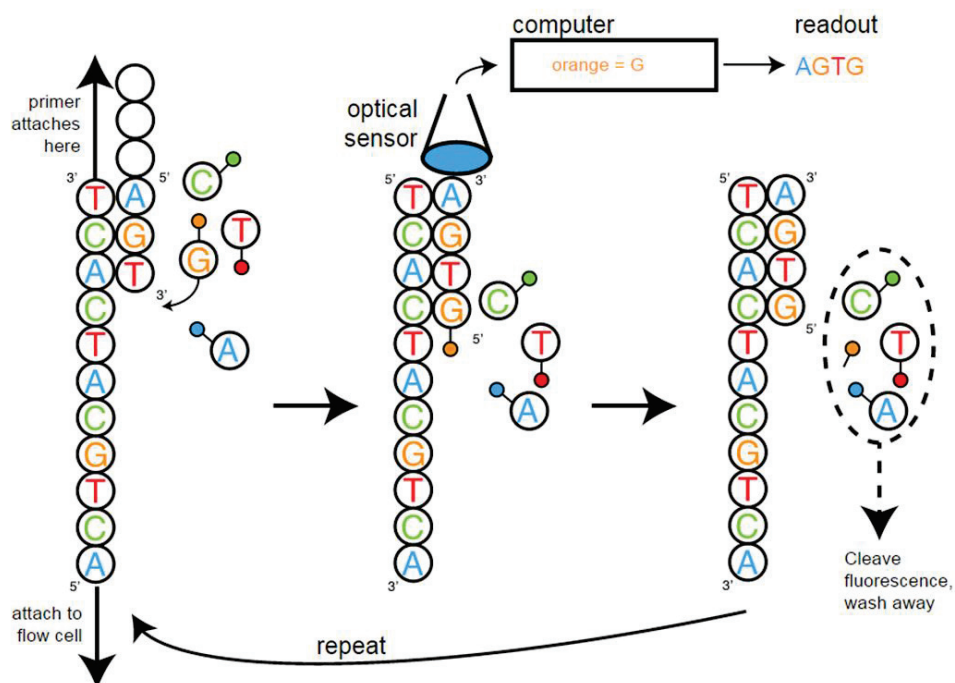


Figure 15. Principe du Séquençage par synthèse.

Figure issue de <https://binf.snipcademy.com/lessons/ngs-techniques/illumina-solexa>

D'un point de vue pratique, les données brutes sont fournies sous la forme d'un fichier .fastq donnant le nom, la séquence et la longueur de chacun des reads lus dans l'échantillon. Un code est également appliqué pour chaque read afin d'indiquer la qualité de lecture de chacun des nucléotides de ce read. Un premier filtre qualitatif est alors appliqué pour améliorer la fiabilité de ces lectures. Une fois filtrées, les

données brutes sont alignées sur le génome de référence afin d'obtenir des données d'expression de chaque transcrit et de les rendre comparables entre les différentes conditions biologiques testées. Cette notion de comparabilité des échantillons est un point clé du séquençage. La qualité de ces comparaisons pouvant être biaisée par le nombre de reads lus, il est nécessaire d'appliquer des facteurs de normalisation avant toute analyse différentielle. Plusieurs méthodes de normalisation que nous discuterons plus tard ont été utilisées dans notre approche. Une fois normalisées, les données peuvent être utilisées pour réaliser l'analyse différentielle, c'est à dire trouver les gènes qui ont un niveau d'expression significativement différent dans une condition par rapport à une autre. Une fois encore, les méthodes de calcul sont soumises à des règles strictes mais discutées aussi bien sur la gestion des répliques techniques et biologiques que sur le choix du test statistique à utiliser.

2. Principales observations de l'étude

Nous avons choisi d'évaluer différentes approches d'analyse et de normalisation des données de RNASeq. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte entre la longueur du transcrit, la profondeur de lecture, les variabilités techniques ou encore la possibilité de comparer par rapport à un échantillon théorique. Enfin l'utilisation d'ajouts quantifiés (« spikes » en anglais), largement utilisés sur les puces microarray, s'est également appliquée au séquençage de l'ARN. La possibilité d'associer la couverture d'un transcrit avec une quantité connue de celui-ci peut nous permettre de rationaliser l'établissement d'un seuil de détection pour l'ensemble du transcriptome étudié.

Nous avons donc utilisé les données de séquençage des ARN issus de deux modèles organotypiques de foie infectés ou non par les virus YFV Asibi ou YFV 17D. Des spikes d'ARN de plantes ont été utilisés et appliqués pour définir les seuils d'analyse et trois méthodes de normalisation ont été comparées en termes de nombres de transcrits détectés, de corrélations avec les données de PCR générées en parallèle sur un panel de gènes ciblés et enfin en termes de significativité biologique par une intégration des données sur le logiciel d'analyse Ingenuity Pathways Analysis[®] (IPA[®]). La première des méthodes,

appelée RUV pour « remove unwanted variation » se base sur l'utilisation des spikes pour définir des facteurs de variabilité de la technique et ainsi appliquer un facteur de correction aux données. La seconde, nommée DESeq2, définit la moyenne géométrique de l'ensemble des échantillons testés comme un standard par rapport auquel chaque échantillon, individualisé, doit être comparé. Enfin la méthode FPKM, pour « Fragment per kilobase of exon per million », prend en compte la longueur du transcrit analysé.

En appliquant les spikes à l'approche par FPKM, nous avons pu associer un seuil de détection minimal correspondant à une couverture théorique partielle de 0.63 % de couverture pour considérer un transcrit détecté. L'utilisation des méthodes DESeq2 et RUV a démontré l'apparition d'un plus grand nombre de gènes significativement dérégulés mais avec une apparition de faux positifs plus importante. Enfin l'intégration des données sur la plateforme d'analyse IPA® démontre une augmentation de la significativité de l'activation des voies de signalisation avec la méthode FPKM par rapport aux méthodes RUV et DESeq2. En particulier les voies de signalisation de la réponse antivirale (Réponse aux IFNs, activation des senseurs cytosoliques) apparaissent comme les voies majoritaires, corrélant ainsi avec les données de PCR précédemment observées dans le modèle d'hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires et avec les descriptions classiques de la réponse antivirale. Ces données sont néanmoins à reconsidérer dans une étude où la variabilité des souches étudiées et celle des modèles cellulaires restent réduites en comparaison d'études cliniques ou inter-espèces où les variabilités techniques et biologiques nécessiteront la reconsidération de ces approches.

Cette étude nous a ainsi permis de définir les paramètres standard de l'analyse du transcriptome de nos modèles suite à l'infection par les virus YFV Asibi ou YFV 17D. Ainsi, la méthode FPKM a été privilégiée dans nos analyses et seuls les transcrits présentant une couverture minimale de 0.63 dans l'ensemble des répliques d'une condition expérimentale ont été considérés pour l'analyse.

3. Etude (submitted_24 Novembre 2016)

Title: ERCC spikes benefits for RNASeq data normalization

Running title: Application of ERCC spikes for transcriptome analysis of yellow fever virus-infected cells

Authors : Magali Roche² & Nicolas Masse-Deragon¹, Marie Guinier², Clément Delestre², Véronique Barban¹, Catherine Legras-Lachuer^{2,3}

Affiliations : ¹ Department of Research and Development, Sanofi Pasteur, 1541 Avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France ; ² ViroScan3D, 11 allée des acacias, 01600 TREVoux, ³ UMR CNRS 5557, 10, rue Rafael Dubois, 69100 Villeurbanne Cedex

142

Corresponding authors :

Magali Roche, ViroScan3D, Université Rockefeller, 8 avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France

Tel +33 610981158 ; E-mail : magali.roche@viroscan3d.com

Nicolas Massé-Deragon, Sanofi Pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France

Tel +33 661741357 ; E-mail : nicolas.massederagon@gmail.com

Abstract

RNAseq is largely used to study differential gene expression, but despite recommendations from the ENCODE consortium, the lack of standardized procedures in terms of sample preparation and data analysis limit its ability to compare data from different experiments. Data normalization is one of the most crucial steps of data processing. But, if this step must be carefully considered for its possible effect on the results of the analysis, a generally accepted approach to the RNAseq read count and data normalization does not yet exist. In this work, we sequenced mRNA of two human cellular models following infection with vaccine or wild-type strains of Yellow Fever virus (YFV) in order to compare gene expression profiles and alternative normalization approaches. In a first step, we explored the ability of External RNA Control Consortium (ERCC) standards to detect technical biases between batches of sequencing experiments and to set detection thresholds. As a second goal, we compared three normalization methods (FPKM, DESeq2 and RUV) in order to identify the optimal analysis approach.

Background

Using next generation sequencing to analyse the RNA in a sample (i.e., RNAseq) allows for whole transcriptome identification which is useful in analyses such as nucleotide mutation description or differential gene expression analysis [252,253]. Main advantage of RNAseq is that it resolves many of the limitations of previous microarray technologies [254]. Because numerous sequence data are produced, estimation and interpretation of mRNA abundance cannot be directly performed. Therefore, the analysis methodology is critical for accurate data interpretation. Even though recommendations from the ENCODE consortium have evolved in recent years for RNAseq analysis, there is still a lack of standardized procedures thus limiting comparison between samples from different studies.

Many normalization methods have been proposed to correct technical and artificial biases between and within samples. Inter-sample normalization methods calculate scale factors according to library size, which is the total number of mapped reads. DESeq2 is based on negative binomial distribution, with variance and mean linked by local regression, and presents an implementation that also gives scale factors. This method considered an additional sample, defined as the geometric mean of all assessed samples, to normalize all samples before performed DEG analysis [255]. Reads/Fragments per kilobase per million mapped reads (RPKM/FPKM) is the most widely used method in next-generation sequencing research for length normalization. This approach is widely used in literature and combines inter- and intra-sample normalization, because it rescales gene counts to correct for differences in both library size and gene length to determine differential expression values [256,257].

In addition to previously introduced traditional normalization methods, the Remove Unwanted Variation (RUV) approach, which is a novel method recently published [258]. This method makes an innovative step by using ERCC spikes as external controls for normalization. RUV is a two steps method based on the determination of an unwanted variation factor and its implementation into a log-linear regression model to determine factor of wanted variation [258,259].

Among numerous normalization methods, the one that produces the best results must be determined. A comparison of the recently described methods will improve future analyses. In several works [260,261] several approaches were compared but no implementation of external controls was done.

In this study, for gene expression analysis, we have compared three normalization methods (DESeq2, FPKM, and RUV) and implemented external controls in FPKM method to define a new mFPKM method. Illumina high-throughput RNAseq data are obtained from six RNA samples of two *in vitro* liver models non-infected or infected with either wild-type or attenuated yellow fever virus strains in quadruplicates. Reads with length of 50 nucleotides are aligned with human genome data obtained from the University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser Database. We first explored the ability of ERCC spikes to highlight technical biases in RNAseq procedures between two batches. In a second step, we explored the interest of using spikes to set detection thresholds in RNAseq analysis, especially when using FPKM normalization procedures. Then, we compared different normalization methods using correlation coefficients between the normalization results from RNAseq and the results of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) as well as biological process using pathways analysis software.

Keywords: DESeq2, FPKM, RUV, Spike, RNAseq, viral infection, normalization

Specifications

Organism/cell line/tissue	<i>Homo sapiens/primary hepatocytes and primary Kupffer cells/human liver</i>
Sex	<i>ND</i>
Sequencer or array type	<i>HiSeq2500 Illumina</i>
Data format	<i>raw data in FastQ</i>
Experimental factors	<i>i.e. infected vs control, non-infected human primary hepatocytes co-cultured with or without human primary Kupffer cells</i>
Experimental features	<i>We performed a high throughput sequencing analysis To compare the transcriptome of human primary hepatocytes with or without human primary Kupffer cells in response to infection by attenuated or wild-type yellow fever virus strains.</i>
Consent	<i>NA</i>
Sample source location	<i>NA</i>

NA : Non-applicable ND : Not determined

Experimental Design, Materials and Methods

Direct link to deposited data [provide URL below]

Raw and normalized expression data have been deposited on SRA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under number XXXX

Cell line model and RNA purification

Human Liver microtissues (hLiMts, InSphero AG, Zurich, Switzerland) delivered in ready-to-use 96-well plates were used in this study [186]. Each microtissue was generated from primary human hepatocytes with (Condition 1) or without (Condition 2) liver-derived non-parenchymal Kupffer cells (Table 1).

Microtissues were cultured at 37°C/5% CO₂ in supplier medium and medium exchanges were performed 2 to 3 times per week. Both models were infected with YFV 17D (Condition A) or YFV Asibi (Condition B) at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 10 and with control mock infected panel in parallel (**Table 1**).

Table 1: Experimental conditions

	Condition 1	Condition 2
	Primary hepatocytes + Kupffer cells	Primary hepatocytes
A	YFV 17D	YFV 17D
B	YFV Asibi	YFV Asibi

Wild-type YFV strain Asibi (originally isolated from a male YF Ghanaian patient in 1927) was obtained from the Pasteur Institute Paris strains collection maintained by passage in mouse brain. It was provided by Dr. Philippe Marianneau from the Pasteur Institute (Lyon, France) after one passage on Vero cells. Dr. Michele Bouloy from the Pasteur Institute (Paris, France) provided the vaccine strain, 17D-204, which was derived from a 17-D infectious clone [262]. Attenuation of wild type Asibi virus was observed *in vivo* and 17D vaccine clone differed from parental strain with 20 amino acids dispatched all along the viral genome [205]. *In vitro*, 17D infection results in higher genes activation (Condition A) than Asibi infection (Condition B), according to previous studies [71,249]. After 24 hours of infection, four pools of 12 microtissues, representing about 15,000 cells were harvested for each condition. RNA purification was performed using Reliaprep tissue (Promega®) and according to manufacturer protocol. Total RNA was quantified using Quantifluor RNA System (Promega, Fitchburg, WI) and RNA integrity was assessed on Bioanalyzer 2000 RNA chip (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA). All sample analyzed presented a RNA integrity number (RIN) higher than 8 (not shown) which are sufficient according to Illumina sequencing guidelines and reflect a good conservation of RNA [263].

RNA library and sequencing experiments and primary RNAseq data processing

ERCC spikes are a commercialized set of RNA standards (ERCC RNA Spike-In Mix, Ref: 4456740 Thermofisher Scientific, Waltham, MA) consisting in 92 poly-adenylated sequences derived from bacteria that mimic eukaryotic mRNA. They are designed in a wide range of 250 to 2,000 nucleotides in length and GC content from 5 to 51% and can be added into RNA samples before library preparation to evaluate reproducibility and to normalize RNAseq data [258,264,265]. mRNA libraries were prepared from 100 ng of total RNA added with ERCC RNA spikes using TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina, San Diego, CA) according to supplier's instructions. A single read sequencing of 50 nucleotides was performed on HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA) with about 25 million raw reads per sample in two batches (Condition 1 or Condition 2). FastQ files generation was performed using bcl2fastq (v2.17.1.14) allowing 0 mismatch in the barcode sequence, then reads were trimmed using CutAdapt (v1.3) to eliminate remaining adapter sequences (4 bases overlap, error rate = 10%) and poor quality bases (quality threshold <Q30; minimum length after trimming: 30 nucleotides). Data quality information is available in **Supplementary Table 1**. Trimmed reads were aligned using TopHat (v 2.0.6) with default parameters and supplying RefSeq transcripts annotation (downloaded using UCSC website, under GTF format) through the -G option [266] with Bowtie (v 2.0.2) [267]. Reads were aligned on UCSC's Human Genome hg19 (GRCh37, Feb. 2009) + ERCC spikes sequences (fasta sequence given by suppliers). After alignment, 96.6%±0.6% and 0.38%±0.13% of reads appeared respectively aligned on human genome or against ERCC sequences. Then the number of reads on gene and spikes was counted using HTSeq-count script [268] and the "intersection non empty" mode (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/count.html>).

qRT PCR analysis

Briefly, total RNAs extracted with Promega tissue RNeasyprep from condition 1 or 2 were reverse-transcribed into cDNA with RT² Microfluidics qPCR Reagent System (QIAGEN), followed by cDNA pre-amplification in RT²PreAMP cDNA Synthesis Kit (QIAGEN). PCR amplifications were performed using RT²

Profiler PCR arrays (QIAgen). Each supplier plate contained amplification primers for 84 human genes plus 12 controls. In this experiment, 8 panels were tested: #PAHS-093Z (hepatotoxicity), #PAHS-002Z (drug metabolism), #PAHS-141ZH (necrosis), #PAHS-097ZH (inflammasome), #PAHS-039YH (Jak-STAT signaling), #PAHS-012Z (apoptosis), #PAHS-021Z (cytokines), and #PAHS-064Z (interferons & receptors), representing a total of 480 unique genes. For each gene, the specific amplification fold-change between infected and non-infected cells was determined using the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method [269]. A customized version of this method (PCRArrayDataanalysisV4) available online in QIAGEN Data Analysis Center was used for analyses. It can be downloaded at <https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id= d8d1813e-e5ba-4d29-8fdf-07a3f4227e0a&lang=en>. Each value corresponds to the average of at least three to seven independent infections. All transcripts detected by PCR array were aligned to RNAseq data based on Gene ID (**Table 3**).

Results

Analysis of ERCC spikes as external quality control and threshold settings

We first explored the ability of ERCC spikes to highlight technical biases in RNAseq procedures between two batches (conditions 1 and 2) of experiment, by comparing the number of aligned reads on each spike for each sample. It appeared that 5 spikes were not detected in all samples (i.e. 0 read), 40 spikes present 0 read in at least 1/24 samples and 47 spikes were detected with at least one read in all samples. The first 45 spikes were filtered out for further analysis because of low detection. Scatter plots were drawn between each sample in order to explore the reproducibility of spikes detection in each batch and between batches (**Figure 1** and **Figure S1**). It appeared that spike detection is linear between samples inside a same batch (**Figure 1A and 1B**) and present a near two-fold deviation between two experiments (**Figure 1C**) suggesting the ability of spikes to detect technical bias.

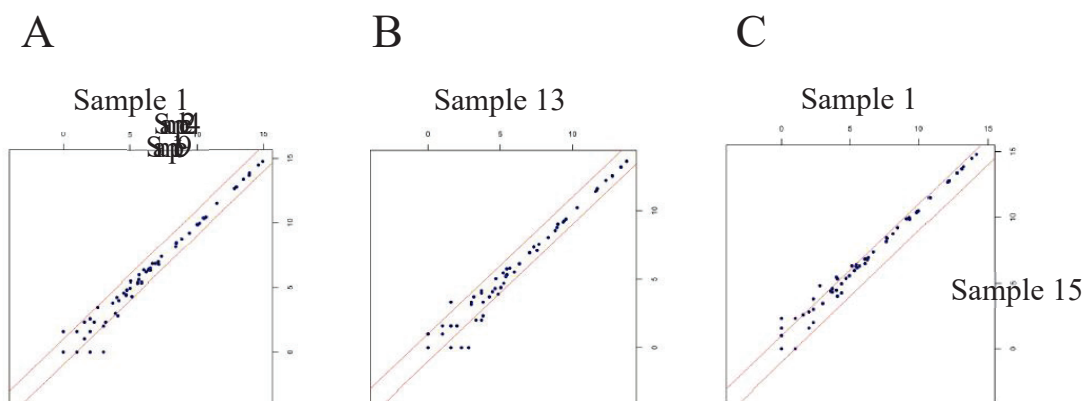


Figure 1. Scatter plots: Reproducibility of spike detection.

Prior to library preparation, External RNA Control Consortium (ERCC) spike-in controls were added to samples. Reads mapped to spikes were first quantified using the HTSeq-count script and the “intersection non empty” mode. Log2 values of spikes count were scattered between samples 1 and 9 of Condition 1 batch (A), samples 13 and 24 of Condition 2 batch (B) or between sample 1 of Condition 1 batch and sample 15 of Condition 2 (C).

After FPKM normalization of gene and spikes raw counts, using Cufflink (v 2.0.2) [257], we performed linear regression between spikes copy number and FPKM values of coverage (**Figure 2** and **Table S2**). Consistently with previous observations, data present global correlation score of 0.86 (**Figure 2**) with respectively $R^2=0.85\pm0.01$ and $R^2=0.83\pm0.02$ for all samples of condition 1 and condition 2 (**Table S2**) [265].

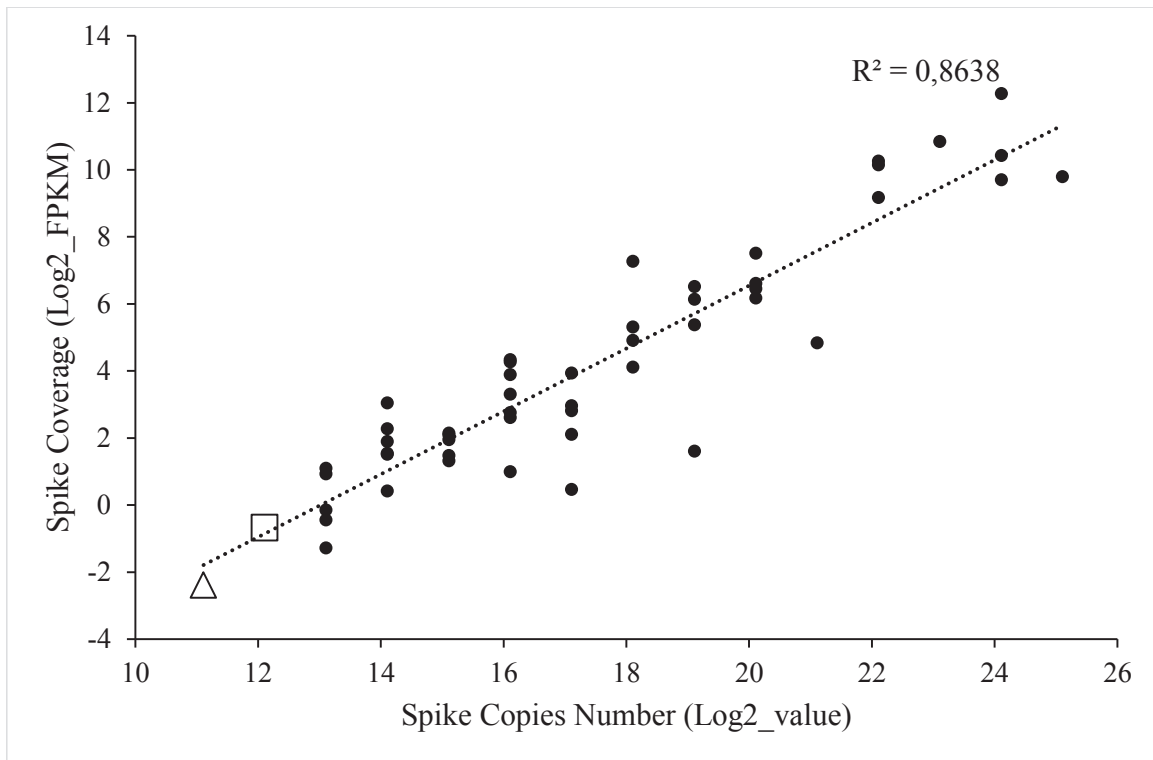


Figure 2. Correlation between control mean coverage and mean copy number.

Prior to library preparation, External RNA Control Consortium (ERCC) spike-in controls were added to samples. Reads mapped to spikes were first quantified using the HTSeq-count script and the “intersection non-empty” mode. Mean coverages were calculated between all samples and aligned to mean copy number of all samples. □ERCC-00143, coverage 0.63; ΔERCC-00031 coverage 0.19

In a second step, we explored the interest of using spikes to set detection thresholds in RNAseq analysis, especially when using FPKM normalization procedures. Indeed, this normalization approach is the only one which provides for each transcript a value of coverage in addition to a signal of expression [257]. Thus, it could be possible to adjust a filtering on coverage during differential gene expression analysis using the spike information and then to develop a modified approach of FPKM normalization (mFPKM).

In our study, only spikes with at least one read in all samples were retained to ensure homogeneity of results. A mean of FPKM coverage obtained for each spike in all samples were determined. Two spikes, presenting the lowest number of reads were selected to set the coverage threshold: ERCC-00031 with a mean FPKM coverage of 0.19 ± 0.08 and 2,210 copies and ERCC-00143 with a mean FPKM coverage of

0.63±0.22 and 4,410 copies. To note, mean copy number of spikes with a mean coverage of 1 was also analyzed and corresponded to 7,963 copies which seems a highly stringent threshold (data not shown). Differential gene expression analysis from FPKM normalized data was then performed using filtering as follow: i) Transcripts of all samples in a biological group should correspond to the coverage threshold applied (no filter, 0.19, 0.63 or 1.0), ii) The fold change of each differentially expressed gene (DEG) is calculated by comparison between median of FPKM coverage values in infected panel versus median of FPKM coverage values in control mock-infected panel, and should be of at least 2.0 and iii) Adjusted p-value were determined using Benjamini-Hochberg method as previously described and should be equal or under to 0.05 [270].

Using these parameters, we observed a diminution of the number of significant DEGs with the increase of coverage threshold, reaching 1.67±0.12 fold between analysis performed with full coverage or without any coverage. Such observation was expected since stringency of gene selection increased with FPKM coverage filtering (**Table 2**).

Table 2: Number of differentially expressed genes (DEG) using different normalization methods

Conditions	DEseq2 normalization	FPKM normalization				RUV normalization
		sCov* = 0	mCov* = 0.19	mCov* 0.63	= mCov* = 1	
1A vs mock	2,611	2,264	1,905	1,584	1,412	3,357
1B vs mock	1,151	1,023	835	649	579	1,846
2A vs mock	3,120	2,932	2,544	2,101	1,888	4,101
2B vs mock	1,440	1,121	915	718	624	2,152

* corresponds to FPKM coverage value

s = standard, m = modified

Limitation of FPKM coverage threshold might impact the number of false positive DEGs. To evaluate this, we performed RT-qPCR experiments in a set of pre-selected genes.

Table 3: Correlation between RT-qPCR and FPKM normalization with different detection thresholds

Conditions	FPKM normalization			modified FPKM (mFPKM)								
	sCov* = 0			mCov* = 0.19			mCov* = 0.63			mCov* = 1		
	C	FP	R ²	C	FP	R ²	C	FP	R ²	C	FP	R ²
1A vs mock	45	46	<i>0.85</i>	42	49	0.92	42	49	0.92	42	49	0.92
1B vs mock	33	29	0.59	32	30	0.60	31	31	<i>0.46</i>	29	33	0.62
2A vs mock	49	32	0.77	47	34	0.78	45	36	0.77	44	37	<i>0.76</i>
2B vs mock	31	36	0.56	30	37	0.58	28	39	<i>0.49</i>	27	40	0.55

* corresponds to FPKM coverage value; C = consistent; NC = non-consistent

The highest R² values between all methods are set in bold and the lowest in italic.

s = standard, m = modified

This analysis shown that correlations of fold change gene expression obtained by RNAseq and RT-qPCR were increased with the diminution of coverage threshold. Among the four thresholds tested, the 0.19 mFPKM threshold showed the highest correlation rates in 3 of the 4 infection conditions. Alternatively, lowest correlation rates were observed with the 0.63 mFPKM coverage setting.

In addition to these data, Ingenuity Pathway Analysis software (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) was used to perform gene set enrichment on DEGs identified in Condition 1B after FPKM or mFPKM normalization (**Figure 3**). Briefly, significantly detected genes were implemented in IPA®software and gene set enrichment was performed according to literature data and

internal algorithm. Despite the higher number of DEGs, a lower number of canonical pathways were detected significantly enriched by using 0.19 mFPKM coverage threshold (12) than by using 1 FPKM (13) or 0.63 mFPKM (15) coverage thresholds. Moreover, the major part of the 0.19 mFPKM-selected canonical pathways (10/12) appeared commonly induced with high statistical values ($>-4\log(B-H)$). Modification of coverage threshold led to alternative activations of 7 additional canonical pathways (5 with a coverage of 0.63, 3 with a coverage of 1 and 2 with a coverage of 0.19) but with lower significant levels than those commonly induced ($<-3\log(B-H)$). Despite a higher number of DEGs detected with 0.19 coverage threshold, it appeared that the reduction of threshold values led both, to a reduction in number as well as significance of canonical pathways (**Figure 3**). We suggested these observations were directly correlated with the adjustment of p value as the number of DEGs was involved in this algorithm.

