



HAL
open science

Comparaison de la pathogénèse hépatique des virus fièvre jaune et dengue dans un modèle d'hépatocytes humains dérivés de cellules souches

Marion Genevois

► **To cite this version:**

Marion Genevois. Comparaison de la pathogénèse hépatique des virus fièvre jaune et dengue dans un modèle d'hépatocytes humains dérivés de cellules souches. Virologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT: 2019LYSE1088 . tel-02316992

HAL Id: tel-02316992

<https://theses.hal.science/tel-02316992>

Submitted on 15 Oct 2019

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 : 2019LYSE1088



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED-340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Infectiologie
Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 02/07/2019, par :
Marion Genevois

Comparaison de la pathogenèse hépatique des virus fièvre jaune et dengue dans un modèle d'hépatocytes humains dérivés de cellules souches

Devant le jury composé de :

Professeur Renaud Mahieux, ENS Lyon, Président du Jury
Professeur Jean-Claude Guillemot, Université Aix-Marseille, Rapporteur
Docteur Nolwenn Jouvenet, Institut Pasteur Paris, Rapporteur
Docteure Cécile Challier, CEVA Santé Animale, Examinatrice
Professeure Patricia Doublet, UCB Lyon1, Examinatrice
Docteur Patrick Lécine, BIOASTER Lyon, Directeur
Docteure Véronique Barban, Sanofi Pasteur Marcy l'Etoile, Co-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 LEURY

M. le Professeur Hamda BEN ADID

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

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux
Faculté d'Odontologie

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Sommaire

Liste des figures	11
Liste des tables	13
Abréviations	15
Remerciements	17
Introduction	21
Partie 1 : Les Flavivirus Dengue et Fièvre Jaune	23
1. Classification.....	23
2. Organisation du génome	25
3. Cycle viral	29
4. Epidémiologie.....	35
5. Pathogenèse de l'infection par les flavivirus	39
6. Rôle de l'immunité dans la pathogenèse induite par les flavivirus.....	41
7. Traitements et approches vaccinales	55
Partie 2 : L'atteinte hépatique dans le cadre d'une infection par DENV et par YFV	61
1. Le foie	61
2. Mise en évidence de l'atteinte hépatique chez des patients infectés par DENV et YFV : données cliniques et histologiques	67
3. Mise en évidence de l'atteinte hépatique dans le cas d'animaux infectés par DENV et YFV : données cliniques et histologiques	77
4. Mise en évidence de l'atteinte hépatique dans le cas de cellules infectées par DENV et YFV : données <i>in vitro</i>	83
Objectifs	91
Matériels et Méthodes	97
1. Virus et modèles cellulaires	99
2. Infection	101
3. Titrages viraux	101
4. Immunofluorescence.....	101
5. Extraction ARN cellulaires.....	103
6. Quantification expression de gènes	105
Résultats et Discussion	109
Etude I : Comparaison de l'infection de DENV et YFV dans un modèle d'hépatocytes dérivés de cellules souches pluripotentes cultivés en monocouche.....	111
1. Objectifs	111
2. Résultats et discussion – partie 1	111

3. Points clés de la partie 1	135
4. Résultats – discussion partie 2 : Evaluation de l’impact des protéines non structurales et structurales dans l’infection de DENV sur iHeps.....	135
5. Conclusion étude I	137
Etude II : Evaluation de l’infection des virus dengue et fièvre jaune dans un modèle d’hépatocytes dérivés de cellules souches humaines cultivés en trois dimensions.....	139
1. Introduction.....	139
2. Résultats	141
3. Discussion.....	145
Etude III : Etude des réponses cellulaires induites suite aux infections de DENV et de YFV dans un modèle d’hépatocytes dérivés de cellules souches pluripotentes	149
1. Objectifs	149
2. Résultats et Discussion	151
3. Conclusion	161
Conclusion et Perspectives	163
1. Conclusion et Discussion	165
2. Perspectives	169
Références bibliographiques	177
Résumé :	204