Taking together, these data suggest that a coverage threshold set to 0.19 is better when correlated to RT-qPCR data. Nevertheless, it seems to decrease the detection of significantly deregulated pathways probably due to an increase of background. To limit of false positive integration in the DEGs panel and to further compare normalization methods, we selected mFPKM method with 0.63 coverage threshold as the best compromise between all tested conditions

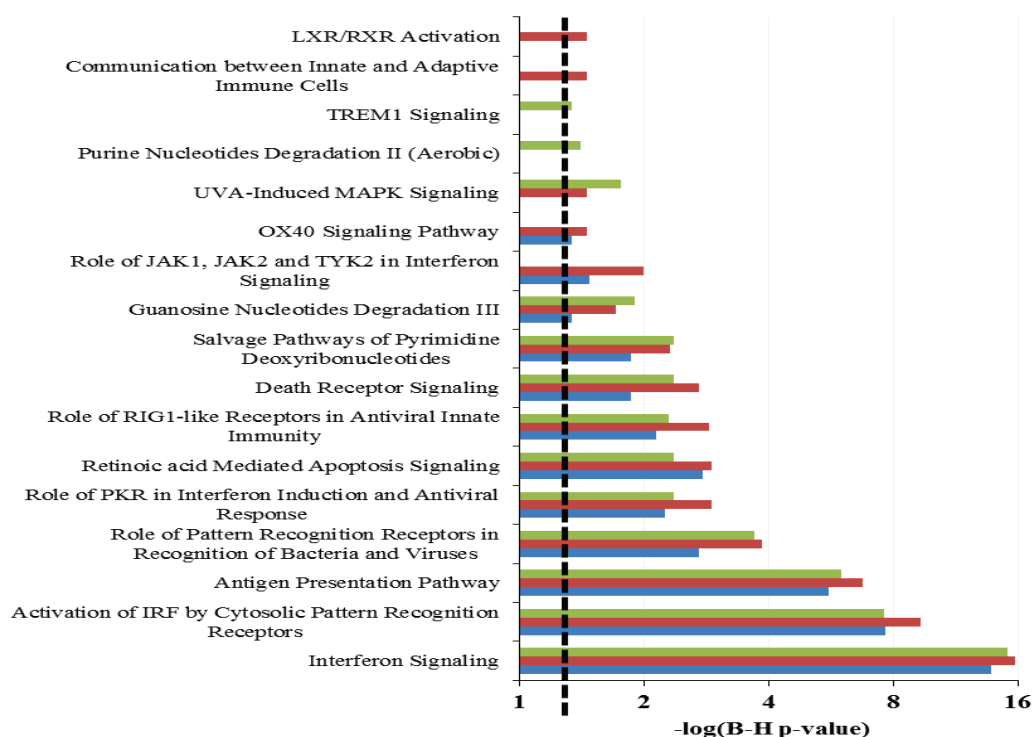


Figure 3. Major canonical pathways induced after condition 1B and different normalization approaches.

Genes with a raw p value ≤ 0.05 and a $|\text{fold change}| \geq 3$ were implemented in IPA® software. Core analysis was then performed and IPA® data were internally adjusted using Benjamini-Hotchberg method. Major canonical pathways were presented here after FPKM normalization, depending on statistical values and using genes from coverage 1 FPKM dataset (green bars), coverage 0.63 FPKM (red bar) or coverage 0.19 FPKM (blue bar) This analysis was generated using QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis software (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity).

Comparisons of three normalization procedures for RNAseq data

In order to evaluate the impact of normalization procedures on DEGs identification we compared three normalization methods, the DESeq2 method, the RUV method and the FPKM method, according to literature guidelines. As previously mentioned, default parameters were applied and only significant (adjusted p value ≤ 0.05) DEGs with absolute fold change value of 2 were retained.

RUV method allowed detection of the highest number of DEGs. Indeed, number of DEGS is respectively: 2.5 ± 0.4 fold and 1.4 ± 0.1 fold more important after RUV approach than after mFPKM (coverage 0.63) approach and DESeq2 approach (**Table 2**). With the same tendency, DESeq2 method allowed the identification of 1.7 ± 0.1 fold more DEGs than 0.63 mFPKM coverage approach (**Table 2**). As for all experimental conditions (**Figure S2**), RUV analysis showed the highest number of specific DEGs (39.9%) before FPKM (12.5%) and DESeq2 (11.3%) in condition 1B (**Figure 4**). Moreover, an important part of the DEGs identified by DESeq2 and RUV approaches were common in all assessed infections, reaching 49% in condition 2A (**Figure 4** and **Figure S2**). In contrast, for example in condition 1B, only 13.5% of DEGs were in common between RUV and mFPKM analyses and 13.6% of DEGs between DESeq2 and mFPKM analyses (**Figure 4**).

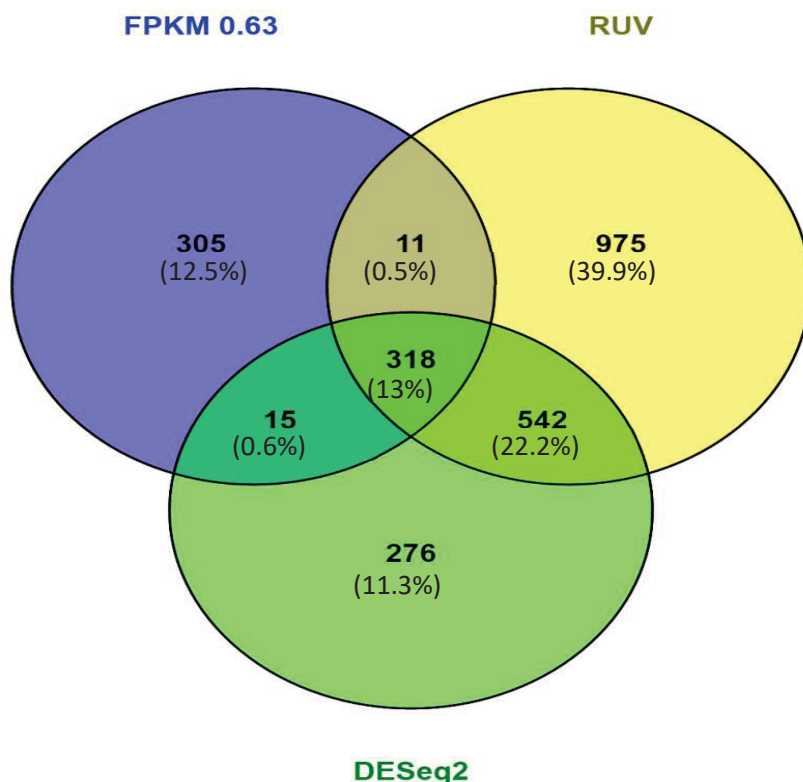


Figure 4. Comparison of DEGs number after RUV, FPKM or DESeq2normalization following condition 1B.

DEGs were determined by comparison between YFV Asibi infected- and control mock infected-Hep/Kup model. DEGs were selected with a minimum fold change of $|2|$ and an adjusted raw p value (Benjamini Hochberg) ≤ 0.05 . Percentages of total DEGs numbers were represented in brackets. Venn diagram was generated using Venny 2.1 software (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)

In order to validate these results, correlation between RNAseq and RT-qPCR data were performed as described above. Despite similar number of confirmed (true positive) and false negative transcripts, it appeared that the number of false positive genes found in either DESeq2 or RUV methods were respectively 2.48 ± 0.51 and 2.68 ± 0.57 higher than in mFPKM coverage approach DEG analysis. This is consistent with the higher fold change correlation scores observed after mFPKM normalization than after RUV or DESeq2 approaches (**Table 4**). Particularly, fold change correlation scores were higher after

YFV 17D in both cellular model than after YFV Asibi infection where lower number of DEGs were identified whatever the normalization method applied (**Table 4**). Taking together, these results suggest that FPKM normalization using a coverage threshold, here set at 0.63, performed better on our dataset.

Table 4: Correlation between RT-qPCR and normalization methods

Conditions	mFPKM			DESeq2			RUV		
	C	FP	R ²	C	FP	R ²	C	FP	R ²
1A vs mock	42	17	0.92	50	34	<i>0.66</i>	49	37	0.72
1B vs mock	31	6	0.46	27	21	<i>0.15</i>	28	21	0.55
2A vs mock	45	22	0.77	47	45	<i>0.64</i>	49	45	0.74
2B vs mock	28	8	0.49	29	19	<i>0.41</i>	29	24	0.61

** corresponds to FPKM coverage value; C = consistent; FP = false positive*

The highest R² values between all methods are set in bold and the lowest in italic.

Impact of normalization procedures on pathways analysis

After normalization, pathways analysis was conducted using DEGs identified in the condition 1B. Gene set enrichment was performed using IPA® software as described above. In this comparison, the number of DEGs revealed to be higher after RUV method (1846) than after DESeq2 (1151) or mFPKM methods (649) (**Table 2**). In contrast, analysis of canonical pathways by IPA® software revealed that DEGs identified after RUV normalization led to a lower number of regulated canonical pathways (7) than DEGs identified after DESeq2 or mFPKM methods (15 or 10 respectively) (**Table 5**). In addition, significance of activation (-log (B-H p value)) with RUV-identified DEGs was lower than with DESeq2-identified DEGs or mFPKM-identified DEGs for all commonly regulated canonical pathways. This observation is particularly observed for the “Interferon Signaling” (RUV: 9.6; DESeq2: 13.3; mFPKM: 20.2), the “Activation of IRF by

Cytosolic Pattern Recognition Receptors” (RUV: 1.5; DESeq2: 6.5; mFPKM: 7.4) and the “Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling” (RUV: 2.5; DESeq2: 3.6; mFPKM: 3.8) despite similar z-scores (**Table 5**). Finally, DESeq2 normalization allowed identification of 5 additional canonical pathways compared to FPKM normalization (Inflammasome pathway; UVA-Induced MAPK Signaling; PPAR Signaling; LXR/RXR Activation; Toll-like Receptor Signaling) but with low significance ($<-2\log$ (B-H p value)).

	mFPKM		DESeq2		RUV	
	0.63*					
Ingenuity Canonical Pathways	z-score	-log (B-H p-value)	z-score	-log (B-H p-value)	z-score	-log (B-H p-value)
Interferon Signaling	3.9	20.2	3.8	13.3	3.8	9.6
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	2.1	7.4	2.2	6.5	1.4	1.5
Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling	2.5	3.8	2.9	3.6	2.7	2.5
TREM1 Signaling	3.2	3.1	3.7	3.4	2.8	1.6
Role of JAK1, JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling	1.0	3.0	0.4	3.4	/	/
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	3.2	2.9	3.5	5.2	2.3	1.4
Role of RIG1-like Receptors in Antiviral Innate Immunity	1.9	2.6	2.5	3.1	/	/
Death Receptor Signaling	1.9	2.6	3.1	2.1	/	/
Type I Diabetes Mellitus Signaling	1.3	2.0	2.5	2.8	/	/

Dendritic Maturation Cell	3.1	1.8	3.8	2.7	/	/
Inflammasome pathway	/	/	2.4	2.1	1.7	2.8
UVA-Induced MAPK Signaling	/	/	2.3	1.8	/	/
PPAR Signaling	/	/	-2.3	1.7	/	/
LXR/RXR Activation	/	/	-1.1	1.6	/	/
Toll-like Receptor Signaling	/	/	1.3	1.5	/	/
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	/	/	/	/	1.4	1.3

* corresponds to FPKM coverage value

higher p values were in bold

Table 5. Canonical pathways induced after condition 1B

Discussion

The lack of standards for RNAseq analysis and the availability of multiple tools to perform each step of DEG analysis, lead to troubles for comparison between several studies. Thus, definition of a method allowing analysis of multiple datasets remained an unresolved issue. In this study, we report the use of external controls to set detection thresholds and remove technical bias as well as the comparison of alternative normalization methods.

First, we evaluate the use of spikes as negative controls to correct variation due to technical bias, by using the RUV method for normalization. Using this RUV normalization, we obtained the

highest number of DEGs among the different analyses performed. In contradiction with data previously reported by Risso *et al.*, which showed the lowest number of deregulate pathways in association with low significance, this method also showed a high number of false positive transcripts [258]. One explanation could be due to the absence of technical bias in our experimental study. In conclusion, RUV normalization method could be interesting for dataset with high technical or biological variations (multiple batches, hosts or pathogens) in which the need of correction would be significant.

In a second step, we assessed the possibility to define a detection threshold on FPKM DEGs analysis results (mFPKM). No detection method is classically used for this approach leading to higher false discovery rate than with other normalization approaches [260,271]. In this approach, the use of ERCC spikes is of interest since it allows correlating FPKM coverage with defined number of copies. In this context, arbitrary full coverage threshold appeared to be too restrictive with a loss of information whereas spikes-defined threshold allowed detection of higher number of DEGs with similar correlation scores. However, gene set enrichment and biological pathways analyses demonstrated a negative effect of low coverage threshold in term of both, number and significance of activated pathways. Thus, it seems interesting to use ERCC spikes in order to determine detection thresholds in FPKM analysis, and decrease false discovery rate. Recently, another very interesting use of ERCC spikes to control DEGs analysis pipeline in RNAseq data was proposed [272]. In this approach, two mixes of the same spikes but with different concentrations and four groups of ratio (4:1; 1:2; 1:1.5 and 1:1) were used to spike each compared condition (condition 1 spiked with mix 1 and condition 2 spiked with mix 2), in order to check if the whole pipeline of DEG analysis leads to the correct detection of

variation between the spikes, thus easily monitoring the false discovery rate. To conclude on this part, FPKM normalization approach using ERCC spikes-pre-defined thresholds appears a more accurate method for normalization of RNAseq experiments.

By comparison of mFPKM analysis performed with spike-defined coverage of 0.63, with DESeq2 and RUV normalizations, we observed that the mFPKM analysis has the highest correlation rate and the lowest number of false positive transcripts. DESeq2 analysis showed the lowest correlation with RT-qPCR data and a higher number of false positive transcripts with a major impact on activated pathway significance. These results are consistent with a previous analysis that also report higher correlation scores of RT-qPCR data with RPKM than with DESeq2 data [261]. Thus, biological criterion appears to be an important factor to set thresholds of detection. To note, analysis of biological pathways after removing un-confirmed false positive transcripts might be helpful to evaluate their effect on significance. To conclude, this study confirms the interest of spikes for RNAseq data analysis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

Sanofi Pasteur.

Authors' contributions

NMD, MR and CL conceived of the experiment; NMD cultured, infected cells and extracted RNA; MG prepared RNA libraries; CD and CM performed bioinformatics analyses; CD and CM

performed statistical analyses; NMD performed biological analyses; NMD and MR wrote the paper. All authors read and approved this manuscript.

Reference List

1. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15: 550.
2. Gagnon-Bartsch JA, Speed TP (2012) Using control genes to correct for unwanted variation in microarray data. *Biostatistics* 13: 539-552.
3. Messner S, Agarkova I, Moritz W, Kelm JM (2013) Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch Toxicol* 87: 209-213.
4. Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ (1989) Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol* 1: 285-296.
5. Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM (1987) Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2019-2023.
6. Lefevre A, Contamin H, Decelle T, Fournier C, Lang J, Deubel V, Marianneau P (2006) Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection. *Microbes Infect* 8: 1530-1538.
7. Woodson SE, Holbrook MR (2011) Infection of hepatocytes with 17-D vaccine-strain yellow fever virus induces a strong pro-inflammatory host response. *J Gen Virol* 92: 2262-2271.
8. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7: 3.
9. Baker SC, Bauer SR, Beyer RP, Brenton JD, Bromley B, Burrill J, Causton H, Conley MP, Elespuru R, Fero M, Foy C, Fuscoe J, Gao X, Gerhold DL, Gilles P, Goodsaid F, Guo X, Hackett J, Hockett RD, Ikonomi P, Irizarry RA, Kawasaki ES, Kaysser-Kranich T, Kerr K, Kiser G, Koch WH, Lee KY, Liu C, Liu ZL, Lucas A, Manohar CF, Miyada G, Modrusan Z, Parkes H, Puri RK, Reid L, Ryder TB, Salit M, Samaha RR, Scherf U, Sendera TJ, Setterquist RA, Shi L, Shippy R, Soriano

JV, Wagar EA, Warrington JA, Williams M, Wilmer F, Wilson M, Wolber PK, Wu X, Zadro R (2005) The External RNA Controls Consortium: a progress report. *Nat Methods* 2: 731-734.

10. Jiang L, Schlesinger F, Davis CA, Zhang Y, Li R, Salit M, Gingeras TR, Oliver B (2011) Synthetic spike-in standards for RNA-seq experiments. *Genome Res* 21: 1543-1551.
11. Risso D, Ngai J, Speed TP, Dudoit S (2014) Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nat Biotechnol* 32: 896-902.
12. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105-1111.
13. Langmead B (2010) Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 11: Unit.
14. Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31: 166-169.
15. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25: 402-408.
16. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28: 511-515.
17. Benjamini Y, Hochberg Y (Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.
18. Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, Guernec G, Jagla B, Jouneau L, Laloe D, Le Gall C, Schaeffer B, Le Crom S, Guedj M, Jaffrezic F (2013) A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Brief Bioinform* 14: 671-683.
19. Maza E, Frasse P, Senin P, Bouzayen M, Zouine M (2013) Comparison of normalization methods for differential gene expression analysis in RNA-Seq experiments: A matter of relative size of studied transcriptomes. *Commun Integr Biol* 6: e25849.
20. Munro SA, Lund SP, Pine PS, Binder H, Clevert DA, Conesa A, Dopazo J, Fasold M, Hochreiter S, Hong H, Jafari N, Kreil DP, Labaj PP, Li S, Liao Y, Lin SM, Meehan J, Mason CE, Santoyo-Lopez J, Setterquist RA, Shi L, Shi W, Smyth GK, Stralis-Pavese N, Su Z, Tong W, Wang C, Wang J, Xu J, Ye Z, Yang Y, Yu Y, Salit M (2014) Assessing technical performance in differential gene expression experiments with external spike-in RNA control ratio mixtures. *Nat Commun* 5: 5125.
21. Li P, Piao Y, Shon HS, Ryu KH (2015) Comparing the normalization methods for the differential analysis of Illumina high-throughput RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* 16: 347.

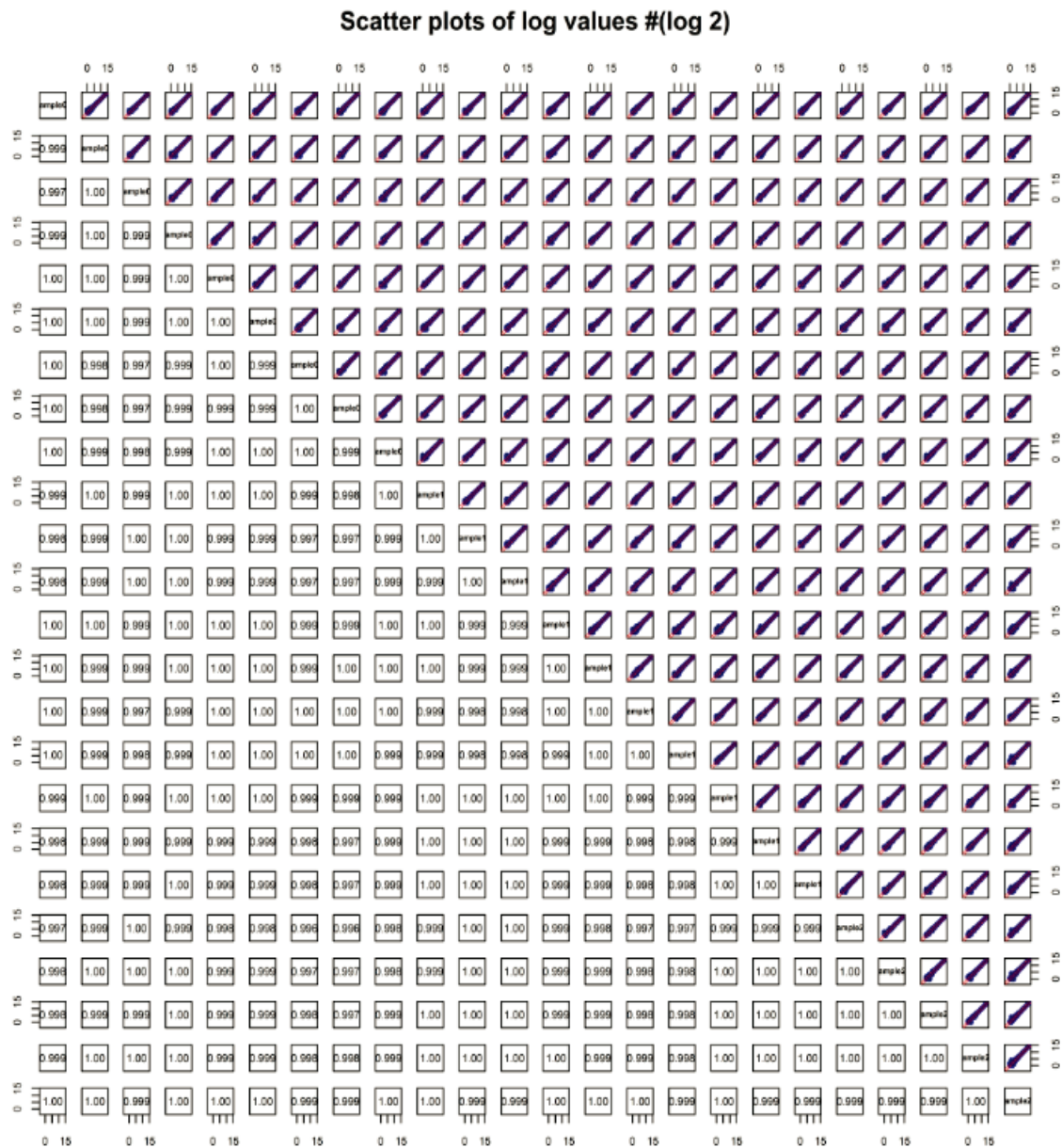
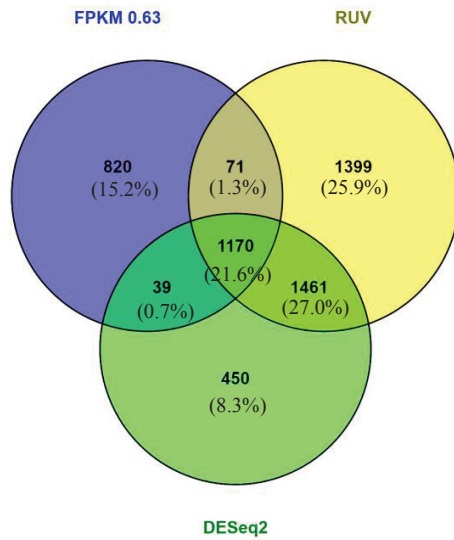


Figure S1. Scatter plots: Reproducibility of spike detection.

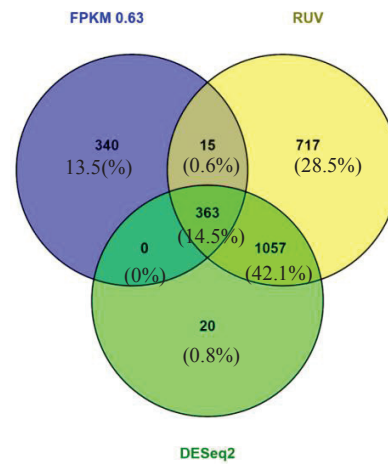
Prior to library preparation, External RNA Control Consortium (ERCC) spike-in controls were added to samples. Reads mapped to spikes were first quantified using the HTSeq-count script

and the “intersection non empty” mode. Log2 values of spikes count were scattered between samples of Hep/Kup batch (A), samples of Hep batch (B) or between samples of Hep/Kup batch and samples of Hep batch (C).

A



B



C

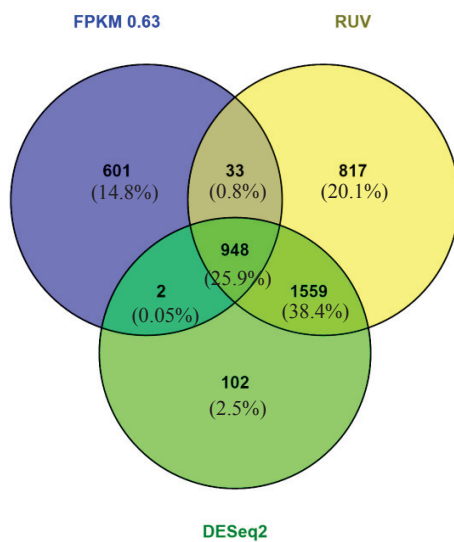


Figure S2. Venn diagrams: variation of DEGs number after normalization approaches.

Comparison of DEGs number identified after FPKM, DESeq2 or RUV normalization approach. DEGs were determined by comparison between infected- and control mock infected-model. DEGs were selected with a minimum fold change of $|2|$ and an adjusted p value (Benjamini

Hochberg) ≤ 0.05 following infection of Hep model with YFV 17D (A), YFV Asibi (B) or infection of Hep/Kup model with YFV 17D (C).

C. Etude N°3 : Mise en place d'un modèle organotypique de foie humain pour étudier les paramètres immunitaires et métaboliques régulés par les souches sauvages et de bases vaccinales du virus de la fièvre jaune

1. Problématique

L'aptitude du foie humain à induire les réponses immunitaires adéquates et à détoxifier l'organisme est conditionnée par plusieurs facteurs. L'architecture particulière de cet organe permet de maintenir une polarisation des hépatocytes, primordiale notamment pour leurs activités métaboliques. La reconstitution d'une structure 3D est considérée depuis plusieurs années par différentes approches discutées précédemment. Parmi celles-ci, l'utilisation de technologies ne nécessitant ni matrice extracellulaire ni support pourrait présenter un avantage pour l'étude des réponses immunitaires en évitant les stimulations parasites. Compte-tenu des observations précédentes, l'implication des acteurs cellulaires hépatiques autres que les hépatocytes semble être primordiale, aussi bien dans l'établissement du microenvironnement hépatique que dans l'initiation des réponses immunitaires.

Dans notre première étude, nous avons utilisé une approche par PCRarray, ciblée sur un panel de gènes sélectionnés. Nous avons ici privilégié une approche moins sélective en analysant le transcriptome du modèle hépatique par séquençage haut débit. La méthode des FPKM a été privilégiée et améliorée par une définition plus stricte du seuil de détection via l'utilisation des spikes.

Caractérisation préliminaire du modèle.

La présence des deux populations cellulaires a été vérifiée par immunofluorescence en utilisant un marqueur anti-cytokeratine 8 (KRT8) spécifique des hépatocytes et un marqueur anti CD68 (KP1) et une observation en microscopie confocale. Les hépatocytes sont observés dans l'ensemble des microtissus hépatiques et représentent la majorité des cellules présentes (non montré). Les cellules de Kupffer sont également détectables dans les microtissus hépatiques et maintenues au cours du temps dans la culture puisque des détections ont été faites jusqu'à 21 jours après réception des microtissus hépatiques [186]. Des microtissus dépourvus de cellules de Kupffer ont également été marqués et ne présentent pas de

marqueurs des cellules de Kupffer (non montré). La présence de villosités hépatocytaires ainsi que d'hémidesmosomes inter-hépatocytaires observés par microscopie électronique confirme également la présence de ces cellules au sein des microtissus (Figure 16). Finalement, des gouttelettes lipidiques ont été observées par microscopie électronique dans les microtissus hépatiques (figure 16B).

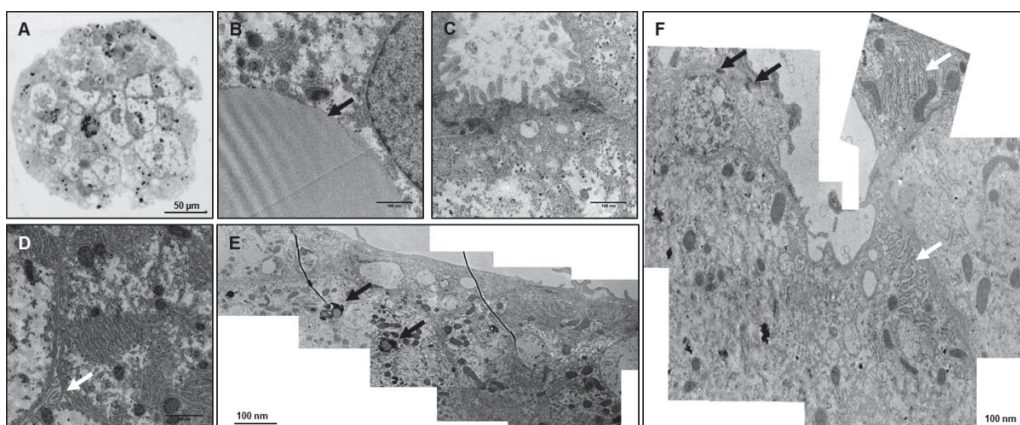


Figure 16. Observation de l'architecture des microtissus hépatiques par microscopie électronique.

Coupes semi-fines de microtissus hépatique (co-culture hépatocytes/cellules de Kupffer) colorées au bleu de toluidine et observée au microscope optique. **B, C, D, E et F** Coupes ultra-fines contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. L'observation des coupes a été faite à l'aide du microscope électronique à transmission FEI CM120 (Philips) et les images acquises à l'aide d'une caméra 2kx2k Ultra Scan Gatan (Philips). **B**, observation d'une gouttelette lipidique (Flèche noire). **C**, Observation de villosités hépatiques (Flèches noires). **D**, Observation d'un canalicule biliaire (Flèche blanche). **E**, Observation de lysosomes (Flèches noires). **F**, Observation de desmosomes inter-hépatocytaires (Flèches noires) et de réticulum endoplasmique (Flèches blanches).

Par ailleurs, la capacité du modèle à induire les canalicules biliaires a également été observée en microscopie électronique (Figure 16D) mais également par le marquage de plusieurs antigènes cibles comme le CD26 (Figure 17B), une peptidase présente à la surface des canalicules biliaires ou le MRP2, un transporteur anionique caractéristique des canalicules biliaires (figure 17A). Cette architecture particulière est le reflet d'une interaction inter-hépatocytes forte.

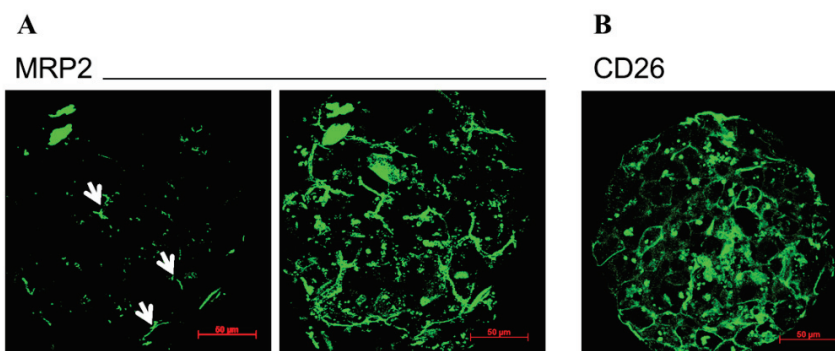


Figure 17. Détection de canalicules biliaires dans les microtissus hépatiques.