Liste des figures

Figure 1: Classification de la famille des Flaviviridae.....	22
Figure 2 : Arbre phylogénétique basé sur la séquence complète du génome de flavivirus	24
Figure 3 :Organisation du génome et de la polyprotéine des flavivirus	26
Figure 4: Cycle de réplication cellulaire des flavivirus.....	28
Figure 5 : Représentation schématique d'une particule de flavivirus.	32
Figure 6 : Cycle de transmission de YFV , DENV et ZIKV	34
Figure 7: Distribution géographique des deux pathogènes majeurs du genre <i>Flavivirus</i>	36
Figure 8 : Route de progression des flavivirus dans l'organisme	38
Figure 9: Voies de signalisation de l'immunité innée.....	42
Figure 10: Détournement des réponses immunitaires innées par les protéines non structurales	48
Figure 11: Conséquence d'une infection secondaire	52
Figure 12: Construction du vaccin CYD-TDV Dengvaxia®	58
Figure 13 : Architecture du foie	60
Figure 14 : Hépatocytes et réponses immunitaires	64
Figure 15 : Techniques permettant la formation de sphéroïdes hépatiques.....	84
Figure 16 : Stratégie d'utilisation des souches chimériques YFV17D/DENV.....	92
Figure 17: Réplication et internalisation de YFV, 17D, DENV et YFV17D/DENV dans les iHeps. .	134
Figure 18 : Evaluation de la maturation de sphéroïdes hépatiques de différentes tailles	140
Figure 19 : Infection de sphéroïdes hépatiques de différentes tailles par la souche vaccinale 17D.....	142
Figure 20: Evaluation de l'infection de sphéroïdes de iHeps de 3000 cellules par YFV, DENV et les chimères 17D/DENV	144
Figure 21: Analyse globale des profils transcriptomiques.....	150
Figure 22 : Organisation sous forme de cluster hiérarchique des profils d'expression des réponses cellulaires induites par l'infection de YFV et DENV1-4	152
Figure 23 : Dérégulation des réponses immunitaires induites suite aux infections des 4 sérotypes de DENV et de YFV dans les iHeps.	154
Figure 24 : Profils d'expression de gènes suspectés comme ayant un rôle dans les pathologies de DENV et YFV.....	156
Figure 25 : Comparaison des DEGs induits par 17D/DENV et ceux induits par ses souches parentales	158

Liste des tables

Tableau 1 : Co-récepteurs d'entrée des flavivirus.....	30
Tableau 2 : Symptômes induits par les flavivirus	40
Tableau 3 : Evaluation de l'atteinte hépatique suite à une inoculation de YFV dans différents modèles animaux	76
Tableau 4 : Exemple d'études démontrant une atteinte du foie dans le cas d'une inoculation de DENV chez différents modèles murins	78
Tableau 5 : Liste des anticorps primaires utilisés pour des marquages immunofluorescents d'iHeps infectés ou non.	102
Tableau 6 : Liste des couples d'amorces utilisés au sein du projet.....	104

Abréviations

ADE : Facilitation de l'infection par des anticorps	JEV : virus de l'encéphalite japonaise
AFP : Alpha-foetoprotéine	KCs : cellules de Kupffer
ALB : Albumine	LAMR1 : récepteur 1 de la laminine
ALDOB : Aldolase B	LSEC : cellules endothéliales des sinusoides du foie
ALT : Alanine transaminase	LT : lymphocyte T
APC: Cellules présentatrices de l'antigène	M : protéine de membrane
APP : Protéines de la phase aigue	MOI : multiplicité d'infection
ApoB : Apolipoprotéine B	NHP : primate non humain
AST : Aspartate transaminase	NKs : cellules « Natural Killer »
BSA: albumin de serum de bovin	NLR : récepteur de type Node
C : Protéine de capsid	NS : protéine non structurale
CAR : récepteur constitutif d'androstane	NTCP : transporteur d'acides biliaires pour sodium – taurocholate
cGAS : GMP-AMP cyclique synthase	OMS : organisation mondiale de la santé
CLDN1 : Claudine 1	PAMP : motifs associés aux pathogènes
CLR : Récepteur de lectine de type C	PBMC : cellules mononuclées sanguines périphériques
CM : « convoluted » membrane	PFA : paraformaldéhyde
CYP3A4 : Cytochrome P450 3A4	PHHs : hépatocytes humains primaires
DAMP : motifs associés aux dommages tissulaires	prM : précurseur de la membrane
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole	PRR : récepteurs de reconnaissances de motifs moléculaires
DENV : virus de la Dengue	PXR : récepteur X du pré-gène
DEGs : gènes différentiellement exprimés	RE : réticulum endoplasmique
DCs : cellules denditiques	RLR : récepteur de type RIG-I
E : protéine d'enveloppe	TBEV : virus de l'encéphalite à tique
FR : forme répliquative	TBP : protéine se liant aux régions TATA
GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	TLR : récepteur Toll
GUSB : Glucuronidase Beta	TP : taux de pro-thrombine
HBV : virus de l'Hépatite B	TTP : temps de tromboplastine partielle
HCV : virus de l'Hépatite C	UI : unité internationale
HNF4a : Facteur nucléaire hépatocytaire 4 alpha	VB : sac à virus
Hpi : heure post-infection	VP : paquet vésiculaire
IFN : interféron	WNV : virus du Nil Occidental
iHeps : hépatocytes dérivés de cellules souches pluripotentes	YFV : virus de la Fièvre Jaune
IL : interleukine	ZIKV : virus Zika
ISGs : gènes stimulés par les interférons	2D et 3D : deux et trois dimensions