Les microtissus en co-culture ont été maintenus en culture pendant 6 jours dans le milieu de maintenance. Après fixation au paraformaldéhyde 4% pendant 1h à TA, les microtissus ont été marqués par deux anticorps dirigés contre les canalicules biliaires, MRP2 (A) et CD26 (B). Le marqueur a été révélé par un anticorps anti-souris Alexa Fluor 488 (Invitrogen). **A**, Observation du marquage MRP2 sur des microtissus non-infectés sur un champ (gauche) ou dans l'ensemble du microtissu (droite). **B**, Observation du marquage CD26 sur un microtissu non-infecté sur un champ. L'acquisition des images a été faite à l'aide du logiciel AxioVision 4 (Zeiss, version 4.8).

Métabolisme hépatique et effet de la dexaméthasone. L'activité des enzymes hépatiques a été démontrée par le fournisseur [186] et nous avons pu vérifier l'expression d'un panel de gènes codants pour les enzymes hépatiques de phase I, de phase II ou encore pour des transporteurs hépatiques sur différents lots de microtissus hépatiques. Le maintien de ces activités métaboliques est en partie conditionné par la composition des milieux de culture. En particulier, la dexaméthasone est une inductrice connue de certains cytochromes dans les hépatocytes. Elle est classiquement utilisée dans la culture des hépatocytes primaires pour maintenir un métabolisme actif et limiter la toxicité [273,274]. Néanmoins, la dexaméthasone est une drogue de la famille des corticoïdes connue pour limiter, à certaines concentrations, les réponses inflammatoires [275]. Afin de s'assurer de l'absence d'effet anti-inflammatoire de la dexaméthasone dans les réponses induites suite aux infections, les microtissus hépatiques ont été cultivés et infectés dans un milieu avec ou sans dexaméthasone. Une analyse transcriptomique ciblée sur les gènes associés à la réponse Interféron, au métabolisme des drogues et enfin à la chémoattraction (Figure 18).

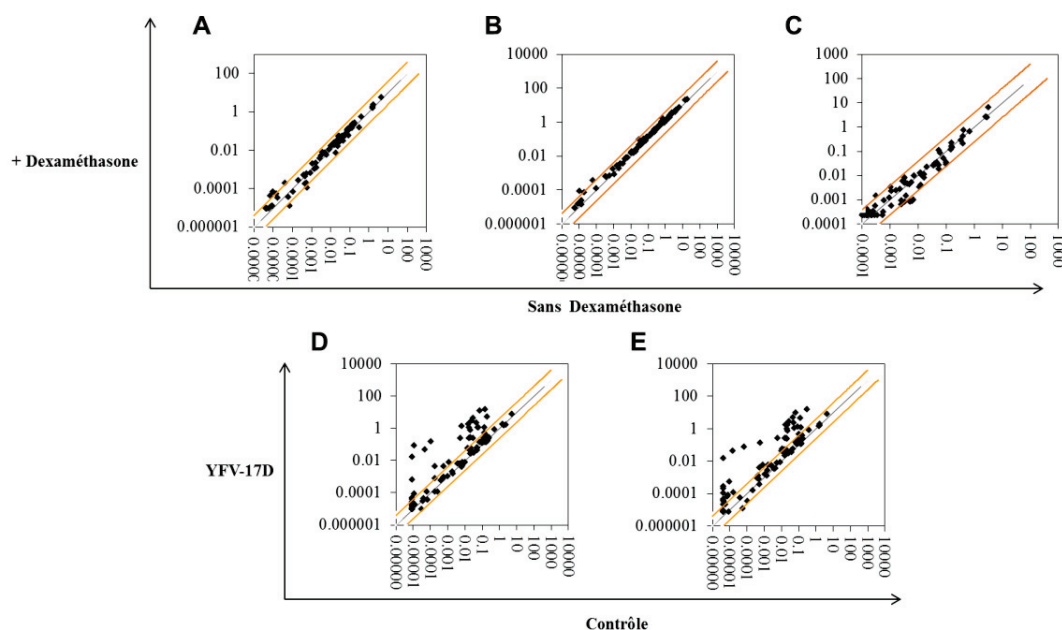


Figure 18. Impact de la dexaméthasone sur l’induction des réponses antivirales.

Les microtissus hépatiques (co-culture hépatocytes/cellules de Kupffer) ont été maintenus dans un milieu de culture supplémentés ou non en dexaméthasone (Concentration). Les microtissus hépatiques ont ensuite été infectés par la souche YFV-17D à une m.o.i. de 10 pendant 24h (D, E) ou maintenus en condition contrôle non infectée (A, B, C). Les ARNs totaux ont été extraits et analysés par PCRarray avec la technologie haut-débit Fluidigm sur les plaques IFN&R (A, D et E), métabolisme des drogues (B) ou Chémokines et récepteurs (C). A, B et C. Représentation en « scatter-plot » des valeurs individuelles d’expression de gènes dans la condition contrôle dexaméthasone (ordonnée) versus les valeurs individuelles dans la condition contrôle sans dexaméthasone (abscisse). D et E. Représentation en « scatter-plot » des valeurs individuelles d’expression de gènes dans la condition YFV-17D (ordonnée) versus les valeurs individuelles dans la condition contrôle non infectée avec dexaméthasone (D) ou sans dexaméthasone (E) (abscisse) (n=3).

Nous avons dans un premier temps observé l’effet de la dexaméthasone dans les microtissus non infectés. Les gènes exprimés en présence de la dexaméthasone ont donc été comparés avec les gènes exprimés en absence de la dexaméthasone. Les niveaux d’expression de l’ensemble des gènes testés corrèlent entre les deux conditions. La corrélation entre les données est en effet supérieure à 0,9 pour l’ensemble des gènes relatifs à la réponse Interféron (A), au métabolisme des drogues (B) ou à la chémoattraction (C) (Figure 18). Par ailleurs, nous avons vérifié la capacité d’induction des réponses

interféron par la souche YFV-17D. Les microtissus infectés par la souche YF 17D pendant 24 heures en présence ou en absence de la dexaméthasone ont donc été comparés aux microtissus contrôles maintenus dans les mêmes conditions. La corrélation des niveaux d'expression suite à l'infection par la souche YF 17D en présence du dexaméthasone (D) ou en absence de dexaméthasone (E) est de 0,9 et aucun gène n'est impacté différemment entre les deux conditions.

2. Principales observations de l'étude

L'utilisation du modèle 3D de co-culture entre hépatocytes primaires et cellules de Kupffer nous a permis de confirmer l'établissement d'une réponse antivirale complète après l'infection par le virus 17D. De son côté, la souche sauvage Asibi induit une réponse plus faible et retardée. Contrairement aux résultats de PCRarray obtenus sur des gènes présélectionnés, la technologie RNASeq permet d'avoir une approche globale et non ciblée. Cette étude nous permet ainsi de confirmer et d'enrichir les résultats précédemment obtenus sur hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines.

Parmi les gènes liés à la réponse antivirale, nous avons identifié STAT1 IRF7, deux facteurs de transcription et EIF2AK2, un capteur d'ARNdb PKR également connu, trois éléments précédemment associés aux in vivo l'efficacité du vaccin humain [124,239,240]. Des voies alternatives de sensing sont également suggérées par la transcription NOD2, TLR2 et NLRC5, reflétant la capacité de la souche 17D à induire une réponse immunitaire polyfonctionnel [124].

Des indications du recrutement de lymphocytes et de cellules NK sont également décrites dans ces résultats tout comme l'orientation des réponses vers les voies de la clairance. Cette dernière pourrait se produire par différentes voies comme l'apoptose, l'autophagie ou encore le système du protéasome. Dans ce cadre, des différences sont à nouveau observées entre les deux infections mais également en présence ou non des cellules de Kupffer.

L'identification spécifique d'isoformes, l'induction de voies de régulations des réponses immunes ou encore des régulations alternatives des métabolismes cellulaires et hépatiques pourraient représenter de nouveaux axes pour la compréhension de la pathogénèse hépatique de la fièvre jaune.

Transcriptome analysis of human liver microtissues infected with wild-type and vaccine yellow fever viruses

Authors : Nicolas Masse-Deragon¹, Marion Genevois, Magali Roche², Marie Guinier², Camille Marmai², Clement Delestre², Catherine Legras-Lachuer² and Veronique Barban¹

176

Affiliations : ¹ Department of Research and Development, Sanofi Pasteur, 1541 Avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France ; ² ViroScan3D, 11 allée des acacias, 01600 TREVOUX

Corresponding author :

Nicolas Massé-Deragon, Sanofi Pasteur, 1541 avenue Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France

Tel +33 661741357 ; E-mail : nicolas.massederagon@gmail.com

Abstract

Background: Mechanisms regulating Yellow fever (YF) liver pathogenesis are still understood. Previous works were constrained by the lack of well representative liver cellular model recapitulating both immune and metabolic microenvironments. Liver represents a central actor of YF disease due to acute and lethal systemic manifestations. Loss of hepatic involvement following use of vaccines based on live attenuated strain YF 17D remains unexplained.

Methodology/Principal Findings: In this present study, human primary hepatocytes and human primary Kupffer cells were co-cultured in 3D organotypic microtissues and used in a global sequencing approach to investigate immune response and metabolic events impacted by vaccine YF 17D and wild-type YF Asibi. As we previously observed in hepatocytes derived from embryonic stem cells, liver microtissues remained more permissive to YFV 17D infection. Vaccine strain early induces major axis of antiviral response with full interferon (IFN) signaling pathways with expression of both type III ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$ and $\lambda 4$) and type I ($\beta 1$) IFNs, multiple IFN-induced genes (ISGs) (including IFI44L, EIF2AK2, MX1 and IFIT1). Higher expressions of pathogen sensors (RIG-I, MDA-5, AXL) and downstream regulators (IRFs, MyD88, STATs) were observed as well as transcription of inflammatory mediators (CXCL10, CXCL11, CCL7 and CCL8). Vaccine strain regulation of liver metabolism leads to decrease transcription of phase I cytochrome P450s (CYP450s) and phase II enzymes as well as potent activation of lipid metabolism. Finally, YF Asibi strain specifically increased transcription of genes involved in immune modulation pathways (ARNT, ARNTL2) and didn't show noticeable impact on liver metabolism.

Conclusions/Significance: We hypothesize that induction of strong antiviral response in both hepatocytes and Kupffer cells could manage the *in vivo* efficacy of the vaccine strain. On the other hand, delayed and partial response in association with low infection efficiency and alternative metabolism alteration may contribute to serious adverse events observed after wild-type infection.

Introduction

Yellow fever virus (YFV) is a human flavivirus endemic to sub-Saharan Africa and South America. The virus is transmitted by mosquitos and harbored by non-human primate (NHP) reservoir hosts. Despite an effective live attenuated vaccine being available, epizootic circulation occurs and results in periodic outbreaks in endemic regions and among travelers. YF disease thus remains a major threat for human [276]. About 80% of clinical infections induce asymptomatic to mild disease followed by a brief period of remission and complete resolving without further complication. A subset of 20% of infected people progress to severe acute illness that include high fever, nausea, vomiting, hepatitis with jaundice, and multi-organ failure and shock; death occurs in 20%–60% of these cases. Pro-inflammatory cytokines outbursts associated with massive viral spread are known to define disease pathology in human and in non-human primates [21,103,236,277]

Because of acute systemic manifestations, damage by YF virus infection is most severe in the liver, and can lead to fulminating hepatitis and liver dysfunction. Hyperbilirubinemia and elevated levels of serum transaminases peak toward the first week of disease and remain elevated for up to 2 months after onset. Lesions in the midzone area, steatosis, inflammation, inflammatory cells infiltrates (NK, T and B lymphocytes, DCs) and typical Councilman bodies have been observed in liver biopsies from hospitalized subjects, with complete return to normal histology upon resolution of infection [103,278]. Due to massive exposition of exogenous stimulation, the liver argues to be an immune tolerant organ where both hepatocytes and non-parenchymal cells (Kupffer cells, lymphocytes and liver sinusoidal endothelial cells) regulate the

magnitude of responses [150]. Liver necropsies following yellow fever infection allow detection of viral antigen in both Kupffer cells and hepatocytes [102,103,279].

Since rodents primary hepatocytes support YFV infection *in vitro* [219], human primary hepatocytes may be a valuable *in vitro* model to investigate innate and metabolic disorders elicited by YFV infection *in vivo* [280–283]. However, current 2-dimensional hepatic model systems suffer from a loss of cellular phenotype and metabolic properties [282,283]. Recent development allows the use a multi-cell type microtissue model, generated from primary human hepatocytes and liver-derived non-parenchymal Kupffer cells, maintained in a 3-dimensional environment that ensures for polarization and cell to cell contacts. Human liver microtissues (hLiMts) were stable and conserve liver metabolic abilities for 5 weeks in culture [186].

High-throughput RNA sequencing (RNAseq) technology has been recently employed in various viral infections and allow, with great efficiency, to profile the transcriptome of targeted model [284,285]. In this study, we used RNAseq technology to analyze host transcriptomes in the hLiMts infected with YFV 17D or YFV Asibi strains to gain insight into interactions occurring between viruses and liver cell populations as well as to well understand YF liver immune response. Infectious model was characterized. The transcriptome of virus infected microtissues was compared to control mock-infected cells at two time points post infection. Cellular responses were analyzed in terms of canonical pathways and biological functions, as well as in terms of individual genes and then confirmed by RTqPCR. A novel view of the global gene changes underlying the liver vaccine or wild-type strains responses could be helpful to understand yellow fever pathogenicity.

Methods

Cells.

Human Liver microtissues (hLiMts, InSphero AG, Zurich, Switzerland) were delivered in ready-to-use 96-well plates. Microtissues were used within 5 weeks following their delivery. Each microtissue was generated from primary human hepatocytes and liver-derived non-parenchymal Kupffer cells. hLiMts were cultured at 37°C/5% CO₂ in supplier medium and medium exchanges were performed 2 to 3 times per week. VERO cells used were from an internal seed lot produced at Sanofi Pasteur (Marcy l'Etoile, France) and derived from ATCC #CCL81 cells. Vero cells were grown in Iscove's Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Glutamax 1% (Gibco), fetal bovine serum 4% (Hyclone) and penicillin/streptomycin mix 0.1% (Gibco).

Viruses and Infections.

YF Asibi and YF 17D viruses were amplified in Vero cells. Their nucleotide sequences were controlled after infection and found similar to published ones [205,235]. YF Asibi and YF 17D viral viscerotropism and pathogenicity *versus* attenuated properties were confirmed in type I interferon receptors-deficient mice A129 (internal data, not shown). For infection experiments, liver microtissues were infected at m.o.i. 10 for 4 hours in a total volume of 20 µL. Afterwards, 3 successive washes, each followed by 30-min incubation in PBS, were performed to eliminate the residual inoculum before incubation in complete medium at 37°C/5% CO₂ cells for 48 to 72 hours. Supernatants were collected at indicated time points and stored at -80°C until analyzes. Quantification of secreted virus in the supernatant was performed by standard PFU assay on Vero cells as previously described [286], or by YF NS5-specific quantitative RT-PCR [287].

Ethics statement

Wild-type YFV strain Asibi (originally isolated from a male YF Ghanaian patient in 1927) was obtained from the Pasteur Institute Paris strains collection maintained by passage in mouse brain. It was provided by Dr Philippe Marianneau from the Pasteur Institute (Lyon, France) after one passage on Vero cells. Dr. Michele Bouloy from the Pasteur Institute (Paris, France) provided the vaccine strain, 17D-204, which was derived from a 17-D infectious clone [33].

RT-qPCR analysis

Infected and non-infected hLiMts (controls) from five independent infections were harvested at 4, 11, 24, 48 hours post infection. Total RNA was extracted with ReliaPrep tissue miniprep (Promega®) according to manufacturer's instructions. RNA was reverse-transcribed into cDNA with RT² Microfluidics qPCR Reagent System (QIAgen), followed by cDNA pre-amplification in RT² PreAMP cDNA Synthesis Kit (QIAgen). PCR amplifications were performed on BioMark™ microfluidic qPCR platform (Fluidigm) using RT² Profiler™ PCR arrays (QIAgen). Nine different PCR arrays, each one containing amplification primers for 84 human genes plus 12 controls and 8 panels were tested in this study: #PAHS-093Z (hepatotoxicity), #PAHS-002Z (drug metabolism), #PAHS-141ZH (necrosis), #PAHS-097ZH (inflammasome), #PAHS-039YH (Jak-STAT signaling), #PAHS-012Z (apoptosis), #PAHS-021Z (cytokines), and #PAHS-064Z (interferons & receptors), representing a total of 480 unique genes. For each gene, the specific amplification fold-change between infected and non-infected cells was determined using the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method [269]. A customized version of this method (PCR Array Data analysis V4) available online in QIAgen Data Analysis Center was used for analyses. It can be downloaded at <https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=d8d1813e-e5ba-4d29-8fdf->

[07a3f4227e0a&lang=en](#). Cutoff cycle threshold (Ct) values obtained in replicates were first normalized, based on 5 housekeeping genes present on the array. Non-infected cells at T0, also analyzed in replicates, were used as reference for calculation of relative fold changes (RFC). Differentially expressed genes (DEGs) were identified as genes with a relative fold-increase ≥ 3.0 and the false-positive error-rate was set at 1% ($p < 0.01$).

Antibodies

For *in situ* immunofluorescence, hLiMts were stained with mouse monoclonal antibody (mAb) anti E-YFV (OG5, Abcam) and revealed with F(ab')₂ goat anti mouse-Alexa Fluor®488 conjugate or goat anti mouse-Alexa Fluor®555 conjugate.

In situ immunofluorescence

Cells were fixed in paraformaldehyde 4% (Sigma) for 1 hour at room temperature (RT). Microtissues were then washed twice in PBS and incubated overnight with primary monoclonal antibodies at 4°C, followed by 4 hours at RT with fluorescent labeled conjugate. Observations were done under confocal microscope (Axio Observer D1, Zeiss).

Transcriptome Analyses

YFV-infected hLiMts 11 or 24 hours after YFV 17D, YFV Asibi or Mock infection in parallel culture were used for global transcriptome analysis. RNAseq libraries were generated with 100 ng of total RNA from 3 to 4 samples per condition and added with ERCC RNA spikes (ERCC RNA Spike-In Mix, Ref: 4456740 Thermofisher Scientific, Waltham, MA) using TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina, San Diego, CA) according to supplier's instructions. Libraries were sequenced on HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA) with about 25 million raw reads per sample. FastQ files

generation was performed using bcl2fastq (v2.17.1.14) allowing 0 mismatch in the barcode sequence, then reads were trimmed using CutAdapt (v1.3) to eliminate remaining adapter sequences (4 bases overlap, error rate = 10%) and poor quality bases (quality threshold <Q30; minimum length after trimming : 30 nt). Trimmed reads were aligned using TopHat (v 2.0.6) with default parameters and supplying RefSeq transcripts annotation (downloaded using UCSC website, under GTF format) through the -G option [266] with Bowtie (v 2.0.2) [267]. Reads were aligned on UCSC's Human Genome hg19 (GRCh37, Feb. 2009). Significantly differentially expressed genes were identified by comparing FPKMs between YFV infected hLiMt and mock-infected hLiMt with adjusted P value < 0.05 and fold change $\geq |3|$.

IPA analysis

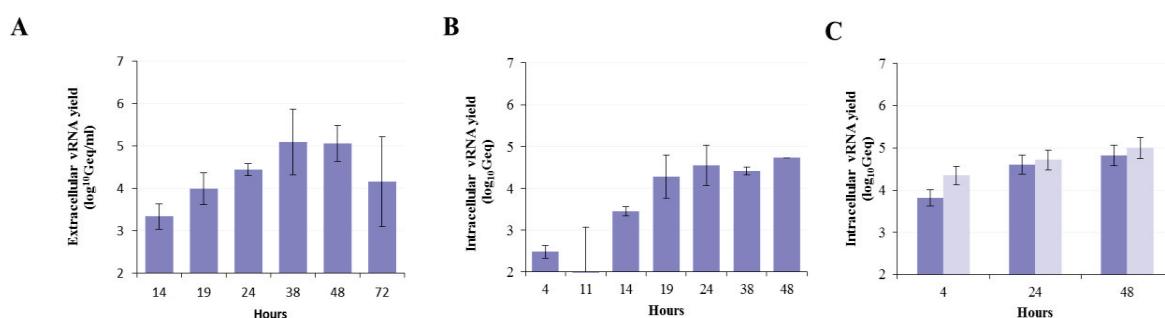
Functional interpretation of significantly differentially expressed genes was analyzed in the context of gene ontology and molecular networks by using IPA software (Ingenuity Systems; www.ingenuity.com). Those genes with known gene-probe ID numbers and corresponding expression fold-changes were uploaded into the software. In IPA, the analysis was done with $P \leq 0.05$ as the cut-off point. The IPA analysis determined the subcategories within each category, which also supplied an appropriate P value and the number of genes identified. Moreover, the known pathways of differentially expressed genes associated with immune response, metabolism and several signaling were investigated by canonical pathway analysis in IPA. Two parameters were used to determine the significance of the association between the dataset and the canonical pathway: (i) A ratio of the number of genes from the dataset that map to the pathway divided by the total number of genes that map to the canonical pathway; and (ii) a P value used to determine the probability that the association between the genes in the dataset

and the canonical pathway is because of chance alone. IPA uses a Benjamini-Hochberg (B-H) test to calculate the P value for functional categories, networks and canonical pathway analysis [270].

Results

Liver microtissues are permissive to both YF 17D and YF Asibi viruses.

Replication. Viral amplification assays were established at m.o.i. 10, in 5 to 6 independent assays (Fig 1). At a multiplicity of infection (m.o.i) of 1, only YFV 17D genome was detected in both intracellular and extracellular compartments (Fig 1A and 1B). Inversely YFV Asibi was not detected (not shown). First detection of intracellular YFV 17D genome was done at 14 hours post infection (hpi). Detection increased until 24 hpi and reached a plateau value of 4.5 $\log_{10}$ Geq/100 ng or RNA (Fig 1B). Extracellular detection demonstrated the same trend but plateau value of 5 $\log_{10}$ Geq/ml was reached at 38 hpi. Extracellular YFV 17D yield decreased at 72 hpi (Fig 1A). At m.o.i 10, both YFV Asibi and YFV 17D were detected and showed similar intracellular replication curves with the highest value of 5 $\log_{10}$ Geq/ml observed at 24 hpi (Fig 1C). None of the 2 viruses induced clear cytopathic effects in the liver microtissues, but internal alteration of model cannot be excluded at this stage.



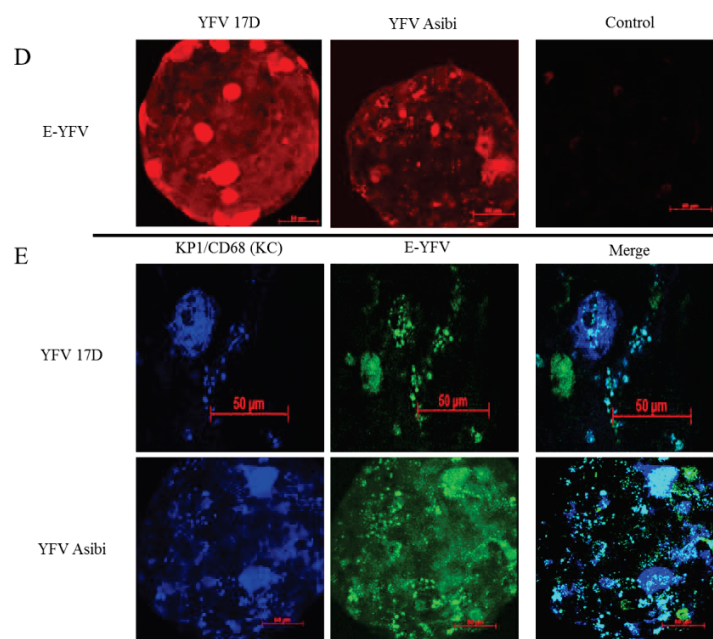


Figure 1. Replication of YFV Asibi and YFV 17D viruses in liver microtissues. Human liver microtissues were infected with YFV 17D at m.o.i 1 (**A**, **B**) or with YFV Asibi or YFV 17D at m.o.i 10 (**C**, **D**, **E**) for 4, 11, 14, 19, 24, 38 or 48 hours. Dark blue bars, YFV 17D; light blue bars, YFV Asibi. **A**: Secreted virus amplification bar charts (n=6). Vertical bars represent standard deviation (SD). **B**: Intracellular viral RNA replication bar charts (n=5). Vertical bars represent SD. Dark blue bars, YFV 17D. **C**: Secreted virus amplification bar charts (n=6). Vertical bars represent SD. **D**: Images show detection of E-YFV (red) in YFV 17D or YFV Asibi-infected microtissues at 24 hpi. Scale bars, 50μm. **E**: Images show detection of Kupffer cells (blue) and E-YFV (green) in YFV 17D or YFV Asibi-infected microtissues at 48 hpi. Scale bars, 50 μm. All observations were performed by confocal microscopy using AxioZeiss microscope observer.

Higher detection of viral envelop was done in YFV 17D-infected microtissues than in YFV Asibi-infected microtissues (Fig 1D). In addition, viral envelop co-localized with Kupffer cells marker after both infections as well as throughout microtissues (Fig 1E). These results confirmed previous report on *in vitro* infectivity of YFV vaccine and wild-type strains [71,72].

Host gene profile expression altered by YFV 17D or YFV Asibi infections.

To determine the expression profiles affected by both YFV 17D and YFV Asibi infection further, we performed high throughput sequencing analysis with infected and control liver microtissues. An average of 16 liver microtissues, representing 24 000 cells and 100 ng of total RNA, were collected at 11 or 24 hours p.i., during the first virus replication cycle. Genes with at least 3-fold differences in comparison to control genes and $P \leq 0.05$ were considered. All identified DEGs were available in Table S1.

Heat map view of DEGs after YFV infection showed an increase number of genes across time in YFV Asibi- and in YFV 17D-infected microtissues (Figure 2A). After YFV 17D infection, transcription of 189 and 631 genes was up-regulated respectively at 11 hpi and 24 hpi. Down-regulation of transcripts was also observed for 129 and 197 genes respectively at the same time. After YFV Asibi infection, up-regulation of 149 and 307 transcripts was observed at 11 hpi and 24 hpi whereas 124 and 79 transcripts appeared down-regulated at the same time (Table S1 and Figure 2B). All DEGs were then analyzed by using IPA program. Venn diagrams were generated to examine the unique and overlapping genes for both infections. As depicted in overlapping circle in Fig. 3C, 62 genes were common to both infections whereas 255 were specifically regulated after YFV 17D infection and 210 after YFV Asibi infection at 11 hpi (Fig. 2C). At 24 hpi, YFV 17D infection induced specific regulation of 465 genes, YFV Asibi induced 88 specific transcripts regulations and 232 genes were common (Table S3 and Figure 2D).

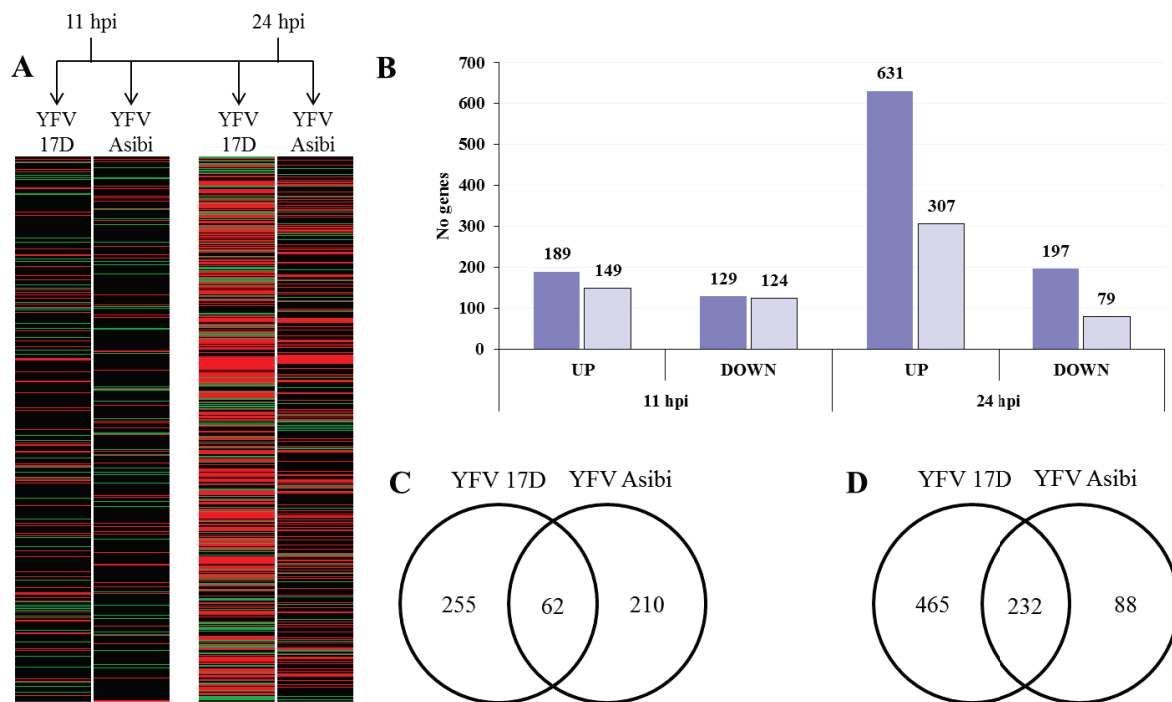


Fig. 2. Differentially expressed genes in YFV 17D- or YFV Asibi-infected liver microtissues. A. Heat Map view of differentially expressed genes (DEGs) observed after infection with YFV Asibi or YFV 17D at m.o.i. 10 and at 11 hpi or 24 hpi. Expression values were obtained by comparison between infected cells and control non-infected cells. Red, Up-regulated DEGs; green, down-regulated DEGs; black, no-deregulated DEGs. **B.** Number of up-regulated and down-regulated DEGs at 11 hpi and 24 hpi. Dark blue bars, YFV 17D; light blue bars, YFV Asibi. **C.** Venn diagram representation of unique significantly DEGs at 11 hpi after both infections. **D.** Venn diagram of unique significantly DEGs at 24 hpi after both infections.

Interestingly, 24 genes common to infection with both the viruses demonstrated alternative splicing at 24 hpi (Table S3D). This observation was related to several gene linked to interferon (IFN) response (ADAR, IFI16, IFI6, GBP5, IRF7, SP100 and SP110). In addition, 2 genes demonstrated alternative trends. Variant NM_145725 and NM_003300 of TRAF3 gene were respectively down- and up-regulated after YFV 17D and YFV Asibi infection. In contrast, variant NM_001207012 and NM_002632 of PGF gene were respectively up- and down-regulated after YFV 17D and YFV Asibi infection.

Functional analysis of Yellow fever virus DEGs in hLiMts.

Gene network analysis

According to the Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software, differentially expressed genes have been characterized with specific cellular functions. DEGs detected after YFV 17D or YFV Asibi infection at 24 hpi were respectively involved in 66 or 72 functional groups ($P \leq 0.05$) (Table S1A and S1B).

As presented in Fig 4, the number of DEGs involved in gastrointestinal disease (YFV 17D: 512 DEGs; YFV Asibi: 235 DEGs), immunological disease (YFV 17D: 261 DEGs; YFV Asibi: 142 DEGs), cell death and survival (YFV 17D: 222 DEGs; YFV Asibi: 123 DEGs) and inflammatory response (YFV 17D: 194 DEGs; YFV Asibi: 118 DEGs) was the highest. According to $-\log(P \text{ value})$, it also can be seen that the four top functions were antimicrobial response, inflammatory response, cell signaling and infectious disease. Other DEGs were in addition found in multiple function categories relating to hematological disease, inflammatory disease, skeletal and muscular disorders, cellular function and maintenance, metabolic disease, connective tissue disorders, endocrine system disorders and dermatological diseases and conditions with still higher number of DEGs after YFV 17D infection in each functional category (Table S1A and S1B).

Major Canonical pathways

To gain insights into the function of genes scored in 24 hpi HTS data, the IPA canonical pathway analysis program was used to identify the signaling and metabolic pathways associated with

these regulated transcripts. As analyzed by the IPA program and presented in Fig. 3, 10 canonical pathways were significantly ($-\log(p \text{ value}) \geq 1.3$) activated after YFV 17D infection (Figure 3).

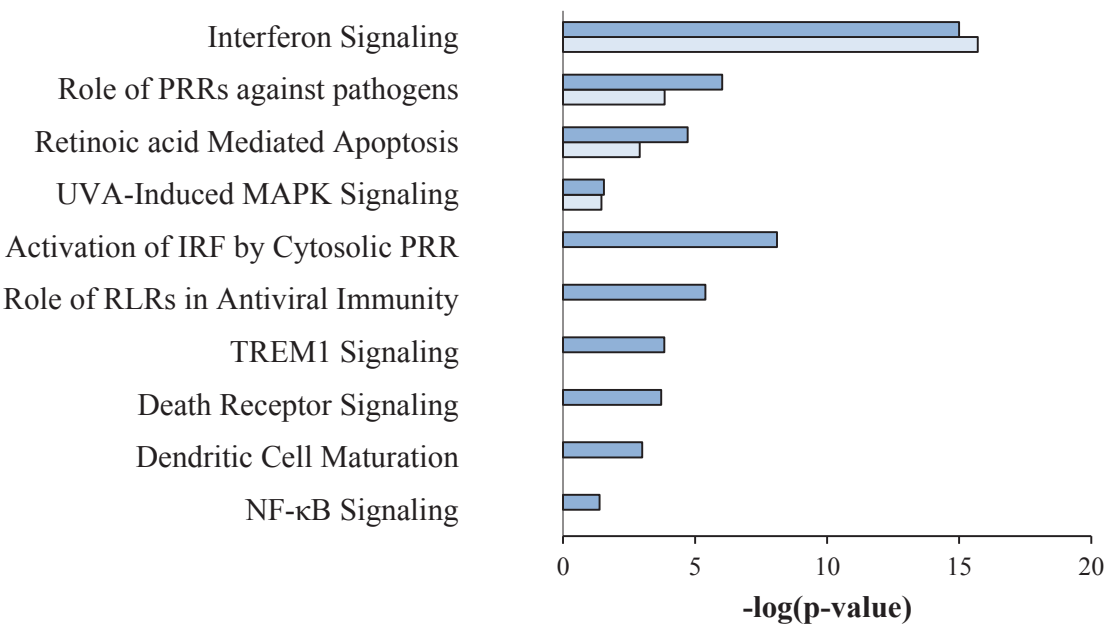


Figure 3. Significant canonical pathways at 24 hpi after YFV infection.

Significant canonical pathways were obtained by using the IPA program. Dark blue bars, YFV 17D; light blue bars, YFV Asibi.

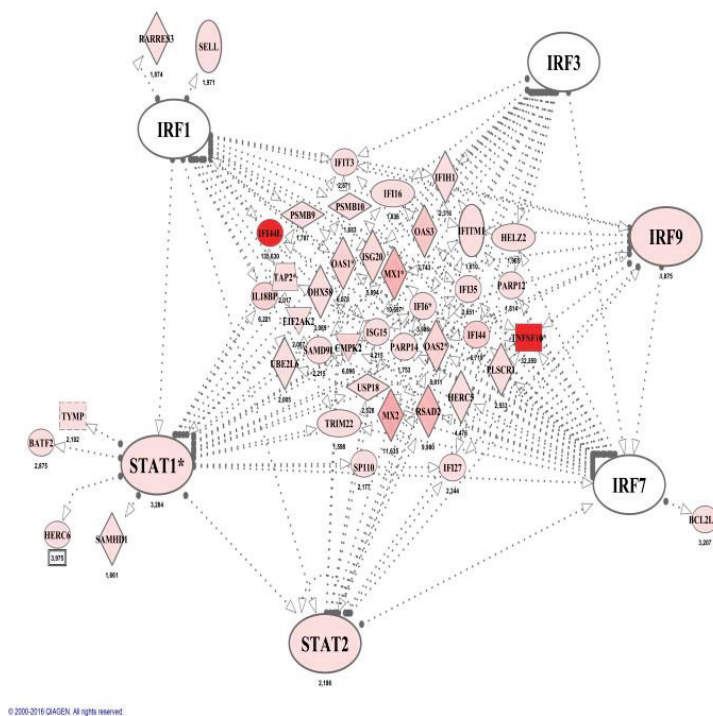
Among these pathways, 4 were also activated by YFV Asibi infection including role of PRRs against pathogens, retinoic acid mediated apoptosis, UVA-induced MAPK signaling and Interferon signaling which showed the highest significative value ($-\log(p \text{ value}) > 15$) after both infections. Majority of canonical pathways specifically activated by YFV 17D infection included upregulated transcripts (not shown) and were related to innate immune response activation

(Activation of IRFs by cytosolic PRR, role of RLRs in antiviral immunity, TREM1 signaling, dendritic cell maturation and NF- κ B signaling) and death receptor signaling (Figure 3).

Regulation of transcription factors

Since our previous work described an early activation of immune response in YFV 17D-infected stem-cells derived hepatocytes (Masse-Deragon *et al.* 2016: submitted), we hypothesized a similar delay in this model. DEGs at 11 hpi were then analyzed at 11 hpi using the software IPA®. This analysis included identification of several transcription factors impacted and linked to DEGs. YFV 17D infection was predicted to impact 6 major factors (IRF1; IRF3, IRF7, IRF9, STAT1 and STAT2) among which 3 were significantly over-expressed following infection (IRF9, STAT1 and STAT2). These transcription factors were associated with the overexpression of 42 genes, predominantly associated with the interferon response (Fig 4A).

A



B

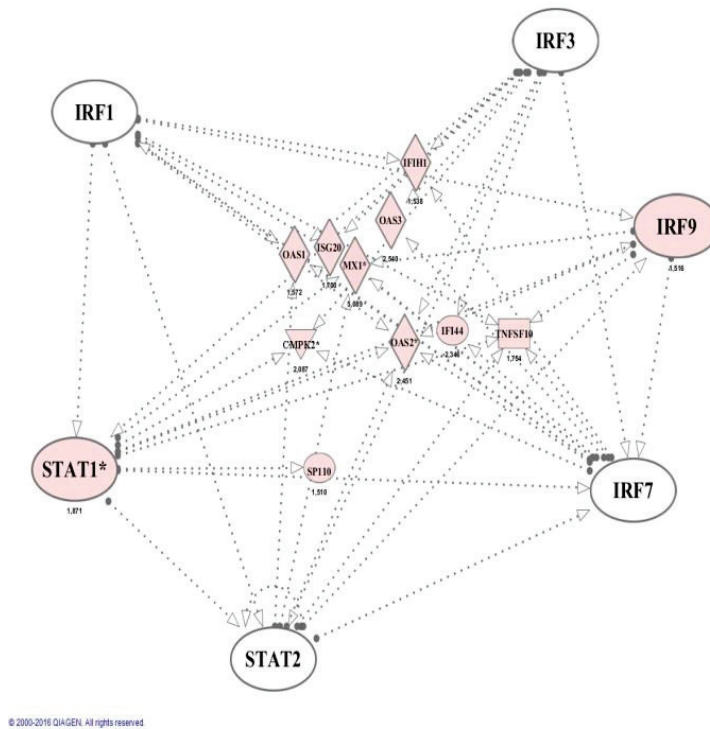


Figure 4. Early activation of transcription factor and related genes after YFV 17D infection at 11 hpi.

Transcription factor related networks were obtained by using IPA program. DEGs at 11 hpi after YFV 17D (A) or YFV Asibi (B) were represented. Molecular interactions among important transcription factors are displayed. The intensity of the node color indicates the degree of up- (red) or down- (green) regulation or the absence of regulation (white); the color-change scale bar is a log₂ scale.

Infection with YFV Asibi strain also impacted factors STAT1 and IRF9 but the expression of only 24% (10/42) of the DEGs observed after YFV 17D infection (Figure 4B).

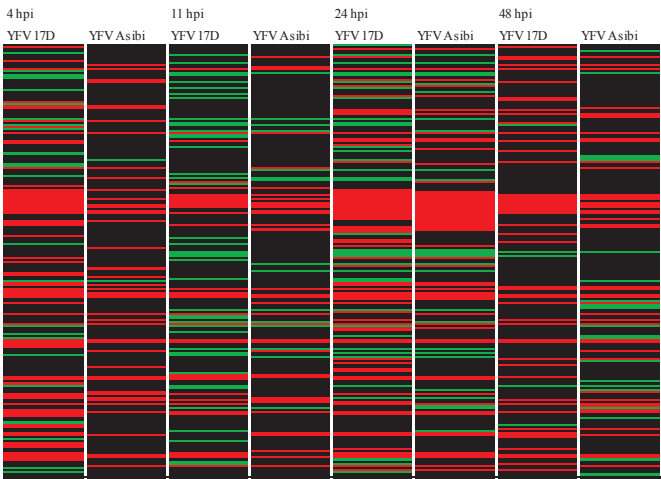
Confirmation of RNAseq data using qRT-PCR

We assessed the transcription of 480 human unique genes linked to immune response, liver metabolism, hepatotoxicity or chemotaxis in a kinetic study at 4 hpi, 11 hpi, 24 hpi and 48 hpi.

Activated genes were identified by RT-qPCR, using pre-designed PCR arrays probed against the genes of interest by comparison between infected microtissues and control mock infected microtissues.

At 24 hpi, YFV 17D infection led to identification of 91 DEGs compared to 61 DEGs detected after YFV Asibi (Table S2A and S2B). Among DEGs identified by RT-qPCR, 42 DEGs were also detected after YFV 17D infection by RNAseq and 31 DEGs after YFV Asibi with respective fold change correlation scores of 0.92 and 0.46 (Table S2C). Regarding the kinetic study, YFV 17D induced higher number of DEGs than YFV Asibi at each time tested (Figure 5A). Majority of DEGs detected were related to IFN response, confirming the importance of this pathway in our model. Intensity of regulations increased until 24hpi for both viruses and then decreased at 48 hpi, likely due to degradation of RNA since lower RNA amounts were collected at this time point after both infection (Figure 5C).

A



B

C

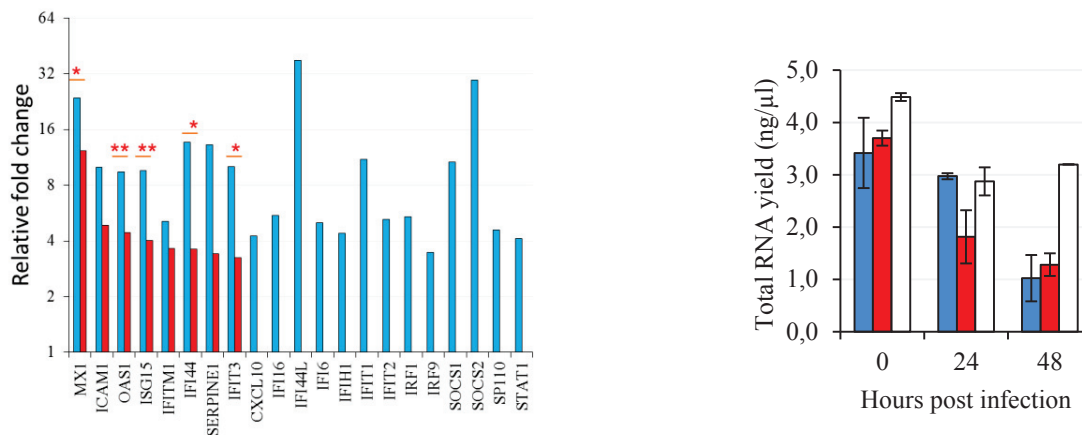


Figure 5. Detection of DEGs after YFV Asibi or YFV 17D infection by PCRarray.

Liver microtissues were infected with YFV 17D or YFV Asibi at m.o.i. 10 or mock infected for 0h, 11h, 24h or 48h. Total messenger RNAs purified from infected and non-infected cells were reverse-transcribed into cDNA and analyzed using a pre-designed PCR arrays. Non-infected cells at T0 were used as reference for calculation of relative fold changes. Differentially expressed genes were those with a relative fold-increase ≥ 2.0 and the false-positive error-rate was set at 0.05% ($p < 0.01$). **A.** Heat Map view of DEGs (n=7). Red, up-regulated; green, down-regulated; black, no change. **B.** Significant DEGs at 4 hpi (n=7). Blue bars, YFV 17D; Red bars, YFV Asibi. **C.** Total RNA yield at 0h, 24h and 48h post infection (n=3). Blue bars, YFV 17D; Red bars, YFV Asibi; white bars, mock infected.

Finally, an early regulation of genes was observed for both viruses at 4 hpi (Figure 5B). YFV 17D induced transcription of IFIH1 (FC= 4.40; p value < 0.0001), also known as MDA-5 as well as a panel of interferon-induced genes (ISGs). In particular, significative (p value < 0.05) up-regulation of IFI44L (FC=37.8), MX1 (FC=23.75), IFI44 (FC=13.7), IFIT1 (FC=11.05) and IFIT3 (FC=10.11) were observed (Figure 6B). These observations thus confirmed the results obtained on stem-cells derived hepatocytes (Masse-Deragon *et al.* 2016 : submitted). In addition, some transcription factors such as IRF1, STAT1 and IRF9 ($3 < \text{FC} < 6$; p value < 0.01), regulation factors such as SOCS1 (FC = 10.70) and SOCS2 (FC = 29.55) and chemoattractants CXCL10 (FC=4.24, p value < 0.05) and ICAM-1 (FC=9.96, p value < 0.01) were also activated following this infection. SERPIN1 transcript, encoding the "plasminogen activator inhibitor 1", PAI-1, previously associated with yellow fever

hemorrhagic manifestations [73] was found significantly up-regulated (FC=13.18; p value <10⁻⁶). Among these genes, SOCS2, SERPIN1 and ICAM1 were not identified at other time point of this kinetic. After YFV Asibi a significative increase of MX1 gene transcription was observed (FC=12.25; p value <10⁻⁵) as well as 7 other transcripts (IFI44, IFIT3, IFITM1, ISG15, OAS1, ICAM-1 and SERPIN1) but not IFIH1 and at consistently lower levels than those observed after YFV 17D infection.

Interferon response is higher after YFV 17D infection than after YFV Asibi infection

Transcripts that were up-regulated in infection with both the viruses are mainly associated with IFN signaling. Several ISGs were highly up-regulated after YFV 17D infection than after YFV Asibi infection at 24 hpi (Table and Table S3B). Members of the IFN-inducible tetratricopeptide (IFIT) family of genes (IFIT1, IFIT2, IFIT3 and IFITM1), the RSAD2 (viperin) gene as well as MX1 and MX2, members of 2'-5'-oligoadenylate synthase (OAS) family (OAS1, OAS2 and OAS3), the dsRNA-dependent protein kinase R (PKR), also known as EIF2AK2, or IFI44, IFI44L, IFI35, IFI27, IFI16, IFI6, ISG15 and ISG20 were significantly detected after both infections. These ISGs conferred an antiviral state by blocking virus replication at different levels such as endosomal fusion, regulation of post-transcriptional modification and maturation [288]. Impact of IFN response was previously described and seemed to be here linked to both type I IFN β 1 and type III IFN λ 2 (Table 1). Interestingly, some ISGs were only found after YFV 17D infection (GBP2, IFITM2 and IFIT5) as well as type III IFN λ 1, IFN λ 3 and IFN λ 4. Signal transduction of such IFN signaling was then ensure by several factors such as Janus kinase 2 (JAK2) and STAT1/2/5a and IRF9 which appeared highly (STAT1, STAT2, IRF9) or only (JAK2, STAT5A) expressed after YFV 17D infection. Particularly IRF9, STAT1 and STAT2 were known to form a specific complex, called ISGFR3 and able to nucleus translocation and

then ISGs transcription initiation [289]. These observations were highlighting a potent major role of these recently described IFN in liver antiviral response and establishment of a protective immunity against yellow fever virus. Absence, delay or lower induction of these factors may lead to incomplete response and serious adverse event observed in wild-type severe forms [278].

Interferon response							
		YFV 17D	YFV Asibi			YFV 17D	YFV Asibi
Gene Name	Gene ID	FC	FC	Gene Name	Gene ID	FC	FC
IFN β 1	NM_002176	315.2	82.4	MX2	NM_002463	220.2	87.6
IFN λ 1	NM_172140	148.9	NC	ISG15	NM_005101	187.7	84.4
IFN λ 2	NM_172138	586.8	90.1	MX1	NM_002462	134.9	76.9
IFN λ 3	NM_172139	314.9	NC	OAS3	NM_006187	83.6	51.1
IFN λ 4	NM_00127625	487.8	NC	OAS2	NM_002535	71.7	48.8
IFN λ R1	NM_170743	13.8	6.9	IFI44	NM_006417	72.3	44.5
IRF9	NM_006084	5.1	4.2	IFI6*	NM_022873	64.0	38.6
SOCS1	NM_003745	20.1	6.7	IFI27	NM_005532	85.0	33.9
STAT1	NM_139266	30.1	20.3	GBP1P1	NR_003133	102.1	32.8
STAT2	NM_198332	12.6	9.3	OASL	NM_198213	80.3	29.3
STAT5A	NM_003152	3.2	NC	OAS1	NM_00103240	41.4	27.4
GBP2	NM_004120	5.0	NC	ISG20	NM_002201	57.9	25.5
IFIT5	NM_012420	3.7	NC	IFITM1	NM_003641	45.0	25.3
IFITM2	NM_006435	4.5	NC	IFIT3	NM_001549	61.2	24.9
IFITM4P	NR_001590	4.8	NC	IFIT2	NM_001547	41.5	14.9
JAK2	NM_004972	6.4	NC	GBP4	NM_052941	30.7	12.2
IFI44L	NM_006820	747.9	390.9	IFI35	NM_005533	21.3	12.1
RSAD2	NM_080657	538.1	226.0	USP18	NM_017414	21.8	11.2
IFI16*	NM_005531	9.0	139.6	GBP1	NM_002053	24.7	10.8
ADAR*	NM_015840	7.1	122.0	EIF2AK2 (PKR)	NM_00113565	9.5	6.7
IFIT1	NM_00127092	276.1	93.3	GBP3	NM_018284	9.2	5.0
Pathogen sensing				Inflammatory mediators			
		YFV 17D	YFV Asibi			YFV 17D	YFV Asibi
AXL	NM_00127859	23.3	NC	CCL5	NM_002985	3.4	NC
IRF1	NM_002198	4.6	NC	CD40	NM_001250	5.4	NC
IRF3	NR_045568	4.6	NC	CD80	NM_005191	5.0	NC
IFIH1	NM_022168	26.0	12.0	CXCL12	NM_199168	4.7	NC
MYD88	NM_002468	4.5	NC	IL15	NM_000585	3.4	NC
TLR2	NM_003264	3.2	NC	IL15RA	NM_002189	5.5	NC
DDX60	NM_017631	42.3	27.7	IL23A	NM_016584	3.1	NC
DDX60L	NM_00101296	34.3	18.7	CXCL11	NM_005409	123.0	31.2
DDX58 (RIG-I)	NM_014314	22.5	9.4	CXCL10	NM_001565	76.7	27.7
IRF7*	NM_001572	13.1	8.6	CD38	NM_001775	60.3	16.1
DHX58 (LGP2)	NM_024119	12.0	5.9	CCL8	NM_005623	49.3	15.1
NLRC5	NM_032206	8.9	4.8	CD274	NM_014143	19.6	8.4
NOD2	NM_022162	5.9	3.4	CLIP3	NM_015526	10.3	4.9
				CCL7	NM_006273	10.0	4.9
				CD68	NM_00104005	5.7	3.5
				CX3CL1	NM_002996	6.0	3.3

Table 1. Gene enrichment in interferon signaling, pathogen sensing and inflammatory response.

NC, No Change versus control panel

*YFV Asibi variant: ADAR, NM_001111; IFI16, NM_00120656; IFI6, NM_022872; IRF7, NM_004031

Large panel of pathogen sensors, transcription factors and inflammatory mediators were involved after yellow fever vaccine strain infection

The innate immune system encodes for a serie of pathogens sensors, called pathogen recognition receptor (PRR) that, upon recognition of a viral pathogen, induced a potent antiviral host immune response [290]. Since major canonical pathways activated after hLiMt vaccine infection were also related to pathogen sensing, we analyzed associated DEGs. As depicted in Table 1, our data demonstrated an activation of these sensors after both wild-type and YFV 17D infection. Sensors of dsRNA, the replicative form of yellow fever genome, were observed after both infections. The major PRRs are members of the retinoic-acid inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLR) family, like DDX58, (also known as RIG-I), IFIH1 (MDA-5) and DHX58 (LGP2). These three transcripts were significantly (p value < 0.05) up-regulated with higher trend after YFV 17D (RIG-1, FC=22.5, MDA-5, FC=26.0; LGP2, FC=12.0) than after YFV Asibi infection (RIG-1, FC=9.4, MDA-5, FC=12.0; LGP2, FC=5.9). In addition, same trends were observed for two others transcripts associated to pathogen sensing, DDX60 and DDX60L, previously described as restrictive factor for *in vitro* hepatocytes hepatitis C virus (HCV) infection [291]. Another transcript, encoding for AXL receptor was also observed after YFV 17D infection (FC=23.3). This receptor was recently described as a potent mediator of flaviviruses entry like ZIKA virus in human skin cells [292] or DENV in primary kidney epithelial

cells [293]. Finally, our data demonstrated specific inductions, IRF1 (FC=4.6), IRF3 (FC=4.6) and IRF7 (NM_001572, FC=13.1) transcription factors as well as MYD88 (FC=4.5) and TRIM25, a downstream regulator of RIG-I pathway [294] after YFV 17D infection whereas only IRF7 (NM_004031, FC=8.6) was observed among YFV Asibi DEGs.

Interestingly, genes associated with inflammation such as cytokines, chemokines and their receptors were highly expressed only after YFV 17D than after YFV Asibi infection (Table 1). Chemokine pathway-associated genes, such as C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10), chemokine (C-C motif) ligand 7 and 8 (CCL7 and CCL8) were up-regulated. CXCL10 and CXCL11 were the highly-expressed chemokines after both infection with YFV 17D (FC=76.7 and 123.0) and YFV Asibi (FC=27.7 and 31.2). Additional chemokines and interleukins (IL), including CCL5, CXCL12, IL23A, IL15 and receptor IL15RA as well as co-stimulatory molecules cluster differentiation 40 (CD40) and CD80 were only found after YFV 17D infection (FC<10).

Induction of apoptosis pathways

YFV 17D infection triggered significant increases in the induction of transcripts related to apoptosis signaling (Table 2). Tumor necrosis factor (*TNF*)-receptor soluble factor 25 (TNFRSF25) and TNFRSF13B as well as caspase effector CASP8 and CASP10 appeared specifically up-regulated after YFV 17D infection. Same observation was done for transcription of BCL2L14 and AIM2 (absent in melanoma-2) factors. YFV 17D infection also led to higher levels of transcription of apoptosis effector and regulator genes than YFV Asibi infection: *CASP1* (RFCs: 21.3 vs 12.6), *TNFSF10* (RFCs: 11.3 vs 4.3), *TNFSF18* (RFCs: 846.7 vs 248.2) and *BIRC3* (RFCs: 14.4 vs 6.7). Inversely, YFV Asibi infection led to specific down-regulation of BCL2L11, TNFSF12 and TRAF5 transcription (FC=-8.6, -3.1 and -4.9 respectively).

Apoptosis							
		YFV 17D	YFV Asibi			YFV 17D	YFV Asibi
Gene Name	Gene ID	FC	FC	Gene Name	Gene ID	FC	FC
BCL2L13	NM_00127073	30	10	BCL2L11	NM_138621	NC	-8.6
BIRC3	NM_182962	14	6.7	DEDD	NM_032998	NC	3.3
CASP1	NM_033292	21	13	PDCD10	NM_007217	NC	3.1
MAPK8IP2	NM_012324	4.5	4.1	TGIF1	NM_173211	NC	5.0
TNFRSF11A	NM_003839	9.0	5.7	TNFSF12	NR_037146	NC	-3.1
TNFSF10	NM_003810	11	4.3	TRAF5	NM_00103391	NC	-4.9
TNFSF18	NM_005092	847	248				
XAF1	NM_017523	51	39	Autophagy and ubiquitin-proteasome system			
BLCAP	NM_00116782	-306	NC			YFV 17D	YFV Asibi
NAE1	NM_00101815	-16	NC	Gene Name	Gene ID	FC	FC
BMF	NM_033503	-5.1	NC	MTFR1	NM_00114583	-7.6	-199
TNFRSF10D	NM_003840	-4.0	NC	MFF	NR_102266	-4.6	-149
TGFB3	NM_00119568	-3.7	NC	MPV17L	NM_00112842	3.3	4.3
CARD16	NM_052889	3.0	NC	HERC5	NM_016323	120	62
CASP8	NM_033358	3.2	NC	HERC6	NM_017912	97	62
TNFRSF25	NM_00103966	3.4	NC	LAMP3	NM_014398	774	339
CASP10	NM_032977	3.4	NC	LAMP2	NM_00112260	-88	NC
PDCD1LG2	NM_025239	4.3	NC	RUFY4	NM_198483	235	NC
CD47	NM_001777	5.0	NC	PSMB10	NM_002801	5.9	3.3
BRCA2	NM_000059	8.1	NC	PSMB8	NM_148919	5.4	3.5
FAM189B	NM_006589	11	NC	UBA7	NM_003335	6.2	3.8
TNFSF13B	NM_006573	11	NC	PSMB9	NM_002800	16	8.4
FRMD6	NM_152330	14	NC	UBA3	NM_198195	5.6	NC
AIM2	NM_004833	19	NC	UBA6	NM_018227	3.0	NC
BCL2L14	NM_138722	42	NC	OTUD5	NM_00113615	224	NC
GSDMB	NM_00116595	1000	NC	NUB1	NM_00124335	8.0	NC

Table 2. Gene set enrichment in Apoptosis, autophagy and ubiquitin-proteasome system.

NC, No Change versus control panel

Regulation of autophagy pathway and ubiquitin-proteasome system

Liver microtissues infection led to up-regulation of ubiquitin-proteasome-related genes. The ubiquitin-proteasome system (UPS) is a major actor of protein metabolism and antigen processing in eukaryote cells. This system could then lead to protein degradation or alternative

function of protein [295]. Transcription of ubiquitin ligase (HERC5 and HERC6) as well as ubiquitin A7 (UBA7) and proteasome subunits (PSMB8, PSMB9 and PSMB10) were observed after both infections and with higher trends after YFV 17D infection (Table 2). In addition YFV 17D infection specifically induced transcription of UBA3 and UBA6 as well as ODUT5, a deubiquitinase with regulatory abilities [296].

Regarding activation of autophagy pathway, YFV 17D induced specific regulation of activator RUFY4 (FC=234.9) and LAMP2 (FC=-87.9) transcripts. Both viruses induced increase of LAMP3 transcription, with higher level after YFV 17D infection (FC=774.4 vs 339.0). Finally, YFV Asibi induced a more marked decrease of mitochondrial fission factor (MFF) (FC=-149.2 vs -4.6) and mitochondrial fission regulator 1 (MTFR1) (FC=-198.9 vs -7.6) transcriptions. Such inhibition of mitochondrial fission was indirectly associated with limited autophagy induction [297].

Yellow fever infection impacts cellular and liver metabolism

As previously described in humans during acute phase of infection or following production of inflammatory cytokines [130,131], decrease of hepatic phase I and phase II enzymes was observed (Table 3). Genes encoding to cytochrome P450s appeared specifically down-regulated after YFV 17D infection (CYP2A6, CYP2B6, CYP2B7P, CYP2C18) or YFV Asibi infection (CYP51A1). In addition, YFV 17D infection led to down regulation of ABCC4 transporter transcription (FC=-3.1) as well as several phase II liver enzyme transcripts such as glucokinase (GCK, FC=-6.2) or glycogen synthase 2 (GYS2, FC=-3.6). Finally, both infections demonstrated reduction of microsomal glutathione S-transferase 2 (MGST2) transcription with still higher trend after YFV 17D infection than after YFV Asibi infection (FC=-381.5 vs FC=-5.4).

Cellular and liver Metabolism							
		YFV 17D	YFV Asibi			YFV 17D	YFV Asibi
Gene Name	Gene ID	FC	FC	Gene Name	Gene ID	FC	FC
APOBEC3A	NM_145699	1422.6	480.3	TBXAS1	NM_001061	NC	-5.76
ABCC4	NM_005845	-3.1	NC	A4GALT	NM_017436	3.28	NC
ABCD1	NM_000033	3.3	NC	AADAT	NM_182662	-4.57	NC
AHCYL2	NM_001130722	-6.68	-5.62	ACO1	NM_002197	-3.14	NC
APOBEC3D	NM_152426	3.0	NC	ACOT7	NM_181866	19.58	NC
APOBEC3F	NM_145298	7.0	3.4	ACSM3	NM_202000	-3.64	NC
APOBEC3G	NM_021822	12.0	5.4	ALPL	NM_001127501	NC	-3.52
APOL2	NM_030882	4.6	NC	ATAD2B	NM_017552	NC	3.44
APOL3	NR_027834	65.6	39.2	ATP13A2	NM_022089	NC	4.11
APOL6	NM_030641	5.2	3.7	CEACAM1	NM_001712	10.22	NC
APOM	NR_045828	-7.5	-21.2	CHST9	NM_031422	-5.20	NC
ARNT	NM_001197325	NC	3.6	DPH5	NM_001077394	NC	8.84
ARNTL2	NM_001248002	NC	4.4	ECHDC1	NM_018479	-3.73	NC
CMPK2	NR_046236	104.23	58.95	FAR2	NM_001271783	3.21	NC
CNP	NM_033133	6.39	3.65	FOLH1B	NM_153696	-3.02	NC
CYP21A1P	NR_040090	4.0	NC	GCK	NM_033508	-6.17	NC
CYP2A6 (includes others)	NM_030589	-3.6	NC	GDA	NM_001242505	NC	4.86
CYP2B6	NM_000767	-3.2	NC	GLYCTK	NR_026700	-3.01	NC
CYP2B7P	NR_001278	-3.2	NC	GMPR2	NM_016576	-9.86	-3.52
CYP2C18	NM_001128925	-3.4	NC	GYLTL1B	NM_152312	-3.11	NC
CYP51A1	NM_001146152	NC	-3.1	GYS2	NM_021957	-3.60	NC
EPSTI1	NM_001002264	143.35	55.30	HK2	NM_000189	4.14	NC
F7	NM_001267554	NC	-7.43	HOGA1	NM_138413	-3.02	NC
GMPR	NM_006877	28.12	10.73	IDO1	NM_002164	5.19	NC
MT1M	NM_176870	12.3	3.9	KCND3	NM_172198	-3.21	NC
MT2A	NM_005953	6.6	3.1	KDM8	NM_024773	-3.72	NC
PDE8A	NM_002605	-5.13	NC	LIAS	NM_001278592	7.87	NC
PHACTR4	NM_023923	6.37	3.03	MAT2B	NM_182796	NC	-3.31
PLA2G12A	NM_030821	-3.2	NC	MBOAT4	NM_001100916	76.62	NC
PLA2G2A	NM_001161727	4.2	NC	METTL23	NM_001206986	NC	9.22
PLA2G4C	NM_001159323	3.5	NC	MGST2	NM_001204368	-	-5.38
PLSCR1	NM_021105	12.72	7.88	NDUFC1	NM_002494	-22.21	NC
PLSCR4	NM_001128305	4.13	3.05	NEK6	NM_001166169	NC	248.65
PPM1J	NM_005167	12.64	4.42	NR1H4	NM_001206978	232.02	NC
PPM1K	NM_152542	8.24	3.84	NUDT22	NM_001128613	51.76	NC
SDS	NM_006843	11.43	4.53	OGG1	NM_016821	NC	-3.01
SLC12A2	NM_001046	-6.2	-3.7	OSBPL8	NM_020841	NC	8.06
SLC13A5	NM_177550	8.6	6.2	OSTC	NM_001267817	NC	-4.03
SLC15A1	NM_005073	3.0	NC	PKD2L1	NM_016112	3.33	NC
SLC15A3	NR_027391	5.7	3.5	PLPP5	NM_032483	NC	3.47
SLC1A2	NM_001195728	-6.4	NC	PLPPR1	NM_017753	-9.90	NC

SLC23A3	NM_001144889	-4.0	NC	PNPLA8	NM_001256007	NC	-3.30
SLC25A28	NM_031212	8.2	4.3	PPP4R3A	NM_001284280	NC	4.43
SLC25A42	NM_178526	-3.1	NC	PTPRU	NM_133178	-	606.62
SLC37A1	NM_018964	3.9	NC	RDH5	NM_002905	-3.77	NC
SLC38A5	NM_033518	7.8	NC	SCO2	NM_001169111	38.60	NC
SLC5A9	NM_001135181	-3.6	NC	STARD5	NM_181900	9.9	3.84
SLC6A9	NM_001024845	5.9	NC	TRPV4	NM_001177433	-19.1	NC
SLCO1B3	NM_019844	-4.5	NC	UGT1A6	NM_205862	NC	-9.16

Table 3. Gene set enrichment in cellular and liver metabolism.

NC, No Change versus control panel

A potent activation of lipid metabolism was observed in our dataset after YFV 17FD. Transcripts of APOBEC- (APOBEC3A, -3F, -3G and -D) and APOL-families (APOL2, -3, -6) appeared up-regulated (Table 3). In addition, increased transcriptions of phase II liver phospholipase PLA2G2A and PLA2G4C were observed and reflected activation of lipid metabolism pathway and inflammatory process [298]. In addition to lipid metabolism activation, we found overexpression of both metallothionein -2A and -1M, two enzymes involved in response to reactive oxygen species (ROS) [299] and depicted in table 3 with higher fold changes after YFV 17D than after YFV Asibi infection (FCs: 6.6 and 12.3 versus 3.3 and 3.9).

Regarding YFV Asibi infection, we observed a specific increase of aryl hydrocarbon (AhR) receptor nuclear translocator (ARNT) and ARNT like 2 (ARNTL2) transcription with respective fold change of 3.6 and 4.4 versus non-infected control panel. These two transcripts were involved in AhR immune modulator pathway described for regulation of responses following influenza A virus infection, by interaction with viral protein [300].

Kupffer cells exert control on immune response induction following YFV 17D infection.

To evaluate a potent additional effect of Kupffer cells addition in 3D human liver microtissues, we performed high throughput same high throughput sequencing analysis using 3D hepatocytes liver model infected by both YFV 17D and YFV Asibi at m.o.i. 10 for 24 hours. We first compared basal expression levels of gene in both model (Figure 6A).

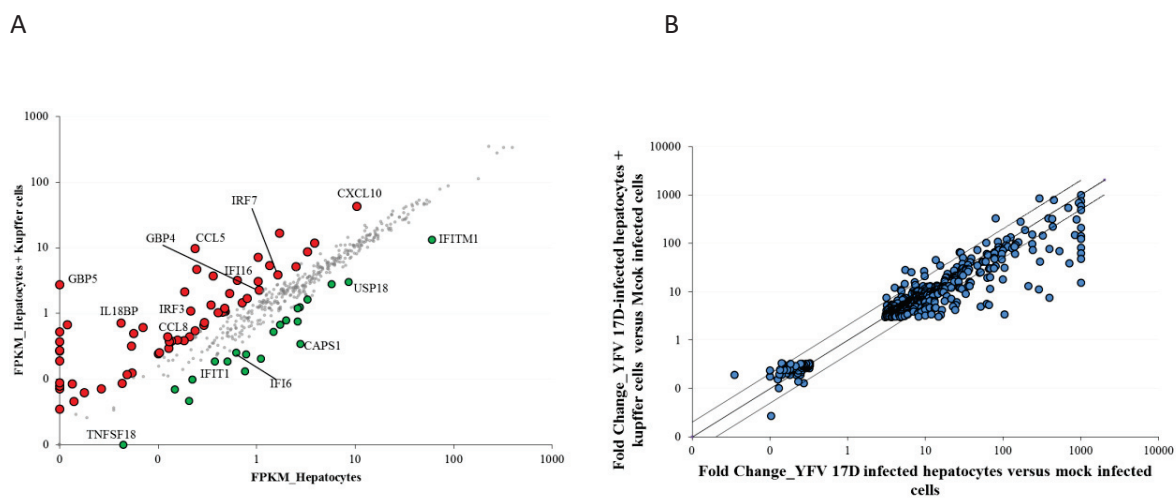


Fig. 6. Role of Kupffer cells in transcriptome profile modulations after YFV 17D infection.

A. Comparison of coverage values of transcripts in non-infected 3D pluricellular model versus 3D hepatocytes model. Transcripts with at least 2-fold higher coverage expression value were presented in red in pluricellular model and in green for 3D hepatocytes model. **B.** Comparison of Fold change expression for common DEGs detected after infection of 3D pluricellular model or 3D hepatocytes model with YFV 17D at m.o.i. for 24 hours. DEGs were determined by comparison between infected cells and control non-infected cells in each model. Each transcript expression represents average of 4 biological replicates.

By analyzing FPKM coverage expression we identified a set of 59 transcripts with higher expression level in model with Kupffer cells than in model without Kupffer cells. Particularly higher coverages were obtained for 3 ISGs (GBP4, GBP5 and IFI16), 2 transcription factors (IRF3

and IRF7) and 3 chemokines (CCL5, CCL8 and CXCL10). Of note, 4 ISGs appeared highly expressed in model without Kupffer cells (IFIT1, IFI6, IFITM1, USP18) as well as two apoptosis related transcripts (CASP1 and TNFSF18). Following YFV 17D infection, 471 DEGs were commonly found in both models. In model without Kupffer cells, we identified 74 transcripts (15.7%) with at least |2| fold higher fold change expression level than in model with Kupffer cells (Figure 6B). These data will need further investigation regarding protein expression levels. Among these transcripts, we identified several IFN (IFN- λ 1, IFN- λ 3 and IFN- λ 4) and ISGs (GBP1, GBP4, GBP5, IFIT3, IFI16 and OASL). Three transcription factors were also described (IRF3, IRF7 and STAT1) as well as chemoattractants (CXCL10, CXCL11 and CCL5) and apoptosis related factors (CASP10, TNFSF13B and BCL2L14).

Discussion

RNASeq technology was here employed to provide a comprehensive identification of the major elements in the liver response to infection or vaccination with yellow fever wild-type or

attenuated strains. Use of spike standards to set detection threshold allowed us to identify a panel of abundant gene transcripts and to perform biological analyses.

We confirmed in this model the establishment of a full antiviral response after YF 17D infection and a delayed and weaker response after YF Asibi infection.

The early induction of ISGs as well as driving of antiviral response by type III IFN and initiation of viral clearance through activation of apoptosis.

Panel of ISGs identified in this random approach of transcriptome analysis appears to be the largest after YFV 17D infection. Such observation reflects host ability to sense the virus and activate several antiviral mechanisms with limited opportunity of escaping [288,301,302]. Among genes related to antiviral response, we identified STAT1 IRF7, two transcription factors, and EIF2AK2, a sensor of dsRNA also known PKR, three factors previously associated to *in vivo* human vaccine efficiency [124,240,242].

As depicted in this study, RNA sequencing allows identification of alternative pathogen sensor transcription such as NOD2, TLR2 and NLRC5, reflecting the ability of YFV 17D to impact a large spectrum and polyfunctional immune response [124].

Both CXCL10 and CXCL11 have been shown to recruit T- and NK-cells in DENV-infected mice [303]. Monocytes were attracted to infectious site by expression of CCL7 [304]. In addition to cellular attraction, our analysis also highlights transcription of IL15 RA and IL15 both known to be expressed at the surface of macrophages and involved in transactivation of infiltrated NK cells [305]. Of note, NK cells represent the major infiltrated cells with CD8+ T lymphocytes observed in human liver necropsies after fatal form of yellow fever disease [21]. In addition

early activation and proliferation of systemic NK cells were observed after vaccination with potent role in viral clearance [306].

New evidence of viral clearance was here suggested with transcription of apoptosis-, autophagy- and ubiquitin-proteasome related genes. Particularly AIM2 inflammasome was known to initiate apoptotic pathway through activation of CASP1 and CASP8 [307]. CASP1 is also involved in pyroptosis, a programmed lytic cell death pathway, in the liver [308,309]. Autophagy and proteasome activation were supposed by respective inductions of lipid metabolism and proteasome subunit transcriptions. However, further investigation will be needed to highlight these observations and observe viral clearance at later time than 24 hpi.

Finally, comparison of organotypic liver model with or without primary Kupffer cells allows identification of a potential tolerogenic role of this resident macrophages by limiting intensity of IFN response and particularly of type III IFN responses after both infections. Moreover, alternative death mechanism was suggested by higher DNA diffusion in model without Kupffer cells and particularly after YFV Asibi suggesting a non-controlled cell death was occurring (Fig 7).

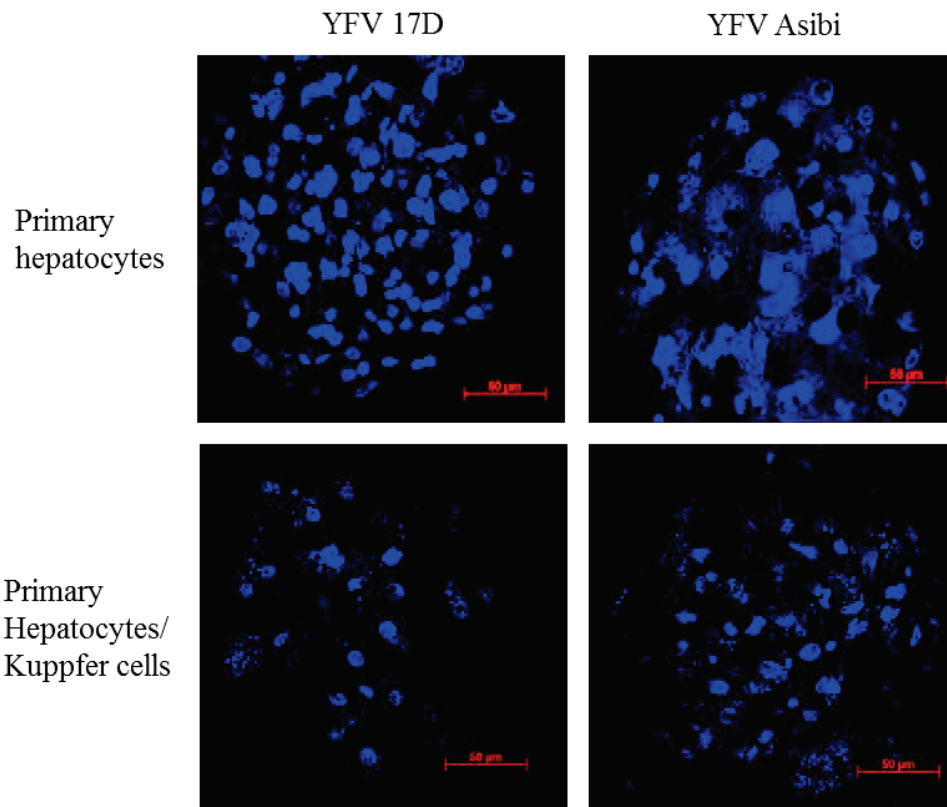


Figure 7. Differential cellular death after YFV Asibi and YFV 17D infection.

Human liver microtissues were infected with YFV Asibi or YFV 17D at m.o.i 10 for 72 hours. Images show detection of nuclei (blue) in infected-primary hepatocytes 3D model (upper panel) or in infected-human liver microtissues (lower panel). Scale bars, 50 μm . All observations were performed by confocal microscopy using AxioZeiss microscope observer.

We confirmed the disruption of liver metabolism previously observed in stem cells derived hepatocytes after YFV 17D infection. In addition, some mechanisms including potent induction of AhR modulator pathway, alternatives splicing of ISGs and regulation of mitochondrial fission may be part of YFV Asibi to escape antiviral response [64,300,310].

Finally, we confirmed the interest of the use of 3D co-cultured organotypic model better reflecting the organ microenvironment and including specific resident and tolerant immune

cells. In addition, study of interactions with other immune cells might be helpful to better understand yellow fever virus hepatic involvement and pathogenesis.

VII. DISCUSSION

La tolérance immunitaire du foie est médiée par un microenvironnement particulier incluant acteurs cellulaires, un système de détoxification et une matrice extracellulaire (MEC). La combinaison de ces trois facteurs permet un contrôle des réponses immunitaires en présence d'agents exogènes non pathogènes principalement issus de la digestion. Le seuil d'enclenchement de la réponse immunitaire se trouve ainsi considérablement augmenté par rapport aux autres organes et représente un challenge pour l'élimination de virus hépatotropes tels que les virus de l'hépatite C et de la fièvre jaune. L'induction d'une réponse antivirale précoce, complète et efficace impactant le contrôle de la réplication virale et de sa dissémination apparaît donc un élément clé de la réponse hépatique contre le virus de la fièvre jaune.

La perte du viscérotropisme, classiquement observé lors des infections sauvages, est une caractéristique commune aux vaccins vivants atténués issus de la souche YFV 17D. Ainsi contrairement aux infections sauvages qui montrent l'infection des hépatocytes et des cellules de Kupffer après nécropsies, aucune évidence de l'infection hépatique n'a été démontrée à la suite de la vaccination [276]. Ces observations ne sont pas corroborées par le fait que les deux virus, YFV Asibi et YFV 17D, présentent le même tropisme cellulaire *in vitro* [71,249,250]. Néanmoins le choix des modèles d'étude représente une part importante de ces résultats. En effet, l'établissement de lignées cellulaires a été associé à la perte des fonctions métaboliques et immunitaires [175].

Les outils

Nous avons donc choisi d'orienter nos études sur l'amélioration des modèles cellulaires hépatiques et en particulier sur l'utilisation d'un modèle de co-culture en 3D d'hépatocytes et de cellules de Kupffer primaires [186]. En parallèle, l'utilisation d'hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires a permis de s'affranchir des problèmes de coûts tout en utilisant un modèle reproduisant les capacités

métaboliques et immunitaires des cellules primaires et déjà intégré dans des études d'infection sur des virus hépatotropes comme le VHC ou le VHB [182].

L'approche transcriptomique menée dans ces travaux englobe l'utilisation de deux technologies haut débit et nous a permis d'identifier plus de 600 gènes régulés suite à l'infection par le virus de la fièvre jaune dans les hépatocytes. L'utilisation du RNASeq a été récemment employée dans de multiples études impliquant des virus afin de caractériser les profils transcriptomiques de différentes souches ou dans différentes cibles de l'hôte associé [311,312]. Cependant, la matérialisation de données massives implique la mise en place d'analyses bio-informatiques et statistiques encore non standardisées. La méthode de normalisation FPKM ne dispose pas d'outil pour définir le seuil de détection à appliquer ce qui mène classiquement à la détection d'un plus grand nombre de faux positifs [260,271]. En utilisant des contrôles externes, appelés spikes et constitués d'ARN de plantes de quantités connues, nous avons pu déterminer les limites de quantification à appliquer au RNASeq. L'application de ces standards dans la méthode de normalisation FPKM nous a permis d'obtenir une corrélation entre le nombre de copies de chaque ARN et la couverture des transcrits détectés. Ainsi la méthode de normalisation FPKM avec une couverture partielle minimale de 0,63 FPKM pour chaque transcrit a été privilégiée. Enfin la comparaison des méthodes de normalisation entre elles, au regard des corrélations avec les données de PCRarray et de l'activation des voies de signalisation de la réponse immunitaire a été faite. En confirmant de précédents résultats, la méthode FPKM nous permet ainsi d'obtenir de meilleures corrélations avec les données de PCR et de significativité d'activation des voies de signalisation que les méthodes DESeq2 et RUV [261]. De telles observations sont néanmoins à restreindre au champ du séquençage réalisés dans le cadre de notre étude « Transcriptome analysis of human liver microtissues infected with wild-type and vaccine yellow fever viruses » au regard des faibles variations entre nos souches et les profils de réponses qu'elles induisent. Ces conclusions seraient donc à reconsidérer dans un contexte d'étude clinique, de comparaisons d'espèces ou encore de variabilité technique importante. Cette étude

constitue ainsi à ce jour la plus complète des études menées sur les modulations du transcriptome induites par le virus de la fièvre jaune dans des cellules hépatiques humaines.

Entrée du virus

Notre étude confirme l'aptitude de la souche YF 17D, à l'instar de la souche sauvage YFV Asibi à infecter les hépatocytes. Ces observations impliquent que la souche YFV 17D peut infecter le foie *in vivo*. Par ailleurs l'aptitude des deux virus à infecter et se répliquer dans les cellules de Kupffer confirme une étude précédente menée *in vitro* [72] mais également la détection des antigènes viraux faite dans ces mêmes cellules à la suite de nécropsies [276].

La majeure partie des mutations qui distinguent les génomes de la souche YF Asibi et de la souche YF 17D sont situées dans l'enveloppe. La permissivité des cellules à l'infection par les deux virus réside entre autres dans une mutation du génome au niveau de l'acide aminé 380 (K-> R), située dans la protéine d'enveloppe E et connue pour améliorer la liaison avec les glycosaminoglycans (gags) à la surface des cellules cibles, favorisant ainsi l'efficacité de l'infection par la souche YFV 17D [210]. Bien que nous n'ayons pas reproduit ces résultats dans notre modèle, une étude récente suggère que ces mutations entraînent l'utilisation de voie d'endocytose alternative [313]. L'hypothèse d'un récepteur alternatif n'est pas à exclure. Les flavivirus disposent en effet d'un panel de récepteurs, variants selon les cibles cellulaires [47]. La présence abondante de ces co-récepteurs au niveau hépatique pourrait également représenter une voie d'entrée alternative pour le virus de la fièvre jaune. Le virus de l'hépatite B (HBV) infecte les hépatocytes via l'utilisation d'un co-transporteur hépatique, le NTCP (sodium-taurocholate co-transporter polypeptide), que l'on trouve exprimé en quantité sur les hépatocytes [314].

Etablissement des réponses immunitaires innées

Comme une conséquence directe de l'entrée du virus dans la cellule, il a été montré que l'activation des senseurs cytosoliques RIG-I et MDA-5 était dépendante de la concentration en ARNdb [315]. Une augmentation de la charge virale d'infection dans nos modèles n'a eu qu'un effet limité sur les niveaux d'entrée et de réplication. En revanche, les réponses induites l'ont été de manière plus précoce et particulièrement avec la souche 17D. Cette réponse antivirale se manifeste par l'induction d'un panel de senseurs cytosoliques, l'activation de réponse IFN mais également de médiateurs de l'inflammation et de chémoattractants.

Détection des pathogènes

Une augmentation de la transcription des senseurs cytosoliques MDA-5 et RIG-I et LGP2 est observée. Ces senseurs de l'ARN double brin représentent un aspect important de l'initiation de la réponse immunitaire suite à l'infection par le virus de type ARN présentant cet intermédiaire de réplication. Ces récepteurs ont déjà montré leur efficacité dans les réponses à l'infection par les virus hépatotropes HCV et HBV [316,317]. La plupart d'entre eux sont des gènes induits par les IFNs [318,319]. L'augmentation de leur expression pouvant donc être assimilée à une amplification de la réponse [320]. La capacité du virus YFV 17D pour activer la voie de détection ARNdb et de susciter des réponses immunitaires innées solides (y compris l'activation précoce des IRF7) a été rapporté précédemment in vivo chez des sujets vaccinés YFV 17D [124,240] et les macaques [277], et in vitro dans les cellules hépatiques, mais seulement sur un petit nombre de gènes sélectionnés [71,72]. D'autres voies de détection sont également suggérées. Il a précédemment été montré que la souche vaccinale YFV 17D induisait une signalisation multiple par les TLRs en parallèle de la détection des ARNs double brins. Bien que ces activations soient également associées à la présence de protéines d'œuf, ces observations témoignent de l'aptitude du virus à stimuler un large spectre de senseurs [239]. Dans nos mains, les souches sont issues d'une amplification sur cellules Vero [249]. Si seuls le TLR2 et le facteur MyD88 sont transcrits à la suite de l'infection par le virus YFV 17D dans le modèle de co-culture en 3D, on dénote la présence de

voies alternatives impliquant les récepteurs de la famille des NLR (Nod-like receptors), NOD2 et NLRC5. Le senseur NOD2 est généralement associé à l'activation des facteurs de transcriptions IRF3, IRF7 et NFκB, le senseur NLRC5 est quant à lui plutôt décrit comme un régulateur de ces différentes signalisation [321]. Prises ensemble ces données suggèrent la mise en place d'une détection globale suite à l'infection par la souche YF 17D mais avec des mécanismes régulateurs pour le contrôle de ces activations.

Etablissement des réponses IFN.

La mise en place des réponses IFN représente une des composantes principales de la réponse antivirale. Dans notre étude, l'infection par le virus de la fièvre jaune engendre une activation majeure des IFNs de type III, aussi appelés IFN-λs. Ces IFNs sont les plus récemment décrits [322]. Contrairement aux IFNs de type I, leur récepteur n'est pas ubiquitaire puisque majoritairement exprimé au niveau des cellules épithéliales [320]. De fait la réponse aux IFNs de type III est supposée comme majoritairement tissulaire en comparaison de l'activité systémique des IFNs de type I. Néanmoins le panel d'activation d'ISGs est semblable à celui engendré par les IFN de type I [320]. Les voies d'activations passent par le complexe ISGF3 (STAT1/STAT2/IRF9) qui va transloquer dans le noyau pour induire les ISGs [323,324]. La souche 17D induit ainsi la transcription des IFNs de type III : les IFNλ1, λ2, λ3 et λ4. Une activité deux fois plus importante de l'IFNλ3 par rapport à celle de l'IFNλ1 et de seize fois par rapport à celle de l'IFNλ2 a été décrite [325]. Bien que nous n'ayons pas testé la transcription de l'IFNλ3 dans le modèle d'hépatocytes dérivés de cellules souches, cette transcription apparaît uniquement dans le cadre de l'infection par la souche YF 17D et avec des niveaux supérieurs à ceux obtenus pour les autres IFNs. Il sera donc intéressant d'avoir un regard fonctionnel de cette activité antivirale dans ce modèle d'étude. En plus des IFNs de type III, les deux virus induisent la transcription de l'IFN β1 de type I. En revanche les IFNα ne sont détectés que ponctuellement dans le modèle 2D suite à l'infection par la souche YFV 17D. Enfin, aucune observation de l'IFNγ n'a été faite dans ce contexte. Ces deux catégories d'IFNs sont pourtant décrites dans le cadre des infections par les flavivirus. L'IFN-γ a en effet été décrit comme un facteur

limitant de la virémie et de la nécrose hépatique chez le singe [245]. Par ailleurs, une production de cet IFN γ au cours de la première semaine post vaccination a été démontrée comme déterminante dans la protection chez la souris. Néanmoins ces inductions ont été observées dans les ganglions lymphatiques et la rate laissant ainsi la place dans l'évolution de la pathologie aux facteurs extra-hépatiques non investigués dans notre étude [246].

Induction des ISGs

Les aptitudes d'inductions d'ISGs par les IFNs de type I et de type III ainsi que du maintien de leur expression sont reconnues comme variables. Si la stimulation par les IFN α , faiblement détectés dans notre contexte, est plutôt transitoire, elle apparaît plus étendue avec les IFN β 1 et les IFN λ s [326]. L'activité antivirale des ISGs est variable et peut se manifester à la fois par action direct contre la particule virale, par des modulations du cycle de réplication ou par action sur le métabolisme cellulaire, souvent détourné au moment de l'infection virale [288,327]. Par ailleurs les inductions à large spectre ciblant plusieurs compartiments sont souvent les plus adéquates en comparaison d'une induction plus intense mais localisée pouvant être la cible de stratégies d'évasion [64]. La dynamique d'induction de ces ISGs apparaît clairement différente entre les deux infections, quel que soit le modèle d'étude choisi. Les réponses IFNs induisent un panel de plus de 30 ISGs avec des activités antivirales bien décrites et façon plus précoce et/ou plus intense avec la souche YF 17D par rapport à la souche YF Asibi. En particulier, on retrouve majoritairement exprimés les IFIT1, 2 et 3 mais également les OAS1, 2 et 3 ou encore l'ISG15 et les MX1 et MX2. L'observation de l'induction du facteur PKR, aussi appelé EIF2AK2, a déjà été décrit comme prédictive de la réponse neutralisante des anticorps [240]. Cette détection particulière est néanmoins également observée dans le cadre de l'infection par la souche sauvage, évoquant une réponse globale au virus de la fièvre jaune plus qu'une particularité de la souche vaccinale.

L'observation de la transcription de certains ISGs dès 4 heures suivant la mise en contact entre la souche YF 17D et les cellules reflète l'existence de mécanisme d'induction indépendant des IFNs, non détectés à

ce temps. Ces inductions précoces d'ISGs ont déjà été décrites dans un contexte d'infection virale. Ces activations rapides ont en effet été reliées à la limitation des formes sévères de l'infection par le virus West Nile et se font par l'intermédiaire des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 [114,328]. Parmi ces ISGs, on retrouve les gènes de la famille des IFIT et de la famille des OAS mais également le facteur EIF2AK2, aussi appelé PKR, qui s'active par reconnaissance de l'ARNdb synthétisé dès le début du cycle de la réplication du virus de la fièvre jaune. La dynamique différente et parfois l'absence d'activation de ces gènes suite à l'infection par la souche YF Asibi pourrait contribuer à un contrôle moins important de la réplication et de la dissémination. Elle pourrait également être une conséquence directe d'un sensing plus faible et/ou altéré de ce virus par rapport à la souche YF 17D.

La détection de variants d'épissage au niveau de différents ISGs (IFI6, IFI16, ADAR) pourrait impacter l'activité antivirale de ces derniers. Dans une étude d'infection des cellules Huh7.1 par le virus de l'hépatite C (HCV) traitées ou non par l'IFN α , il a été montré l'existence d'un complexe d'épissage, le « spliceosome », était responsable de l'induction d'un variant d'une protéine d'initiation de la traduction classiquement utilisée au cours du cycle réplcatif [310]. Ces inductions alternatives pourraient être le reflet d'une stratégie de la souche YF Asibi pour limiter l'activité antivirale de ces facteurs. La plus forte induction de la réponse IFN par la souche YF 17D pourrait également expliquer l'induction de différents variants. La large activation du panel d'ISGs avec une intensité plus marquée suite à l'infection par la souche YF 17D est donc le reflet de l'efficacité de la réponse IFN. Cette réponse se révélant caractéristique puisque permettant d'identifier des éléments jusqu'alors non décrits pour l'infection hépatique du virus de la fièvre jaune.

Clairance virale

La mise en place de ces réponses contribue à l'inhibition de la réplication, de la dissémination et à l'orientation vers la clairance du virus. Cette clairance est médiée par différentes voies parmi lesquelles on trouve la voie apoptotique. L'infection par le virus de la fièvre jaune semble entraîner l'initiation de la

voie extrinsèque de l'apoptose dans les deux modèles d'études. L'activation de la voie du TNF, via l'induction du facteur TNFSF10, aussi appelé TRAIL est ainsi majoritairement observée à la suite de l'infection par la souche YF 17D tout comme l'induction des caspases initiateuses caspase 8 et caspase 10. En parallèle de cette apparente initiation, certains mécanismes régulateurs sont suggérés par l'induction simultanée de facteurs anti apoptotiques (BIRC3, CARD6), de facteurs mixtes (BCL2L13, BCL2L14) ou pro-apoptotiques (XAF1). Ces régulateurs sont notamment décrits pour limiter les inductions non contrôlées et les potentiels dommages collatéraux [329].

Une modulation de la voie de l'autophagie est observée dans cette même infection. C'est une voie privilégiée pour la dégradation des protéines et les réactions au stress oxydatif. Elle se manifeste par la formation de vésicules lipidiques, appelée phagosome, qui fusionnent par la suite avec les lysosomes dans lesquels les diminutions de pH vont participer à la dégradation propre du matériel protéique. Enfin le rôle des mitochondries dans ce phénomène apparaît lié à leur capacité de fusion et de fission afin d'éviter la dégradation dans les particules autophagiques. Ainsi une augmentation de la transcription des gènes RUFY4 et LAMP3 est associée ici à une activation de la voie de l'autophagie suite à l'infection du modèle en co-culture par la souche YF 17D. En parallèle cette observation est appuyée par une activation marquée du métabolisme des lipides et de la réponse au stress oxydatif via l'activation de la transcription des phospholipases et des apolipoprotéines mais également par la transcription de deux métallothionéine (MT2A et MT1M) qui sont des chélateurs d'ions impliqués dans ces réponses au stress [330]. Le virus YF Asibi n'induit pas ces activations et l'inhibition de deux facteurs de la fission mitochondriale (MFF et MTFR1) semble limitante pour l'induction de l'autophagie et favorable à des dérégulations du métabolisme cellulaire [331].

Enfin, la potentielle activation du système ubiquitin-protéasome représente un troisième axe dans la clairance virale. Plusieurs sous-unités du protéasome ainsi que certaines ubiquitines et ubiquitines ligases sont ainsi observées après l'infection par la souche 17D. Ce système est connu pour son

implication dans la prise en charge et la présentation des antigènes par les cellules présentatrices (cellules de Kupffer, cellules dendritiques) [332]. Des mécanismes de détournement de ce système sont par ailleurs décrits pour d'autres flavivirus. Les virus du West Nile et de la Dengue utilisent ainsi le facteur CBLL1, une ubiquitine ligase, pour faciliter les premières étapes de l'entrée du virus [333].

Recrutement et activations cellulaires

L'aptitude de prise en charge des antigènes est par ailleurs à associer à l'attraction de cellules immunitaires, capables de capter ce signal et d'effectuer le « switch » vers la réponse adaptative. Les deux virus induisent la transcription et la traduction d'un panel de chemoattractants des lymphocytes, des monocytes et des cellules NK (CXCL10, CXCL11, CCL5, CCL2, CCL3). Des facteurs de co-stimulations et de maturations (CD40 et CD80) sont également transcrits tout comme certaines cytokines aux activités pro-inflammatoires (IL15, IL15RA et IL23a). L'IL23a a été démontrée comme un facteur important pour limiter les formes létales des infections par le virus West Nile en favorisant les infiltrations de leucocytes CD45+ et de macrophages CD11b+ [334]. De son côté l'IL15, est classiquement exprimé sur le récepteur IL15RA à la surface des macrophages et permet la trans-activation des cellules NK lors de leur infiltrations hépatiques, comme démontré lors de l'infection par le virus HCV [305]. Les cellules NK lymphocytaires sont des cellules innées et résidentes du foie. Leur position les place en première ligne du recrutement post infection. L'attraction des cellules NK est importante dans la réponse contre le virus de la fièvre jaune. Une activation précoce suivie d'une période de prolifération ont ainsi été observées à la suite de la vaccination. Cette même étude a également démontré la corrélation avec les concentrations plasmatiques en IFN de type III [306]. De plus, des cellules NK ont été détectées dans différentes zones du foie avec un rôle clairement établi dans la clairance virale [101]. Enfin les cellules NK spléniques et hépatiques ont été récemment démontré que la médiation des réponses de mémoire spécifiques de l'antigène chez les primates non humains [335].

La mise en place des réponses innées et cellulaires est ainsi observée après l'infection des deux souches et dans les deux modèles de l'étude. La réponse induite par la souche YF 17D apparaît néanmoins plus complète allant du potentiel sensing à large spectre du pathogène, en passant par l'induction des réponses inflammatoires et aux interférons avec des activités antivirales directes. La chémoattraction de cellules immunitaires est également engendrée pour les lymphocytes, les monocytes et les cellules NK. Enfin des mécanismes relatifs à la clairance du virus sont engendrés par l'intermédiaire des voies de l'apoptose, de l'autophagie et du protéasome. Ces observations sont faites après utilisation de faibles doses de virus dans le modèle d'hépatocytes dérivés de cellules embryonnaires humaines. L'organisation mondiale de la santé préconise l'utilisation de dose de 4,0 log₁₀PFU [223]. La capacité de la souche YF 17D à induire, contrairement à la souche YF Asibi, une forte immunité et une réponse mémoire hépatique à des doses similaires pourrait expliquer l'aptitude de cette souche à établir une protection à vie. De son côté la souche YF Asibi présente des activations similaires mais parfois incomplètes. Les profils entre les deux souches sont néanmoins comparables au temps tardif des analyses. En parallèle, des activations de variants alternatifs d'ISGs, une inhibition plus marquée de la fission mitochondriale ou encore de mécanismes régulateurs de la réponse immune sont observées. Un effet cinétique de la réponse sans exclure de potentiels mécanismes d'échappement sont suggérés [64].

Impact du métabolisme et de la tolérance hépatique

Dans un contexte immun classique, ces réponses seraient suffisantes pour contrôler le virus. La capacité du virus sauvage à induire une réponse adéquate et efficace, en ligne avec la résolution spontanée de l'infection est observée chez environ 80% des patients infectés, avec un retour à une homéostasie du foie, une reconstitution de l'architecture hépatique et le développement d'une immunité protectrice [21]. Le foie est néanmoins un organe décrit pour sa tolérance immunitaire [140]. Celle-ci se manifeste essentiellement en raison du rôle central du foie dans l'élimination des produits de la digestion et d'un ensemble de molécules exogènes non pathogènes. L'expression des enzymes hépatiques de phase I et

de phase II, acteurs majeurs de la détoxification, dans nos différents modèles confirment leur relevance [179,180,186]. La perte de ces activités a en effet été démontrée dans de nombreux modèles cellulaires issus d'un processus carcinogénèse voire sur des cellules primaires isolées et maintenues en culture sur du court terme [175]. Au cours de l'infection par le virus YFV 17D, une diminution de la transcription de ces gènes est observée dans les deux modèles d'étude. De telles observations ont d'ores et déjà été décrites dans des contextes inflammatoires et au cours de la phase aiguë d'infection, en réponse à la production de cytokines pro-inflammatoires [130,131]. Il est à noter qu'une corrélation entre les expressions *in vitro* et *in vivo* des cytochromes P450 [336]. Cette régulation négative observée majoritairement après l'infection par la souche YFV 17D pourrait refléter les tentatives de cellules pour rétablir l'homéostasie cellulaire et ainsi la survie. Ces résultats sont confortés par l'observation d'une régulation négative de la transcription de certains gènes liés à la toxicité hépatique mais également à l'initiation des voies de l'autophagie par cette même souche. Comme discuté précédemment, la formation de vésicules autophagiques est une des réponses majeures à l'induction du stress oxydatif, ici induit par l'infection et les réponses immunitaires [337]. Ces résultats restent encore partiels et nécessiteraient la mise en place de test fonctionnel afin d'évaluer les régulations de ces voies.

De son côté la souche YF Asibi ne montre que de faibles régulations de ces mécanismes. Cela peut refléter la dynamique dans les réponses induites par les deux souches. Néanmoins, les deux modèles ont présenté une altération des tapis cellulaire (hépatocytes dérivés de cellules souches embryonnaires) ou dans les rendements d'ARN cellulaires extraits (modèle organotypique en co-culture) rendant impossible les analyses de transcription sur des temps plus tardifs.

A l'inverse, certaines transcriptions peuvent être associées à des issues pathologiques. En particulier, la transcription de l'acide glutamique décarboxylase GAD1 n'est diminuée que suite à l'infection par la souche YF 17D. Une augmentation de sa transcription a été démontrée comme une amplification de l'activation du neurotransmetteur GABA (acide gamma-aminobutyrique) responsable

d'encéphalopathies hépatiques [338]. Enfin si les caspases 8 et 10 ne présentent pas de transcription suite à l'infection par la souche YFV Asibi, la caspase 1 se trouve exprimée et pourrait être impliquée dans l'activation de la pyroptose, une voie programmée lytique de la mort cellulaire dans les hépatocytes [308,309].

Des études plus récentes sur l'étude de la toxicité des drogues au niveau hépatique ont démontrées les interactions entre différentes signalisations pro-inflammatoires (PI3K/Akt) et les voies métaboliques de détoxification. Ces voies interagissant en synergie et avec des mécanismes de balance [339,340]. Dans un contexte tolérogène, cette synergie des voies métaboliques et immunitaires peut s'avérer primordiale. Les cellules de Kupffer apparaissent comme un médiateur important de cette tolérance. Dans nos mains, la présence de ces cellules primaires réduit les intensités de réponses induites. Une transcription basale de certains facteurs de transcription et de certains ISGs pourrait être à l'origine d'un microenvironnement plus immun accélérant la détection et l'élimination d'un pathogène. Une confirmation des expressions protéiques et des mécanismes antiviraux associés nécessitera des investigations ultérieures. Contrairement à des données démontrant l'intensification de la réponse inflammatoire suite à la stimulation par le LPS, l'ajout des cellules de Kupffer apparait ici comme limitant l'intensité des réponses immunitaires induites [186]. En particulier, les réponses IFN apparaissent limitées au niveau des inductions des IFN de type III et d'un panel d'ISGs. Les macrophages hépatiques jouent un rôle de barrière entre le système systémique et le parenchyme hépatique. En captant les agents exogènes, ces cellules vont participer à l'orientation des réponses immunitaires ou métaboliques. Dans un contexte non pathogène, les cellules de Kupffer ont montré leur aptitude à engendrer des réponses lymphocytaires T régulatrices chez la souris. La détection d'un pathogène et l'initiation d'un contexte inflammatoire inhibe cette aptitude et entraîne la mort des cellules de Kupffer [152]. Cette mort se fait en partie par la mise en place d'une nécroptose, un mécanisme de mort cellulaire contrôlée par le système mais générateur d'une rupture cellulaire et de la libération de facteurs toxiques et inflammatoires [152,341]. Ces libérations vont initier le recrutement d'acteurs cellulaires extra-

hépatiques, en particulier les monocytes et aider à l'orchestration d'une réponse immunitaire efficace suivie d'un retour à l'homéostasie [342]. L'infection par le virus de la fièvre jaune est caractérisée par les atteintes du parenchyme hépatique. Des dégradations importantes des tissus sont observées dans les phases tardives de l'infection sévère [276]. Néanmoins la détection précoce des transaminases hépatiques dans les séra de patients vaccinés ou ne présentant pas de symptômes apparents suite à l'infection témoignent d'une atteinte hépatique rapide et potentiellement immunogène. Ces observations ont déjà été faites pour le virus de l'hépatite C (HCV) dans les hépatocytes primaires humains. Si la persistance du virus et de ces mécanismes de mort cellulaire sont plutôt associées au développement de fibroses et de cancers, le rôle initial de ce mécanisme dans la clairance virale et le retour à l'homéostasie hépatique n'est pas à exclure [343].

VIII. Conclusion

L'importance des signaux produits par le virus YF 17D dans ces cellules et à de faibles doses permettrait d'assurer cette rupture de tolérance, en activant le système immunitaire, la clairance virale et le retour à l'homéostasie hépatique. Cette restauration du système est également observée dans 80% des infections sauvages. Dans nos mains, la souche YFV Asibi requiert une charge virale et un temps plus importants pour induire des réponses similaires. *In vivo*, le foie est infecté dans les 24 heures suivant la pique du moustique. Cette courte période reste sujette à discussion quant au rôle qu'elle peut avoir dans l'issue de l'infection. En particulier, la présence d'une sérine protéase dans la salive du moustique a été montrée comme favorisant les infections par le DENV [344]. La migration du virus et des cellules infectées vers les organes lymphoïdes compétents ainsi que les réponses induites pourraient également avoir un impact. Ainsi la présence d'IL6, un facteur pro-inflammatoire, au moment de l'infection d'hépatocytes *in vitro* a été associée à une modulation des profils de réponse et des cinétiques de réplication [75]. Néanmoins la précocité de l'atteinte hépatique ne laisse pas de doute sur la nécessité de cet organe à bénéficier d'une réponse spécifique et rapide pour contrôler le virus de la fièvre jaune. L'évolution vers les formes sévères et les manifestations viscérotropique s'inscrit alors dans l'association d'un ensemble de facteurs incluant une virémie importante, une réplication sous-jacente et une dynamique retardée des inductions de la réponse immunitaire. L'absence de dérégulation du système de détoxification à la suite de l'infection de nos modèles cellulaires par la souche YF Asibi évoque un potentiel retard dans la rupture attendue du seuil de tolérance laissant ainsi l'opportunité au virus de transiter sans bruit dans le système puis de le submerger.

IX. Perspectives

Rôle des IFN de type III

Les IFN de type III apparaissent dans notre étude comme un acteur important de la réponse immunitaire innée. Si des études utilisant l'IFN- α ont permis de montrer un effet modéré chez le hamster [195,196], aucun essai n'a encore été effectué sur ces nouveaux interférons.

Une étude *in vivo* d'étude de la survie et des réponses hépatiques va prochainement être initiée chez la souris A129. Les souris traitées par l'interféron de type III vont être infectées par la souche YFV Asibi alors que des souris non traitées vont être infectées par la souche YFV 17D.

227

Groupe	Traitement IFN type III	Infection
1	Oui	YFV Asibi
2	Non	YFV 17D

L'objectif premier de cette étude sera d'évaluer la capacité de cet IFN à améliorer la survie des souris infectées par la souche sauvage. Dans un second temps il s'agira d'évaluer si l'ajout d'IFN de type III permet de retrouver avec la souche sauvage les réponses induites par la souche vaccinale au niveau hépatique. Une diminution de la mortalité pourrait être une ouverture sur l'utilisation thérapeutique des IFNs type III dans le cadre d'une primo-infection diagnostiquée dans les phases précoces de l'apparition des symptômes.

Variants d'épissage

Plusieurs variants ont été identifiés au cours de cette étude. Certains intégrant une signature spécifique pour chacune des souches. En particulier, des variants ADAR et IFI16 ont été identifiés à 24h comme étant uniquement induits par la souche YFV Asibi. Ces données ayant été observées par RNAseq, il faudra dans un premier temps confirmer cette transcription spécifique en PCR et à différents temps. Dans un second temps, la synthèse protéique de ces facteurs devra être vérifiée. Le rôle de ces ISGs dans d'éventuels mécanismes d'échappement pourrait par la suite être vérifié par utilisation de siRNA spécifique en vérifiant l'impact d'une inhibition sur la réplication ou l'induction des réponses immunitaires.

Mécanismes de mort cellulaire

Une des différences apparentes entre les deux souches se situent dans les mécanismes de mort cellulaire associés. La souche YFV 17D initie la transcription de facteurs pro-apoptotiques et du protéasome. De l'autre côté, les inductions par la souche YFV Asibi sont plus faibles et amènent à un marquage plus diffus des noyaux au cours de l'infection, évoquant des mécanismes nécrotiques. Ces observations devront être confirmées au niveau protéique dans un premier temps et ensuite d'un point de vue fonctionnel en utilisant les tests d'annexin V (apoptose) et d'iodure de propidium (nécrose). La vérification de l'activation des caspases peut également être faite en vérifiant le clivage des facteurs intermédiaires (clivage du facteur PARP par les caspases 3 et 7).

Mise en place des réponses adaptative

La synthèse de chémoattractants apparaît être un élément essentiel à l'établissement des réponses adaptatives, notamment la synthèse des anticorps neutralisants. Afin de comprendre le profil des infiltrations cellulaires obtenues à la suite des infections par la souche YFV 17D ou par la souche YFV Asibi, il est intéressant d'effectuer des tests de chémoattraction. Plusieurs approches se présentent et

notamment l'utilisation des chambres de Boyden qui comportent des membranes poreuses avec des pores de diamètre variables. Les cellules cibles se trouvent d'un côté de la membrane et le surnageant testé de l'autre côté. La taille des pores dans la membrane doit être choisie de façon à privilégier une transmigration active de la cellule cible.

Autres souches de la fièvre jaune

Dans l'objectif de développer un modèle *in vitro* permettant la différenciation des souches atténuées par rapport aux souches sauvages, il sera intéressant d'évaluer les réponses obtenues à la suite de l'infection du modèle par des souches sauvages humaines. L'objectif de cette approche sera ainsi de prendre en compte des souches humaines isolées lors d'épidémie dans différentes zones endémiques et ainsi d'intégrer cette variabilité dans l'évaluation de ce modèle cellulaire. Une simple comparaison des profils transcriptomiques associés à la réponse IFN (IFN de type III, ISGs) ainsi que l'aspect cinétique de la réponse (4h versus 24h ou 48h) pourra être faite par rapport à la réponse obtenue avec la souche de laboratoire YFV Asibi. Si des différences apparaissent, la question des séquences se posera alors et il sera nécessaire de s'assurer de la présence des mutations originales sur les différentes souches et d'en identifier les variations qui pourraient expliquer une modulation des réponses obtenues.

Par ailleurs le backbone de la souche 17D a été utilisé pour la construction des chimères YF/Dengue actuellement utilisée dans le vaccin contre la dengue. Afin d'évaluer le rôle des protéines non-structurales de la fièvre jaune, il sera intéressant de comparer les réponses induites par ces chimères et les virus dengue parentaux dans ce modèle.

Affranchissement des étapes d'entrée

Puisque l'aspect de l'entrée du virus n'est à l'heure actuelle pas élucidée dans le cadre des infections par la fièvre jaune, il serait intéressant de s'assurer que ces étapes ne suffisent pas à expliquer les cinétiques différentes des réponses hépatiques induites dans cette étude. Ainsi la micro injection ou la transfection

de génomes viraux dans le cytoplasme pourrait être une approche intéressante afin de comparer les niveaux de réponses induites à niveaux équivalents d'ARN. Néanmoins des problèmes de transfection de ces ARNs dans nos modèles cellulaires et en particulier sur des cellules primaires en 3D pourraient émerger au regard des efficacités de la transfection et de l'atteinte de l'ensemble des cellules du modèle. Par ailleurs, l'affranchissement des étapes d'entrée représente un biais non négligeable dans l'infection du virus de la fièvre jaune et de la souche vaccinale. En effet la présence de mutation dans la protéine d'enveloppe est inhérente aux souches vaccinales actuellement commercialisées et des modulations dans les affinités avec le récepteur ont été associées à ces mutations [210].

Impact du métabolisme hépatique

Cette étude démontre la régulation négative de la transcription d'enzymes hépatiques à la suite de l'infection par la souche YFV 17D. Une corrélation entre les niveaux de transcription et les synthèses protéiques a été établie [336]. En revanche le rôle du métabolisme dans l'évolution de la pathologie de la fièvre jaune n'est pas documenté. Une étape importante du projet sera de s'assurer de la perte de l'activité métabolique en étudiant le métabolisme de certaines drogues. Une utilisation de substrat couplé à des molécules luminescentes permettra de mesurer par simple lecture de luminescence la dégradation du substrat et donc en déduire l'activité de l'enzyme. Des tests de l'activité des cytochromes sont ainsi développés par la société Millipore™. Par ailleurs, l'absence de régulations du métabolisme avec la souche YFV Asibi suggère un métabolisme actif dans le système. Il conviendrait donc de vérifier les activités métaboliques en condition infectieuse et sur une cinétique prolongée.

Mécanisme d'échappement du virus

Les flavivirus, au même titre qu'un ensemble de famille de pathogènes ont développé des stratégies d'échappement du système immunitaire [64]. Parmi les mécanismes décrits, la séquestration des ARN dans des vésicules lipidiques ainsi qu'un antagonisme des réponses IFN ont été recensés. Si l'inhibition des réponses IFN affecte directement les réponses antivirales associées, la séquestration de l'ARN dans

des vésicules pourrait expliquer une absence de détection du pathogène et permettre une réplication sous-jacente du virus [64]. La colocalisation de l'ARN virale avec des vésicules endomosaes peut être démontrée par utilisation d'agents de perméabilisation aux propriétés variables. Le NP40 est ainsi un agent perméabilisant utilisé pour l'ensemble des bicouches lipidiques et en particulier les bicouches riches en cholestérol comme les vésicules cytoplasmique. A l'inverse la digitonine est un agent doux utilisé pour perméabiliser les membranes cellulaires uniquement, car moins riches en cholestérol [345]. Enfin des expériences de mutagénèses dirigées permettraient d'évaluer l'impact des mutations de ces protéines non-structurales sur ces activités antagonistes des réponses IFN.

X. Bibliographie

Reference List

1. Coleman W (1984) Epidemiological method in the 1860s: yellow fever at Saint-Nazaire. *Bull Hist Med* 58: 145-163.
2. Reed W (1902) Recent Researches concerning the Etiology, Propagation, and Prevention of Yellow Fever, by the United States Army Commission. *J Hyg (Lond)* 2: 101-119.
3. Stokes A, Bauer JH, Hudson NP (2001) The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. 1928. *Rev Med Virol* 11: 141-148.
4. Jennings AD, Whitby JE, Minor PD, Barrett AD (1993) Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the envelope protein genes of the wild-type French viscerotropic strain of yellow fever virus and the live vaccine strain, French neurotropic vaccine, derived from it. *Virology* 192: 692-695.
5. Abrao EP, da Fonseca BA (2016) Infection of Mosquito Cells (C6/36) by Dengue-2 Virus Interferes with Subsequent Infection by Yellow Fever Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 16: 124-130.
6. Aitken TH, Downs WG, Shope RE (1977) *Aedes aegypti* strain fitness for yellow fever virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* 26: 985-989.
7. Tabachnick WJ, Wallis GP, Aitken TH, Miller BR, Amato GD, Lorenz L, Powell JR, Beaty BJ (1985) Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations. *Am J Trop Med Hyg* 34: 1219-1224.
8. Auguste AJ, Lemey P, Pybus OG, Suchard MA, Salas RA, Adesiyun AA, Barrett AD, Tesh RB, Weaver SC, Carrington CV (2010) Yellow fever virus maintenance in Trinidad and its dispersal throughout the Americas. *J Virol* 84: 9967-9977.
9. Baronti C, Goitia NJ, Cook S, Roca Y, Revollo J, Flores JV, de L, X (2011) Molecular epidemiology of yellow fever in Bolivia from 1999 to 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 277-284.
10. Von Lindern JJ, Aroner S, Barrett ND, Wicker JA, Davis CT, Barrett AD (2006) Genome analysis and phylogenetic relationships between east, central and west African isolates of Yellow fever virus. *J Gen Virol* 87: 895-907.
11. Pisano MR, Mercier V, Deubel V, Tolou H (1999) Complete nucleotide sequence and phylogeny of an American strain of yellow fever virus, TRINID79A. *Arch Virol* 144: 1837-1843.
12. Thomas P, Monath MG, JESADTB (2013) Yellow fever vaccine. In: *Vaccines*. pp. 870-968.
13. Deubel V, Schlesinger JJ, Digoutte JP, Girard M (1987) Comparative immunochemical and biological analysis of African and South American yellow fever viruses. *Arch Virol* 94: 331-338.

14. Vasconcelos PF (2003) Diagnosis of viral disease. *Lancet* 361: 1589.
15. Vasconcelos PF (2003) [Yellow Fever]. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 275-293.
16. Parent M, Hantson P, Honore P, Colebunders R, Rahier J, Bonbled F (2005) [Biological and pathological data in a case of yellow fever imported from the Gambia]. *Ann Pathol* 25: 393-397.
17. Monath TP, Cetron MS (2002) Prevention of yellow fever in persons traveling to the tropics. *Clin Infect Dis* 34: 1369-1378.
18. Digoutte JP, Calvo-Wilson MA, Mondo M, Traore-Lamizana M, Adam F (1992) Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection. *Res Virol* 143: 417-422.
19. Ellis BR, Barrett AD (2008) The enigma of yellow fever in East Africa. *Rev Med Virol* 18: 331-346.
20. Monath TP, Lee VH, Wilson DC, Fagbami A, Tomori O (1974) Arbovirus studies in Nupeko forest, a possible natural focus of yellow fever virus in Nigeria. I. Description of the area and serological survey of humans and other vertebrate hosts. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68: 30-38.
21. Quaresma JA, Pagliari C, Medeiros DB, Duarte MI, Vasconcelos PF (2013) Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Rev Med Virol* 23: 305-318.
22. Mutebi JP, Barrett AD (2002) The epidemiology of yellow fever in Africa. *Microbes Infect* 4: 1459-1468.
23. Romano AP, Costa ZG, Ramos DG, Andrade MA, Jayme VS, Almeida MA, Vettorello KC, Mascheretti M, Flannery B (2014) Yellow Fever outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008-2009. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2740.
24. Cook GC (1994) Fatal yellow fever contracted at the Hospital for Tropical Diseases, London, UK, in 1930. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 712-713.
25. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JS, Russell PK, Trent DW (1985) *Flaviviridae*. *Intervirology* 24: 183-192.
26. Heinz FX, Allison SL (2000) Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv Virus Res* 55: 231-269.
27. Monath TP (2001) Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 1: 11-20.
28. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70 (Pt 1): 37-43.
29. Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ (2003) Structure of West Nile virus. *Science* 302: 248.

30. Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCourt DW, Bazan JF, Fletterick RJ, Rice CM (1990) Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8898-8902.
31. Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijckman N, Rice CM, Spaan WJ (2003) A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol* 84: 1261-1268.
32. Olsthoorn RC, Bol JF (2001) Sequence comparison and secondary structure analysis of the 3' noncoding region of flavivirus genomes reveals multiple pseudoknots. *RNA* 7: 1370-1377.
33. Wang E, Weaver SC, Shope RE, Tesh RB, Watts DM, Barrett AD (1996) Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology* 225: 274-281.
34. Ferlenghi I, Clarke M, Ruttan T, Allison SL, Schlich J, Heinz FX, Harrison SC, Rey FA, Fuller SD (2001) Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus. *Mol Cell* 7: 593-602.
35. Wang WK, Sung TL, Lee CN, Lin TY, King CC (2002) Sequence diversity of the capsid gene and the nonstructural gene NS2B of dengue-3 virus in vivo. *Virology* 303: 181-191.
36. Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ (2003) Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol* 77: 7143-7149.
37. Kiermayr S, Kofler RM, Mandl CW, Messner P, Heinz FX (2004) Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *J Virol* 78: 8078-8084.
38. Yang JS, Ramanathan MP, Muthumani K, Choo AY, Jin SH, Yu QC, Hwang DS, Choo DK, Lee MD, Dang K, Tang W, Kim JJ, Weiner DB (2002) Induction of inflammation by West Nile virus capsid through the caspase-9 apoptotic pathway. *Emerg Infect Dis* 8: 1379-1384.
39. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, Baker TS, Strauss JH, Kuhn RJ, Rossmann MG (2003) Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J* 22: 2604-2613.
40. Ciczora Y, Callens N, Seron K, Rouille Y, Dubuisson J (2010) Identification of a dominant endoplasmic reticulum-retention signal in yellow fever virus pre-membrane protein. *J Gen Virol* 91: 404-414.
41. Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A (2002) Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 76: 5480-5491.
42. Catteau A, Roue G, Yuste VJ, Susin SA, Despres P (2003) Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation. *Biochimie* 85: 789-793.

43. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375: 291-298.
44. Prikhod'ko GG, Prikhod'ko EA, Cohen JI, Pletnev AG (2001) Infection with Langat Flavivirus or expression of the envelope protein induces apoptotic cell death. *Virology* 286: 328-335.
45. van der Most RG, Harrington LE, Giuggio V, Mahar PL, Ahmed R (2002) Yellow fever virus 17D envelope and NS3 proteins are major targets of the antiviral T cell response in mice. *Virology* 296: 117-124.
46. Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX (2001) Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J Virol* 75: 4268-4275.
47. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A (2014) Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses* 6: 69-88.
48. Wallis TP, Huang CY, Nimkar SB, Young PR, Gorman JJ (2004) Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. *J Biol Chem* 279: 20729-20741.
49. Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V (1989) Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology* 171: 302-305.
50. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V (1999) Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 73: 6104-6110.
51. Muylaert IR, Chambers TJ, Galler R, Rice CM (1996) Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology* 222: 159-168.
52. Muylaert IR, Galler R, Rice CM (1997) Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J Virol* 71: 291-298.
53. Lindenbach BD, Rice CM (1999) Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 73: 4611-4621.
54. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Cropp CB, Monath TP (1986) Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J Virol* 60: 1153-1155.
55. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Putnak JR, Walsh EE (1990) Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. *J Gen Virol* 71 (Pt 3): 593-599.
56. Firth AE, Atkins JF (2009) A conserved predicted pseudoknot in the NS2A-encoding sequence of West Nile and Japanese encephalitis flaviviruses suggests NS1' may derive from ribosomal frameshifting. *Virol J* 6: 14.

57. Nestorowicz A, Chambers TJ, Rice CM (1994) Mutagenesis of the yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: effects on proteolytic processing, viral replication, and evidence for alternative processing of the NS2A protein. *Virology* 199: 114-123.
58. Co MD, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL (2002) Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology* 293: 151-163.
59. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A (2003) Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14333-14338.
60. Niyomrattanakit P, Winoyanu wattikun P, Chanprapaph S, Angsuthanasombat C, Panyim S, Katzenmeier G (2004) Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. *J Virol* 78: 13708-13716.
61. Droll DA, Krishna Murthy HM, Chambers TJ (2000) Yellow fever virus NS2B-NS3 protease: charged-to-alanine mutagenesis and deletion analysis define regions important for protease complex formation and function. *Virology* 275: 335-347.
62. Lindenbach BD, Rice CM (2003) Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 59: 23-61.
63. Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, Garcia-Sastre A (2005) Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol* 79: 8004-8013.
64. Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S (2013) Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine* 31: 461-471.
65. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH (1985) Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229: 726-733.
66. Koonin EV (1993) Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol* 74 (Pt 4): 733-740.
67. Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R (1995) Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem* 270: 19100-19106.
68. Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM (1998) The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* 72: 6199-6206.
69. Schlesinger JJ, Brandriss MW (1983) 17D yellow fever virus infection of P388D1 cells mediated by monoclonal antibodies: properties of the macrophage Fc receptor. *J Gen Virol* 64 (Pt 6): 1255-1262.
70. Klotz O, Belt TH (1930) The Pathology of the Liver in Yellow Fiver. *Am J Pathol* 6: 663-688.

71. Woodson SE, Holbrook MR (2011) Infection of hepatocytes with 17-D vaccine-strain yellow fever virus induces a strong pro-inflammatory host response. *J Gen Virol* 92: 2262-2271.
72. Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR (2011) Differential cytokine responses from primary human Kupffer cells following infection with wild-type or vaccine strain yellow fever virus. *Virology* 412: 188-195.
73. Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR (2013) Coagulation factors, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1, are differentially regulated by yellow fever virus infection of hepatocytes. *Virus Res* 175: 155-159.
74. Palmer DR, Fernandez S, Bisbing J, Peachman KK, Rao M, Barvir D, Gunther V, Burgess T, Kohno Y, Padmanabhan R, Sun W (2007) Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow fever 17D vaccine virus in human dendritic cells. *J Gen Virol* 88: 148-156.
75. Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Holbrook MR, St Jeor S (2005) Yellow fever virus strains Asibi and 17D-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression. *Virology* 342: 167-176.
76. Chu JJ, Ng ML (2004) Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol* 78: 10543-10555.
77. Hase T, Summers PL, Eckels KH (1989) Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch Virol* 104: 129-143.
78. Amberg SM, Nestorowicz A, McCourt DW, Rice CM (1994) NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies. *J Virol* 68: 3794-3802.
79. Lobigs M (1993) Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6218-6222.
80. Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM (1990) Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology* 177: 159-174.
81. Brinton MA (2001) Host factors involved in West Nile virus replication. *Ann N Y Acad Sci* 951: 207-219.
82. Cleaves GR, Ryan TE, Schlesinger RW (1981) Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology* 111: 73-83.
83. Westaway EG (1987) Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res* 33: 45-90.
84. Johansson MA, Arana-Vizcarrondo N, Biggerstaff BJ, Staples JE (2010) Incubation periods of Yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg* 83: 183-188.
85. Nassar ES, Chamelet EL, Coimbra TL, de Souza LT, Suzuki A, Ferreira IB, da Silva MV, Rocco IM, Travassos da Rosa AP (1995) Jungle yellow fever: clinical and laboratorial studies emphasizing viremia on a human case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37: 337-341.

86. Oudart JL, Rey M (1970) [Proteinuria, proteinaemia, and serum transaminase activity in 23 confirmed cases of yellow fever]. *Bull World Health Organ* 42: 95-102.
87. Boulos M, Segurado AA, Shiroma M (1988) Severe yellow fever with 23-day survival. *Trop Geogr Med* 40: 356-358.
88. Monath TP, Brinker KR, Chandler FW, Kemp GE, Cropp CB (1981) Pathophysiologic correlations in a rhesus monkey model of yellow fever with special observations on the acute necrosis of B cell areas of lymphoid tissues. *Am J Trop Med Hyg* 30: 431-443.
89. Ahmed SS, Soghaier MA, Mohammed S, Khogali HS, Osman MM, Abdalla AM (2016) Concomitant outbreaks of yellow fever and hepatitis E virus in Darfur States, Sudan, 2012. *J Infect Dev Ctries* 10: 24-29.
90. Saluzzo JF, Some L, Baudon D, Girault G, Lhuillier M, Kambire PA, Roux JF, Digoutte JP (1985) [Use of stabilized yellow fever vaccine 17D at the time of the yellow fever epidemic in Burkina Faso in 1983]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 78: 536-540.
91. Brown TM, Chang GJ, Cropp CB, Robbins KE, Tsai TF (1994) Detection of yellow fever virus by polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol* 2: 41-51.
92. Bae HG, Drosten C, Emmerich P, Colebunders R, Hantson P, Pest S, Parent M, Schmitz H, Warnat MA, Niedrig M (2005) Analysis of two imported cases of yellow fever infection from Ivory Coast and The Gambia to Germany and Belgium. *J Clin Virol* 33: 274-280.
93. Mendez JA, Rodriguez G, Bernal MP, de Calvache D, Boshell J (2003) [Molecular detection of yellow fever virus in human sera and mice brains]. *Biomedica* 23: 232-238.
94. Niedrig M, Kursteiner O, Herzog C, Sonnenberg K (2008) Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against yellow fever virus. *Clin Vaccine Immunol* 15: 177-181.
95. Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, Pelegrino JL, Guzman MG (2003) MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods* 110: 179-184.
96. Chaterji S, Allen JC, Jr., Chow A, Leo YS, Ooi EE (2011) Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. *Am J Trop Med Hyg* 84: 224-228.
97. De Brito T, Siqueira SA, Santos RT, Nassar ES, Coimbra TL, Alves VA (1992) Human fatal yellow fever. Immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. *Pathol Res Pract* 188: 177-181.
98. Rodrigues SG, da Rosa AP, Galler R, Barros VL, Vieira CM, da Rosa JF, Azevedo RS, Nunes MR, da Rosa ES, Vasconcelos PF (2004) Yellow fever virus isolated from a fatal post vaccination event: an experimental comparative study with the 17DD vaccine strain in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Rev Soc Bras Med Trop* 37 Suppl 2: 69-74.

99. Nasidi A, Monath TP, DeCock K, Tomori O, Cordellier R, Olaleye OD, Harry TO, Adeniyi JA, Sorungbe AO, Ajose-Coker AO, . (1989) Urban yellow fever epidemic in western Nigeria, 1987. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 401-406.
100. BEARCROFT WG (1962) Studies on the livers of yellow-fever-infected African monkeys. *J Pathol Bacteriol* 83: 49-58.
101. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF, Andrade HF, Jr., Vasconcelos PF, Duarte MI (2006) Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. *Virology* 345: 22-30.
102. Quaresma JA, Duarte MI, Vasconcelos PF (2006) Midzonal lesions in yellow fever: a specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response. *Med Hypotheses* 67: 618-621.
103. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade HF, Jr., Vasconcelos PF, Duarte MI (2007) Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 161-168.
104. Kumarasena RS, Niriella MA, Ranawaka CK, Miththinda JK, de Silva AP, Dassanayaka AS, de Silva HJ (2016) Predicting acute liver failure in dengue infection. *Ceylon Med J* 61: 35-36.
105. Domingo C, Yactayo S, Agbenu E, Demanou M, Schulz AR, Daskalow K, Niedrig M (2011) Detection of yellow fever 17D genome in urine. *J Clin Microbiol* 49: 760-762.
106. Monath TP (2006) Yellow fever as an endemic/epidemic disease and priorities for vaccination. *Bull Soc Pathol Exot* 99: 341-347.
107. Klotz O, Belt TH (1930) Regeneration of Liver and Kidney Following Yellow Fever. *Am J Pathol* 6: 689-697.
108. Hacker UT, Jelinek T, Erhardt S, Eigler A, Hartmann G, Nothdurft HD, Endres S (1998) In vivo synthesis of tumor necrosis factor-alpha in healthy humans after live yellow fever vaccination. *J Infect Dis* 177: 774-778.
109. Ter Meulen J, Sakho M, Koulemou K, Magassouba N, Bah A, Preiser W, Daffis S, Klewitz C, Bae HG, Niedrig M, Zeller H, Heinzl-Gutenbrunner M, Koivogui L, Kaufmann A (2004) Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. *J Infect Dis* 190: 1821-1827.
110. Li G, Duan T, Wu X, Tesh RB, Soong L, Xiao SY (2008) Yellow fever virus infection in Syrian golden hamsters: relationship between cytokine expression and pathologic changes. *Int J Clin Exp Pathol* 1: 169-179.
111. Lhuillier M, Sarthou JL, Cordellier R, Monteny N, Gershy-Damet GM, Bouchite B (1986) [Endemic emergence of yellow fever in the Ivory Coast: the place of anti-yellow fever IgM detection in the strategy of surveillance]. *Bull World Health Organ* 64: 415-420.
112. Theiler M, CASALS J (1958) The serological reactions in yellow fever. *Am J Trop Med Hyg* 7: 585-594.

113. Lobigs M, Dalgarno L, Schlesinger JJ, Weir RC (1987) Location of a neutralization determinant in the E protein of yellow fever virus (17D vaccine strain). *Virology* 161: 474-478.
114. Daffis S, Kontermann RE, Korimbocus J, Zeller H, Klenk HD, Ter Meulen J (2005) Antibody responses against wild-type yellow fever virus and the 17D vaccine strain: characterization with human monoclonal antibody fragments and neutralization escape variants. *Virology* 337: 262-272.
115. Ryman KD, Xie H, Ledger TN, Campbell GA, Barrett AD (1997) Antigenic variants of yellow fever virus with an altered neurovirulence phenotype in mice. *Virology* 230: 376-380.
116. Vaughan K, Greenbaum J, Blythe M, Peters B, Sette A (2010) Meta-analysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology. *Viral Immunol* 23: 259-284.
117. Pulendran B (2009) Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol* 9: 741-747.
118. Theiler M, Anderson CR (1975) The relative resistance of dengue-immune monkeys to yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg* 24: 115-117.
119. Izurieta RO, Macaluso M, Watts DM, Tesh RB, Guerra B, Cruz LM, Galwankar S, Vermund SH (2009) Anamnestic immune response to dengue and decreased severity of yellow Fever. *J Glob Infect Dis* 1: 111-116.
120. Guzman JR, Kron MA (1997) Threat of dengue haemorrhagic fever after yellow fever vaccination. *Lancet* 349: 1841.
121. Johnson BW, Kosoy O, Martin DA, Noga AJ, Russell BJ, Johnson AA, Petersen LR (2005) West Nile virus infection and serologic response among persons previously vaccinated against yellow fever and Japanese encephalitis viruses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 137-145.
122. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K (1981) Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ* 59: 895-900.
123. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'age-Stehr J (1998) Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol* 56: 159-167.
124. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, Moser JM, Mehta RS, Drake DR, III, Castro E, Akondy R, Rinfret A, Yassine-Diab B, Said EA, Chouikh Y, Cameron MJ, Clum R, Kelvin D, Somogyi R, Greller LD, Balderas RS, Wilkinson P, Pantaleo G, Tartaglia J, Haddad EK, Sekaly RP (2008) Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* 205: 3119-3131.
125. Fagraeus A, Ehrnst A, Klein E, Patarroyo M, Goldstein G (1982) Characterization of blood mononuclear cells reacting with K 562 cells after yellow fever vaccination. *Cell Immunol* 67: 37-48.

126. Shrestha S, Kyle JL, Robert BP, Harris E (2004) Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology* 319: 262-273.
127. Sooryanarain H, Ayachit V, Gore M (2012) Activated CD56(+) lymphocytes (NK+NKT) mediate immunomodulatory and anti-viral effects during Japanese encephalitis virus infection of dendritic cells in-vitro. *Virology* 432: 250-260.
128. Wang T, Welte T (2013) Role of natural killer and Gamma-delta T cells in West Nile virus infection. *Viruses* 5: 2298-2310.
129. LeCluyse EL, Bullock PL, Parkinson A, Hochman JH (1996) Cultured rat hepatocytes. *Pharm Biotechnol* 8: 121-159.
130. Morgan ET, Sewer MB, Iber H, Gonzalez FJ, Lee YH, Tukey RH, Okino S, Vu T, Chen YH, Sidhu JS, Omiecinski CJ (1998) Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 26: 1232-1240.
131. Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, Charles KA, Clarke SJ, Kacevska M, Liddle C, Richardson TA, Sharma R, Sinal CJ (2008) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug Metab Dispos* 36: 205-216.
132. Stamer UM, Wiese R, Stuber F, Wulf H, Meuser T (2005) Change in anaesthetic practice for Caesarean section in Germany. *Acta Anaesthesiol Scand* 49: 170-176.
133. Gao B, Jeong WI, Tian Z (2008) Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 47: 729-736.
134. Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C, Franchimont D, Louis H, Deviere J, Le Moine O (2006) Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology* 43: 989-1000.
135. Schwabe RF, Seki E, Brenner DA (2006) Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* 130: 1886-1900.
136. Szabo G, Dolganiuc A, Mandrekar P (2006) Pattern recognition receptors: a contemporary view on liver diseases. *Hepatology* 44: 287-298.
137. Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV (2005) Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol* 79: 7269-7272.
138. Thomas E, Gonzalez VD, Li Q, Modi AA, Chen W, Noureddin M, Rotman Y, Liang TJ (2012) HCV infection induces a unique hepatic innate immune response associated with robust production of type III interferons. *Gastroenterology* 142: 978-988.
139. Sumpter R, Jr., Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. (2005) Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 79: 2689-2699.
140. Doherty DG (2016) Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review. *J Autoimmun* 66: 60-75.

141. Jenne CN, Kubes P (2013) Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 14: 996-1006.
142. Steffan AM, Gendrault JL, McCuskey RS, McCuskey PA, Kirn A (1986) Phagocytosis, an unrecognized property of murine endothelial liver cells. *Hepatology* 6: 830-836.
143. Knolle PA, Limmer A (2003) Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Med Wkly* 133: 501-506.
144. Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA (2000) Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6: 1348-1354.
145. Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, Fazekas de St GB (2001) Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *J Immunol* 166: 5430-5438.
146. Gregory SH, Sagnimeni AJ, Wing EJ (1996) Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. *J Immunol* 157: 2514-2520.
147. Calne RY, Sells RA, Pena JR, Ashby BS, Herbertson BM, Millard PR, Davis DR (1969) Toleragenic effects of porcine liver allografts. *Br J Surg* 56: 692-693.
148. Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V (2004) Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 113: 963-972.
149. Peppas D, Micco L, Javaid A, Kennedy PT, Schurich A, Dunn C, Pallant C, Ellis G, Khanna P, Dusheiko G, Gilson RJ, Maini MK (2010) Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog* 6: e1001227.
150. Crispe IN (2014) Immune tolerance in liver disease. *Hepatology* 60: 2109-2117.
151. Breous E, Somanathan S, Vandenberghe LH, Wilson JM (2009) Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology* 50: 612-621.
152. Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P, Martin C, Van Rooijen N, Ochando JC, Randolph GJ, Luedde T, Ginhoux F, Kurts C, Trautwein C, Tacke F (2015) Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology* 62: 279-291.
153. Hochst B, Schildberg FA, Bottcher J, Metzger C, Huss S, Turler A, Overhaus M, Knoblich A, Schneider B, Pantelis D, Kurts C, Kalff JC, Knolle P, Diehl L (2012) Liver sinusoidal endothelial cells contribute to CD8 T cell tolerance toward circulating carcinoembryonic antigen in mice. *Hepatology* 56: 1924-1933.
154. Kruse N, Neumann K, Schrage A, Derkow K, Schott E, Erben U, Kuhl A, Loddenkemper C, Zeitz M, Hamann A, Klugewitz K (2009) Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25^{low} forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology* 50: 1904-1913.

155. Heymann F, Tacke F (2016) Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13: 88-110.
156. Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O, Nolan N, Hegarty J, O'Farrelly C (1998) Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J Hepatol* 28: 84-90.
157. Fogler WE, Volker K, Watanabe M, Wigginton JM, Roessler P, Brunda MJ, Ortaldo JR, Wilttrout RH (1998) Recruitment of hepatic NK cells by IL-12 is dependent on IFN-gamma and VCAM-1 and is rapidly down-regulated by a mechanism involving T cells and expression of Fas. *J Immunol* 161: 6014-6021.
158. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9: 503-510.
159. Kahraman A, Barreyro FJ, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Akazawa Y, Masuoka HC, Howe CL, Gores GJ (2008) TRAIL mediates liver injury by the innate immune system in the bile duct-ligated mouse. *Hepatology* 47: 1317-1330.
160. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S (2013) Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31: 227-258.
161. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Peguillet I, Premel V, Louis D, Milder M, Le Bourhis L, Soudais C, Treiner E, Lantz O (2011) Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 117: 1250-1259.
162. Le Bourhis L, Mburu YK, Lantz O (2013) MAIT cells, surveyors of a new class of antigen: development and functions. *Curr Opin Immunol* 25: 174-180.
163. Walker LJ, Kang YH, Smith MO, Tharmalingham H, Ramamurthy N, Fleming VM, Sahgal N, Leslie A, Oo Y, Geremia A, Scriba TJ, Hanekom WA, Lauer GM, Lantz O, Adams DH, Powrie F, Barnes E, Klenerman P (2012) Human MAIT and CD8alphaalpha cells develop from a pool of type-17 precommitted CD8+ T cells. *Blood* 119: 422-433.
164. Gold MC, Cerri S, Smyk-Pearson S, Cansler ME, Vogt TM, Delepine J, Winata E, Swarbrick GM, Chua WJ, Yu YY, Lantz O, Cook MS, Null MD, Jacoby DB, Harrieff MJ, Lewinsohn DA, Hansen TH, Lewinsohn DM (2010) Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol* 8: e1000407.
165. Kenna T, Golden-Mason L, Porcelli SA, Koezuka Y, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG (2003) NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *J Immunol* 171: 1775-1779.
166. Salio M, Puleston DJ, Mathan TS, Shepherd D, Stranks AJ, Adamopoulou E, Veerapen N, Besra GS, Hollander GA, Simon AK, Cerundolo V (2014) Essential role for autophagy during invariant NKT cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E5678-E5687.
167. Thomas SY, Hou R, Boyson JE, Means TK, Hess C, Olson DP, Strominger JL, Brenner MB, Gumperz JE, Wilson SB, Luster AD (2003) CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol* 171: 2571-2580.

168. Liu TY, Uemura Y, Suzuki M, Narita Y, Hirata S, Ohshima H, Ishihara O, Matsushita S (2008) Distinct subsets of human invariant NKT cells differentially regulate T helper responses via dendritic cells. *Eur J Immunol* 38: 1012-1023.
169. O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J, Feighery C, Porcelli SA, Doherty DG (2011) Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8alpha+ and CD4-CD8alpha- invariant natural killer T cells. *PLoS One* 6: e28648.
170. Bai L, Picard D, Anderson B, Chaudhary V, Luoma A, Jabri B, Adams EJ, Savage PB, Bendelac A (2012) The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vdelta1 TCR. *Eur J Immunol* 42: 2505-2510.
171. Uldrich AP, Le Nours J, Pellicci DG, Gherardin NA, McPherson KG, Lim RT, Patel O, Beddoe T, Gras S, Rossjohn J, Godfrey DI (2013) CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. *Nat Immunol* 14: 1137-1145.
172. Conroy MJ, Mac NR, Taylor M, O'Dea S, Mulcahy F, Norris S, Doherty DG (2015) Increased Frequencies of Circulating IFN-gamma-Producing Vdelta1(+) and Vdelta2(+) gammadelta T Cells in Patients with Asymptomatic Persistent Hepatitis B Virus Infection. *Viral Immunol* 28: 201-208.
173. Poles MA, Barsoum S, Yu W, Yu J, Sun P, Daly J, He T, Mehandru S, Talal A, Markowitz M, Hurley A, Ho D, Zhang L (2003) Human immunodeficiency virus type 1 induces persistent changes in mucosal and blood gammadelta T cells despite suppressive therapy. *J Virol* 77: 10456-10467.
174. Tyler CJ, Doherty DG, Moser B, Eberl M (2015) Human Vgamma9/Vdelta2 T cells: Innate adaptors of the immune system. *Cell Immunol* 296: 10-21.
175. Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2010) General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 640: 1-40.
176. Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV (1998) Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett* 431: 227-230.
177. Preiss S, Thompson A, Chen X, Rodgers S, Markovska V, Desmond P, Visvanathan K, Li K, Locarnini S, Revill P (2008) Characterization of the innate immune signalling pathways in hepatocyte cell lines. *J Viral Hepat* 15: 888-900.
178. Brolen G, Sivertsson L, Bjorquist P, Eriksson G, Ek M, Semb H, Johansson I, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M, Heins N (2010) Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *J Biotechnol* 145: 284-294.
179. Ek M, Soderdahl T, Kuppers-Munther B, Edsbacke J, Andersson TB, Bjorquist P, Cotgreave I, Jernstrom B, Ingelman-Sundberg M, Johansson I (2007) Expression of drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biochem Pharmacol* 74: 496-503.

180. Soderdahl T, Koppers-Munther B, Heins N, Edsbacke J, Bjorquist P, Cotgreave I, Jernstrom B (2007) Glutathione transferases in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 21: 929-937.
181. Szkolnicka D, Zhou W, Lucendo-Villarin B, Hay DC (2013) Pluripotent stem cell-derived hepatocytes: potential and challenges in pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53: 147-159.
182. Zhou X, Sun P, Lucendo-Villarin B, Angus AG, Szkolnicka D, Cameron K, Farnworth SL, Patel AH, Hay DC (2014) Modulating innate immunity improves hepatitis C virus infection and replication in stem cell-derived hepatocytes. *Stem Cell Reports* 3: 204-214.
183. Rashid ST, Corbineau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G, Huang-Doran I, Griffin J, Ahrlund-Richter L, Skepper J, Semple R, Weber A, Lomas DA, Vallier L (2010) Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 120: 3127-3136.
184. Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T (2011) Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One* 6: e21284.
185. Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N, Matsuura Y, Mizuguchi H, Yagi K (2011) Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 416: 119-124.
186. Messner S, Agarkova I, Moritz W, Kelm JM (2013) Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch Toxicol* 87: 209-213.
187. Langenbach R, Malick L, Tompa A, Kuszynski C, Freed H, Huberman E (1979) Maintenance of adult rat hepatocytes on C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res* 39: 3509-3514.
188. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M (1999) Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 13: 1883-1900.
189. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Bottger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho CS, Choi YJ, Craig RJ, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V, Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CE, Gomez-Lechon MJ, Groothuis GM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Haussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhutter HG, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin PB, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinyi J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EH, Stieger B, Stober R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Widera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough KM, Hengstler JG (2013) Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their

use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 87: 1315-1530.

190. Prestwich GD (2007) Simplifying the extracellular matrix for 3-D cell culture and tissue engineering: a pragmatic approach. *J Cell Biochem* 101: 1370-1383.
191. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK (2003) Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 83: 173-180.
192. Vellozzi C, Mitchell T, Miller E, Casey CG, Eidex RB, Hayes EB (2006) Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease (YEL-AVD) and corticosteroid therapy: eleven United States cases, 1996-2004. *Am J Trop Med Hyg* 75: 333-336.
193. Monath TP (2008) Treatment of yellow fever. *Antiviral Res* 78: 116-124.
194. Belsher JL, Gay P, Brinton M, DellaValla J, Ridenour R, Lanciotti R, Perelygin A, Zaki S, Paddock C, Querec T, Zhu T, Pulendran B, Eidex RB, Hayes E (2007) Fatal multiorgan failure due to yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease. *Vaccine* 25: 8480-8485.
195. Colebunders R, Mariage JL, Coche JC, Pirenne B, Kempinaire S, Hantson P, Van Gompel A, Niedrig M, Van Esbroeck M, Bailey R, Drosten C, Schmitz H (2002) A Belgian traveler who acquired yellow fever in the Gambia. *Clin Infect Dis* 35: e113-e116.
196. Julander JG, Ennis J, Turner J, Morrey JD (2011) Treatment of yellow fever virus with an adenovirus-vectored interferon, DEF201, in a hamster model. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 2067-2073.
197. Leyssen P, De Clercq E, Neyts J (2000) Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clin Microbiol Rev* 13: 67-82, table.
198. Pastorino B, Nougairède A, Wurtz N, Gould E, de L, X (2010) Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Res* 87: 281-294.
199. Leyssen P, De Clercq E, Neyts J (2006) The anti-yellow fever virus activity of ribavirin is independent of error-prone replication. *Mol Pharmacol* 69: 1461-1467.
200. Pacca CC, Severino AA, Mondini A, Rahal P, D'Avila SG, Cordeiro JA, Nogueira MC, Bronzoni RV, Nogueira ML (2009) RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo. *Virus Genes* 38: 224-231.
201. Theiler M, Smith HH (1937) THE EFFECT OF PROLONGED CULTIVATION IN VITRO UPON THE PATHOGENICITY OF YELLOW FEVER VIRUS. *J Exp Med* 65: 767-786.
202. Theiler M, Smith HH (1937) THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. *J Exp Med* 65: 787-800.
203. Monath TP (1996) Stability of yellow fever vaccine. *Dev Biol Stand* 87: 219-225.

204. dos Santos CN, Post PR, Carvalho R, Ferreira II, Rice CM, Galler R (1995) Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res* 35: 35-41.
205. Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM (1987) Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2019-2023.
206. Chambers TJ, Nickells M (2001) Neuroadapted yellow fever virus 17D: genetic and biological characterization of a highly mouse-neurovirulent virus and its infectious molecular clone. *J Virol* 75: 10912-10922.
207. Schlesinger JJ, Chapman S, Nestorowicz A, Rice CM, Ginocchio TE, Chambers TJ (1996) Replication of yellow fever virus in the mouse central nervous system: comparison of neuroadapted and non-neuroadapted virus and partial sequence analysis of the neuroadapted strain. *J Gen Virol* 77 (Pt 6): 1277-1285.
208. Monath TP (2002) Japanese encephalitis vaccines: current vaccines and future prospects. *Curr Top Microbiol Immunol* 267: 105-138.
209. Jennings AD, Gibson CA, Miller BR, Mathews JH, Mitchell CJ, Roehrig JT, Wood DJ, Taffs F, Sil BK, Whitby SN, . (1994) Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine-associated human encephalitis. *J Infect Dis* 169: 512-518.
210. Lee E, Lobigs M (2008) E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *J Virol* 82: 6024-6033.
211. Kummerer BM, Rice CM (2002) Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* 76: 4773-4784.
212. McArthur MA, Suderman MT, Mutebi JP, Xiao SY, Barrett AD (2003) Molecular characterization of a hamster viscerotropic strain of yellow fever virus. *J Virol* 77: 1462-1468.
213. McArthur MA, Xiao SY, Barrett AD (2005) Phenotypic and molecular characterization of a non-lethal, hamster-viscerotropic strain of yellow fever virus. *Virus Res* 110: 65-71.
214. Dunster LM, Wang H, Ryman KD, Miller BR, Watowich SJ, Minor PD, Barrett AD (1999) Molecular and biological changes associated with HeLa cell attenuation of wild-type yellow fever virus. *Virology* 261: 309-318.
215. McElroy KL, Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, Higgs S (2005) Characterization of an infectious clone of the wild-type yellow fever virus Asibi strain that is able to infect and disseminate in mosquitoes. *J Gen Virol* 86: 1747-1751.
216. McElroy KL, Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, Higgs S (2006) Role of the yellow fever virus structural protein genes in viral dissemination from the *Aedes aegypti* mosquito midgut. *J Gen Virol* 87: 2993-3001.
217. Barrett AD, Gould EA (1986) Comparison of neurovirulence of different strains of yellow fever virus in mice. *J Gen Virol* 67 (Pt 4): 631-637.

218. Erickson AK, Pfeiffer JK (2015) Spectrum of disease outcomes in mice infected with YFV-17D. *J Gen Virol* 96: 1328-1339.
219. Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, Klimstra WB, Ryman KD (2009) A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog* 5: e1000614.
220. Thibodeaux BA, Garbino NC, Liss NM, Piper J, Blair CD, Roehrig JT (2012) A small animal peripheral challenge model of yellow fever using interferon-receptor deficient mice and the 17D-204 vaccine strain. *Vaccine* 30: 3180-3187.
221. Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Kirn A, Deubel V (1998) Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line. *J Infect Dis* 178: 1270-1278.
222. Monath TP (2005) Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines* 4: 553-574.
223. Ferguson M, Heath A (2004) Collaborative study to assess the suitability of a candidate International Standard for yellow fever vaccine. *Biologicals* 32: 195-205.
224. Cetron MS, Marfin AA, Julian KG, Gubler DJ, Sharp DJ, Barwick RS, Weld LH, Chen R, Clover RD, Deseda-Tous J, Marchessault V, Offit PA, Monath TP (2002) Yellow fever vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2002. *MMWR Recomm Rep* 51: 1-11.
225. Monath TP, Cetron MS, McCarthy K, Nichols R, Archambault WT, Weld L, Bedford P (2005) Yellow fever 17D vaccine safety and immunogenicity in the elderly. *Hum Vaccin* 1: 207-214.
226. Belmusto-Worn VE, Sanchez JL, McCarthy K, Nichols R, Bautista CT, Magill AJ, Pastor-Cauna G, Echevarria C, Laguna-Torres VA, Samame BK, Baldeon ME, Burans JP, Olson JG, Bedford P, Kitchener S, Monath TP (2005) Randomized, double-blind, phase III, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety, and tolerability of two yellow fever 17D vaccines (Arlvax and YF-VAX) in healthy infants and children in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 72: 189-197.
227. Nasidi A, Monath TP, Vandenberg J, Tomori O, Calisher CH, Hurtgen X, Munube GR, Sorungbe AO, Okafor GC, Wali S (1993) Yellow fever vaccination and pregnancy: a four-year prospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 337-339.
228. Kengsakul K, Sathirapongsasuti K, Punyagupta S (2002) Fatal myeloencephalitis following yellow fever vaccination in a case with HIV infection. *J Med Assoc Thai* 85: 131-134.
229. Pistone T, Verdieri CH, Receveur MC, Ezzedine K, Lafon ME, Malvy D (2010) Immunogenicity and tolerability of yellow fever vaccination in 23 French HIV-infected patients. *Curr HIV Res* 8: 461-466.
230. Lefevre A, Marianneau P, Deubel V (2004) Current Assessment of Yellow Fever and Yellow Fever Vaccine. *Curr Infect Dis Rep* 6: 96-104.

231. 1966) Fatal viral encephalitis following 17D yellow fever vaccine inoculation. Report of a case in a 3-year-old child. *JAMA* 198: 671-672.
232. McMahon AW, Eidex RB, Marfin AA, Russell M, Sejvar JJ, Markoff L, Hayes EB, Chen RT, Ball R, Braun MM, Cetron M (2007) Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of 15 cases. *Vaccine* 25: 1727-1734.
233. Miravalle A, Biller J, Silva E, Conneely M, O'Keefe P (2009) Acute disseminated encephalomyelitis: yellow fever vaccination. *Arq Neuropsiquiatr* 67: 710-711.
234. Whittembury A, Ramirez G, Hernandez H, Roper AM, Waterman S, Ticona M, Brinton M, Uchuya J, Gershman M, Toledo W, Staples E, Campos C, Martinez M, Chang GJ, Cabezas C, Lanciotti R, Zaki S, Montgomery JM, Monath T, Hayes E (2009) Viscerotrophic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine* 27: 5974-5981.
235. Barban V, Girerd Y, Aguirre M, Gulia S, Petiard F, Riou P, Barrere B, Lang J (2007) High stability of yellow fever 17D-204 vaccine: a 12-year retrospective analysis of large-scale production. *Vaccine* 25: 2941-2950.
236. Monath TP (2010) Suspected yellow fever vaccine-associated viscerotropic adverse events (1973 and 1978), United States. *Am J Trop Med Hyg* 82: 919-921.
237. Muyanja E, Ssemaganda A, Ngauv P, Cubas R, Perrin H, Srinivasan D, Canderan G, Lawson B, Kopycinski J, Graham AS, Rowe DK, Smith MJ, Isern S, Michael S, Silvestri G, Vanderford TH, Castro E, Pantaleo G, Singer J, Gillmour J, Kiwanuka N, Nanvubya A, Schmidt C, Birungi J, Cox J, Haddad EK, Kaleebu P, Fast P, Sekaly RP, Trautmann L, Gaucher D (2014) Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. *J Clin Invest* 124: 3147-3158.
238. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, Quyyumi F, Garg S, Altman JD, Del Rio C, Keyserling HL, Ploss A, Rice CM, Orenstein WA, Mulligan MJ, Ahmed R (2009) The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 183: 7919-7930.
239. Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, Akira S, Ahmed R, Pulendran B (2006) Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med* 203: 413-424.
240. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, Pirani A, Gernert K, Deng J, Marzolf B, Kennedy K, Wu H, Bennouna S, Oluoch H, Miller J, Vencio RZ, Mulligan M, Aderem A, Ahmed R, Pulendran B (2009) Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 10: 116-125.
241. Martins RM, Galler R, Freire MS, Camacho LA, de Lourdes S Maia, Homma A (2007) Yellow fever vaccination: some thoughts on how much is enough [*Vaccine* 23 (2005) 3908-3914]. *Vaccine* 25: 10-11.
242. Pulendran B, Maddur MS (2015) Innate immune sensing and response to influenza. *Curr Top Microbiol Immunol* 386: 23-71.

243. Pulendran B, Oh JZ, Nakaya HI, Ravindran R, Kazmin DA (2013) Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. *Immunol Rev* 255: 243-255.
244. Bonnevie-Nielsen V, Heron I, Monath TP, Calisher CH (1995) Lymphocytic 2',5'-oligoadenylate synthetase activity increases prior to the appearance of neutralizing antibodies and immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies after primary and secondary immunization with yellow fever vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 302-306.
245. Arroyo JI, Apperson SA, Cropp CB, Marafino BJ, Jr., Monath TP, Tesh RB, Shope RE, Garcia-Blanco MA (1988) Effect of human gamma interferon on yellow fever virus infection. *Am J Trop Med Hyg* 38: 647-650.
246. Neves PC, Santos JR, Tubarao LN, Bonaldo MC, Galler R (2013) Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. *PLoS One* 8: e81953.
247. Cao W, Manicassamy S, Tang H, Kasturi SP, Pirani A, Murthy N, Pulendran B (2008) Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol* 9: 1157-1164.
248. Mehlhop E, Diamond MS (2006) Protective immune responses against West Nile virus are primed by distinct complement activation pathways. *J Exp Med* 203: 1371-1381.
249. Lefevre A, Contamin H, Decelle T, Fournier C, Lang J, Deubel V, Marianneau P (2006) Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection. *Microbes Infect* 8: 1530-1538.
250. Brandler S, Brown N, Ermak TH, Mitchell F, Parsons M, Zhang Z, Lang J, Monath TP, Guirakhoo F (2005) Replication of chimeric yellow fever virus-dengue serotype 1-4 virus vaccine strains in dendritic and hepatic cells. *Am J Trop Med Hyg* 72: 74-81.
251. Liprandi F, Walder R (1983) Replication of virulent and attenuated strains of yellow fever virus in human monocytes and macrophage-like cells (U937). *Arch Virol* 76: 51-61.
252. Barbazuk WB, Emrich SJ, Chen HD, Li L, Schnable PS (2007) SNP discovery via 454 transcriptome sequencing. *Plant J* 51: 910-918.
253. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7: 562-578.
254. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y (2008) RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res* 18: 1509-1517.
255. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15: 550.
256. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5: 621-628.

257. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28: 511-515.
258. Risso D, Ngai J, Speed TP, Dudoit S (2014) Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nat Biotechnol* 32: 896-902.
259. Gagnon-Bartsch JA, Speed TP (2012) Using control genes to correct for unwanted variation in microarray data. *Biostatistics* 13: 539-552.
260. Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, Guernec G, Jagla B, Jouneau L, Laloe D, Le Gall C, Schaeffer B, Le Crom S, Guedj M, Jaffrezic F (2013) A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Brief Bioinform* 14: 671-683.
261. Li P, Piao Y, Shon HS, Ryu KH (2015) Comparing the normalization methods for the differential analysis of Illumina high-throughput RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* 16: 347.
262. Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ (1989) Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol* 1: 285-296.
263. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7: 3.
264. Baker SC, Bauer SR, Beyer RP, Brenton JD, Bromley B, Burrill J, Causton H, Conley MP, Elespuru R, Fero M, Foy C, Fuscoe J, Gao X, Gerhold DL, Gilles P, Goodsaid F, Guo X, Hackett J, Hockett RD, Ikononi P, Irizarry RA, Kawasaki ES, Kayser-Kranich T, Kerr K, Kiser G, Koch WH, Lee KY, Liu C, Liu ZL, Lucas A, Manohar CF, Miyada G, Modrusan Z, Parkes H, Puri RK, Reid L, Ryder TB, Salit M, Samaha RR, Scherf U, Sendera TJ, Setterquist RA, Shi L, Shippy R, Soriano JV, Wagar EA, Warrington JA, Williams M, Wilmer F, Wilson M, Wolber PK, Wu X, Zadro R (2005) The External RNA Controls Consortium: a progress report. *Nat Methods* 2: 731-734.
265. Jiang L, Schlesinger F, Davis CA, Zhang Y, Li R, Salit M, Gingeras TR, Oliver B (2011) Synthetic spike-in standards for RNA-seq experiments. *Genome Res* 21: 1543-1551.
266. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105-1111.
267. Langmead B (2010) Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 11: Unit.
268. Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31: 166-169.
269. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.

270. Benjamini Y, Hochberg Y (Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.
271. Maza E, Frasse P, Senin P, Bouzayen M, Zouine M (2013) Comparison of normalization methods for differential gene expression analysis in RNA-Seq experiments: A matter of relative size of studied transcriptomes. *Commun Integr Biol* 6: e25849.
272. Munro SA, Lund SP, Pine PS, Binder H, Clevert DA, Conesa A, Dopazo J, Fasold M, Hochreiter S, Hong H, Jafari N, Kreil DP, Labaj PP, Li S, Liao Y, Lin SM, Meehan J, Mason CE, Santoyo-Lopez J, Setterquist RA, Shi L, Shi W, Smyth GK, Stralis-Pavese N, Su Z, Tong W, Wang C, Wang J, Xu J, Ye Z, Yang Y, Yu Y, Salit M (2014) Assessing technical performance in differential gene expression experiments with external spike-in RNA control ratio mixtures. *Nat Commun* 5: 5125.
273. Gentile DM, Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK, Back DJ (1996) Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 105-112.
274. Tomlinson ES, Lewis DF, Maggs JL, Kroemer HK, Park BK, Back DJ (1997) In vitro metabolism of dexamethasone (DEX) in human liver and kidney: the involvement of CYP3A4 and CYP17 (17,20 LYASE) and molecular modelling studies. *Biochem Pharmacol* 54: 605-611.
275. Ramesh G, Meisner OC, Philipp MT (2015) Anti-inflammatory effects of dexamethasone and meloxicam on *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation in neuronal cultures of dorsal root ganglia and myelinating cells of the peripheral nervous system. *J Neuroinflammation* 12: 240.
276. Monath TP, Vasconcelos PF (2015) Yellow fever. *J Clin Virol* 64: 160-173.
277. Engelmann F, Josset L, Girke T, Park B, Barron A, Dewane J, Hammarlund E, Lewis A, Axthelm MK, Slifka MK, Messaoudi I (2014) Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3295.
278. Monath TP, Barrett AD (2003) Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv Virus Res* 60: 343-395.
279. Quaresma JA, Barros VL, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, Costa Vasconcelos PF, Andrade Junior HF, Duarte MI (2006) Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus Res* 116: 91-97.
280. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT (2007) Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem Biol Interact* 168: 30-50.
281. Hewitt NJ, Lechon MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, Kenna JG, Gustavsson L, Lohmann C, Skonberg C, Guillouzo A, Tuschl G, Li AP, LeCluyse E, Groothuis GM, Hengstler JG (2007) Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39: 159-234.

282. LeCluyse EL, Alexandre E (2010) Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol* 640: 57-82.
283. Shulman M, Nahmias Y (2013) Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes. *Methods Mol Biol* 945: 287-302.
284. Kim SY, Park C, Kim HJ, Park J, Hwang J, Kim JI, Choi MG, Kim S, Kim KM, Kang MS (2015) Deregulation of immune response genes in patients with Epstein-Barr virus-associated gastric cancer and outcomes. *Gastroenterology* 148: 137-147.
285. Park SJ, Kumar M, Kwon HI, Seong RK, Han K, Song JM, Kim CJ, Choi YK, Shin OS (2015) Dynamic changes in host gene expression associated with H5N8 avian influenza virus infection in mice. *Sci Rep* 5: 16512.
286. Wu SJ, Lee EM, Putvatana R, Shurtliff RN, Porter KR, Suharyono W, Watts DM, King CC, Murphy GS, Hayes CG, Romano JW (2001) Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol* 39: 2794-2798.
287. Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, Barban V (2008) Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J Virol Methods* 151: 40-46.
288. Schoggins JW, Rice CM (2011) Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 1: 519-525.
289. Honda K, Taniguchi T (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6: 644-658.
290. Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.
291. Grunvogel O, Esser-Nobis K, Reustle A, Schult P, Muller B, Metz P, Trippler M, Windisch MP, Frese M, Binder M, Fackler O, Bartenschlager R, Ruggieri A, Lohmann V (2015) DDX60L Is an Interferon-Stimulated Gene Product Restricting Hepatitis C Virus Replication in Cell Culture. *J Virol* 89: 10548-10568.
292. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, Cao-Lormeau VM, Choumet V, Briant L, Despres P, Amara A, Yssel H, Misse D (2015) Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* 89: 8880-8896.
293. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A (2012) The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* 12: 544-557.
294. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU (2007) TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446: 916-920.
295. Herrmann J, Lerman LO, Lerman A (2007) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res* 100: 1276-1291.

296. Mevissen TE, Hospenthal MK, Geurink PP, Elliott PR, Akutsu M, Arnaudo N, Ekkebus R, Kulathu Y, Wauer T, El Oualid F, Freund SM, Ovaa H, Komander D (2013) OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis. *Cell* 154: 169-184.
297. Huang Q, Zhan L, Cao H, Li J, Lyu Y, Guo X, Zhang J, Ji L, Ren T, An J, Liu B, Nie Y, Xing J (2016) Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NFKB and TP53 pathways. *Autophagy* 12: 999-1014.
298. Burke JE, Dennis EA (2009) Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 50 Suppl: S237-S242.
299. Ghoshal K, Majumder S, Zhu Q, Hunzeker J, Datta J, Shah M, Sheridan JF, Jacob ST (2001) Influenza virus infection induces metallothionein gene expression in the mouse liver and lung by overlapping but distinct molecular mechanisms. *Mol Cell Biol* 21: 8301-8317.
300. Head JL, Lawrence BP (2009) The aryl hydrocarbon receptor is a modulator of anti-viral immunity. *Biochem Pharmacol* 77: 642-653.
301. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM (2011) A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472: 481-485.
302. Cho H, Shrestha B, Sen GC, Diamond MS (2013) A role for Ifit2 in restricting West Nile virus infection in the brain. *J Virol* 87: 8363-8371.
303. Ip PP, Liao F (2010) Resistance to dengue virus infection in mice is potentiated by CXCL10 and is independent of CXCL10-mediated leukocyte recruitment. *J Immunol* 184: 5705-5714.
304. Bardina SV, Michlmayr D, Hoffman KW, Obara CJ, Sum J, Charo IF, Lu W, Pletnev AG, Lim JK (2015) Differential Roles of Chemokines CCL2 and CCL7 in Monocytosis and Leukocyte Migration during West Nile Virus Infection. *J Immunol* 195: 4306-4318.
305. Zhang S, Saha B, Kodys K, Szabo G (2013) IFN-gamma production by human natural killer cells in response to HCV-infected hepatoma cells is dependent on accessory cells. *J Hepatol* 59: 442-449.
306. Marquardt N, Ivarsson MA, Blom K, Gonzalez VD, Braun M, Falconer K, Gustafsson R, Fogdell-Hahn A, Sandberg JK, Michaelsson J (2015) The Human NK Cell Response to Yellow Fever Virus 17D Is Primarily Governed by NK Cell Differentiation Independently of NK Cell Education. *J Immunol* 195: 3262-3272.
307. Sagulenko V, Thygesen SJ, Sester DP, Idris A, Cridland JA, Vajjhala PR, Roberts TL, Schroder K, Vince JE, Hill JM, Silke J, Stacey KJ (2013) AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ* 20: 1149-1160.
308. Jorgensen I, Miao EA (2015) Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev* 265: 130-142.

309. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE (2014) NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 59: 898-910.
310. Lin W, Zhu C, Hong J, Zhao L, Jilg N, Fusco DN, Schaefer EA, Brisac C, Liu X, Peng LF, Xu Q, Chung RT (2015) The spliceosome factor SART1 exerts its anti-HCV action through mRNA splicing. *J Hepatol* 62: 1024-1032.
311. Kim SJ, Syed GH, Khan M, Chiu WW, Sohail MA, Gish RG, Siddiqui A (2014) Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6413-6418.
312. Park SY, Choi HK, Choi Y, Kwak S, Choi KC, Yoon HG (2015) Deubiquitinase OTUD5 mediates the sequential activation of PDCD5 and p53 in response to genotoxic stress. *Cancer Lett* 357: 419-427.
313. Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Chazal M, Hafirassou ML, Dejarnac O, Zamborlini A, Despres P, Sauvonnnet N, Arenzana-Seisdedos F, Jouvenet N, Amara A (2016) Vaccine and Wild-Type Strains of Yellow Fever Virus Engage Distinct Entry Mechanisms and Differentially Stimulate Antiviral Immune Responses. *MBio* 7.
314. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife* 1: e00049.
315. Akhrymuk I, Frolov I, Frolova EI (2016) Both RIG-I and MDA5 detect alphavirus replication in concentration-dependent mode. *Virology* 487: 230-241.
316. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. (2008) Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454: 523-527.
317. Saito T, Gale M, Jr. (2008) Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. *J Exp Med* 205: 1523-1527.
318. Yuzawa E, Imaizumi T, Matsumiya T, Yoshida H, Fukuhara R, Kimura H, Fukui A, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Fujii S, Mizunuma H, Satoh K (2008) Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interferon-gamma and regulates CXCL11 expression in HeLa cells. *Life Sci* 82: 670-675.
319. Kang DC, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB (2002) mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 637-642.
320. Crotta S, Davidson S, Mahlakoiv T, Desmet CJ, Buckwalter MR, Albert ML, Staeheli P, Wack A (2013) Type I and type III interferons drive redundant amplification loops to induce a transcriptional signature in influenza-infected airway epithelia. *PLoS Pathog* 9: e1003773.
321. Cui J, Zhu L, Xia X, Wang HY, Legras X, Hong J, Ji J, Shen P, Zheng S, Chen ZJ, Wang RF (2010) NLR5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways. *Cell* 141: 483-496.

322. Vilcek J (2003) Novel interferons. *Nat Immunol* 4: 8-9.
323. Horner SM, Gale M, Jr. (2013) Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat Med* 19: 879-888.
324. Shin EC, Sung PS, Park SH (2016) Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat Rev Immunol* 16: 509-523.
325. Dellgren C, Gad HH, Hamming OJ, Melchjorsen J, Hartmann R (2009) Human interferon-lambda3 is a potent member of the type III interferon family. *Genes Immun* 10: 125-131.
326. Bolen CR, Ding S, Robek MD, Kleinstein SH (2014) Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology* 59: 1262-1272.
327. Diamond MS, Gale M, Jr. (2012) Cell-intrinsic innate immune control of West Nile virus infection. *Trends Immunol* 33: 522-530.
328. Samuel MA, Whitby K, Keller BC, Marri A, Barchet W, Williams BR, Silverman RH, Gale M, Jr., Diamond MS (2006) PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. *J Virol* 80: 7009-7019.
329. Ohmer M, Weber A, Sutter G, Ehrhardt K, Zimmermann A, Hacker G (2016) Anti-apoptotic Bcl-XL but not Mcl-1 contributes to protection against virus-induced apoptosis. *Cell Death Dis* 7: e2340.
330. Ullio C, Brunk UT, Urani C, Melchiorretto P, Bonelli G, Baccino FM, Autelli R (2015) Autophagy of metallothioneins prevents TNF-induced oxidative stress and toxicity in hepatoma cells. *Autophagy* 11: 2184-2198.
331. Mai S, Muster B, Bereiter-Hahn J, Jendrach M (2012) Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan. *Autophagy* 8: 47-62.
332. Loureiro J, Ploegh HL (2006) Antigen presentation and the ubiquitin-proteasome system in host-pathogen interactions. *Adv Immunol* 92: 225-305.
333. Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Bonazzi M, Cossart P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A (2011) Appraising the roles of CBLL1 and the ubiquitin/proteasome system for flavivirus entry and replication. *J Virol* 85: 2980-2989.
334. Town T, Bai F, Wang T, Kaplan AT, Qian F, Montgomery RR, Anderson JF, Flavell RA, Fikrig E (2009) Toll-like receptor 7 mitigates lethal West Nile encephalitis via interleukin 23-dependent immune cell infiltration and homing. *Immunity* 30: 242-253.
335. Reeves RK, Li H, Jost S, Blass E, Li H, Schafer JL, Varner V, Manickam C, Eslamizar L, Altfeld M, von Andrian UH, Barouch DH (2015) Antigen-specific NK cell memory in rhesus macaques. *Nat Immunol* 16: 927-932.

336. Kirby BJ, Collier AC, Kharasch ED, Dixit V, Desai P, Whittington D, Thummel KE, Unadkat JD (2011) Complex drug interactions of HIV protease inhibitors 2: in vivo induction and in vitro to in vivo correlation of induction of cytochrome P450 1A2, 2B6, and 2C9 by ritonavir or nelfinavir. *Drug Metab Dispos* 39: 2329-2337.
337. Murrow L, Debnath J (2013) Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol* 8: 105-137.
338. Jones EA, Mullen KD (2012) Theories of the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Clin Liver Dis* 16: 7-26.
339. Cosgrove BD, Alexopoulos LG, Saez-Rodriguez J, Griffith LG, Lauffenburger DA (2009) A multipathway phosphoproteomic signaling network model of idiosyncratic drug- and inflammatory cytokine-induced toxicity in human hepatocytes. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009: 5452-5455.
340. Cosgrove BD, Alexopoulos LG, Hang TC, Hendriks BS, Sorger PK, Griffith LG, Lauffenburger DA (2010) Cytokine-associated drug toxicity in human hepatocytes is associated with signaling network dysregulation. *Mol Biosyst* 6: 1195-1206.
341. Zhao H, Jaffer T, Eguchi S, Wang Z, Linkermann A, Ma D (2015) Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell Death Dis* 6: e1975.
342. Bleriot C, Dupuis T, Jouvion G, Eberl G, Disson O, Lecuit M (2015) Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* 42: 145-158.
343. Lim EJ, El Khobar K, Chin R, Earnest-Silveira L, Angus PW, Bock CT, Nachbur U, Silke J, Torresi J (2014) Hepatitis C virus-induced hepatocyte cell death and protection by inhibition of apoptosis. *J Gen Virol* 95: 2204-2215.
344. Conway MJ, Watson AM, Colpitts TM, Dragovic SM, Li Z, Wang P, Feitosa F, Shepherd DT, Ryman KD, Klimstra WB, Anderson JF, Fikrig E (2014) Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host. *J Virol* 88: 164-175.
345. Uchida Y, Hiruta N, Yamanoi D, Shimoyama E, Maezawa Y, Uchida Y (2014) Imaging of native high-density lipoprotein in human coronary plaques by color fluorescent angioscopy. *Circ J* 78: 1667-1675.

Résumé de la thèse

La fièvre jaune est une pathologie virale humaine causée par un flavivirus, le virus de la fièvre jaune et transmise par des vecteurs arthropodes. Les formes sévères, parfois mortelles, sont caractérisées par une atteinte systémique aigüe qui affecte le foie. Bien que la vaccination existe depuis près de 80 ans, des recensements réguliers d'épidémies sont encore faits. Les vaccins à base d'une souche vivante atténuée YF 17D présentent d'excellents taux de séroconversion et sont notamment caractérisés par une forte diminution de l'hépatotropisme. Néanmoins les mécanismes associés à la pathogénèse hépatique sont encore mal compris et pourraient être une aide aux développements vaccinaux contre d'autres flavivirus ou virus hépatiques. L'étude développée ici s'est inscrite dans la problématique de la représentativité des modèles cellulaires hépatiques utilisés. Afin de répondre aux pertes métaboliques et immunitaires reportées dans plusieurs modèles, nous nous sommes orientés vers des modèles organotypiques associant plusieurs populations cellulaires hépatiques et un microenvironnement caractéristique. Les modulations induites par les souches vaccinales ou sauvages du virus de la fièvre jaune ont été évaluées par une approche transcriptomique globale utilisant la technologie RNASeq et des méthodes d'analyse définies. Nos résultats montrent une plus forte permissivité des modèles cellulaires à la souche atténuée YF 17D par rapport à la souche sauvage YF Asibi. Cette observation est associée pour la souche atténuée à l'établissement précoce d'une réponse antivirale complète impliquant une détection rapide des formes répliquatives du virus, la mise en place des réponses aux IFNs de type I et de type III, la clairance virale et un contrôle des métabolismes cellulaires et hépatiques. De son côté la souche sauvage présente un délai important dans l'établissement de ces réponses amenant à de potentiels mécanismes alternatifs de la clairance virale et de dérégulations métaboliques. Ces données mettent en exergue les interactions étroites qui existent entre les systèmes immunitaires et métaboliques au niveau du foie. Nous suggérons que la forte réponse antivirale induite par la souche atténuée pourrait contribuer à la rupture de la tolérance hépatique et à l'efficacité *in vivo* de la souche vaccinale. En outre, la cinétique des réponses immunitaires, en combinaison avec la charge virale, peuvent déterminer l'équilibre entre la récupération et l'immunopathologie après l'infection par le virus sauvage.

Summary

Yellow fever is a viral human disease caused by the yellow fever virus and transmitted by arthropod vectors. Yellow fever (YF) disease is characterized in humans by a strong liver involvement and can be efficiently prevented by vaccination with YF attenuated strain 17D. However, mechanisms involved in liver pathogenesis or infection control are still unclear. Recent improvements of hepatic *in vitro* models are helpful to reconsider liver complexity and microenvironment in viral studies. In this work, we used new organotypic liver models including both primary hepatocytes and Kupffer cells in a scaffold free 3D context. Regulations induced by the vaccine and wild strains of yellow fever virus were evaluated by a global transcriptomic approach using RNAseq technology and defined analysis methods. Our results show a greater permissiveness of the cellular models to the attenuated strain YF 17D compared to the wild strain YF Asibi. YF17D infection resulted in transcriptional activation of a full antiviral profile, including double-stranded RNA sensing, type I and type III interferons (IFNs), pro- and anti-inflammation factors, as well as apoptosis-related factors. Three major, early upstream effectors (IRF7, STAT1 and EIF2AK2), previously identified in 17D-vaccinated subjects, were also detected. In contrast, YF Asibi elicited an incomplete profile, resulting from significantly lower transcription of major IRFs. Transcription of apoptosis-related markers was not detected but several genes related to cell recovery and cell regeneration were specifically regulated. Additional escaping mechanisms are suggested. We suggest that low replication of YF Asibi may be part of the viral strategy to escape the immune response while continuing to accumulate into the cells. Interference with liver regeneration functions may reflect unsuccessful attempts of the liver to eliminate the virus through the detoxification pathway, leading to massive activation of danger signals and pathogenesis.