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants de thèse, Dr Véronique Barban et Dr Patrick Lécine. Merci pour votre aide, votre soutien et vos conseils tout au long de ces 3 années. Je pense que très peu d'étudiants peuvent se targuer d'avoir des encadrants aussi disponibles. Vous avez été tout à fait complémentaires sur ce projet et chacun d'entre vous m'a beaucoup appris à titres professionnel et personnel.

Je remercie Dr Nolwenn Jouvennet, Pr Jean-Claude Guillemot d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie également Pr Renaud Mahieux, Pr Patricia Doublet, Dr Cécile Challier d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je suis d'avance certaine que vos conseils et nos échanges seront riches d'apprentissage.

J'adresse également mes sentiments respectueux aux membres du comité de pilotage de mon doctorat, Dr David Durantel et Dr Martine Daujat. Merci pour votre enthousiasme et vos critiques qui ont été pour moi une réelle source de motivation.

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

Je remercie Dr Bachra Rokbi pour sa présidence aux réunions du RSJ. Ces réunions m'ont aidée à prendre du recul sur mon projet et vos remarques et critiques ont été à chaque fois constructives pour son avancé.

Je remercie en particulier Dr Daniel Larocque pour ses conseils et surtout le temps passé à valider toutes mes commandes ! Merci également de m'avoir accueilli en début de thèse au sein de la plateforme microbiologie.

Merci ensuite au Dr Florence Boudet d'avoir pris le relai et m'avoir accueilli au sein de la plateforme Virologie. Merci pour ton extrême gentillesse et pour m'avoir permise de m'intégrer à la vie du laboratoire. Je remercie aussi tous les membres de la plateforme virologie en particulier Dr Nathalie Mantel pour son partage de connaissances sur les flavivirus et ses conseils.

En parlant de la plateforme virologie, un IMMENSE merci à mes chers collègues du quotidien : Marion Aguirre, Elisabeth Marion, Jérémy Pontvianne, Alix Raquin et la petite nouvelle, Odile Ruellet. Vous avez été absolument géniaux ! Toujours prêts à écouter, à rendre service ! Vous avez été mes soleils du quotidien. J'emporte avec moi nos petits quizz de Géo et les idées de décors de bureaux ! Et les Escapes Games avec Nina ! Merci Nina ! Vivement le prochain ! Merci également à Franck Raynal, Sandrine Raynaud, Alexandra Pilloud, Sophie Buffin, Maryline Bouteille, Stéphanie Husson, Sylvie Margot, Isabelle Peubez, Corinne Pion, Sandrine Montano et Sabine Clayette. Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur et les repas que nous avons partagés.

Je remercie également la plateforme OMICS et bioinformatique en particulier un grand merci au Dr Emilie Chautard, merci aussi au Dr Yves Girerd Chambaz, Dr Stéphanie Pierson et Dr Virginie Courtois, Dr Aymeric De-Montfort pour leurs précieux conseils.

Un merci tout particulier à Julie Fine et Nicolas Masse-Deragon pour leur aide précieuse en début de thèse.

Merci aussi aux stagiaires. Tout d'abord celles que j'ai eu le plaisir d'encadrer : Héloïse, Zahra, Auriane. Et puis à ceux dont j'ai eu la joie de partager le bureau ou les repas : Popo, Vincent, Flo Flo, Manon, Cornélia, Marion, Amandine, Carla, Clara.

Place maintenant à mes amis d'Evotec ! Je voudrai remercier tout particulièrement Christine Roubert et Nicolas Chappat. J'ai beaucoup aimé discuter et rire avec vous ! Merci aussi aux équipes TB et HBV pour votre bonne humeur ! Merci aussi pour les hépatocytes ! Merci tout particulièrement à Cha Cha, Christelle et Marion. Merci aussi aux ex-HBV, Amandine et Aurore ! Vivement notre prochain repas potins !

Je remercie également l'équipe de BIOASTER. Un merci tout particulier à Frédéric Reynier et Jérémie Becker pour leur partage d'expertise. Merci à Cyril Guillard pour son soutien. Merci à l'UTEC02 pour leur accueil et la formation aux équipements. Merci aussi aux personnes du bureau du 2^{ème} étage pour votre écoute et vos partages au sujet de vos expériences professionnelles.

Enfin, merci à toute ma famille, mes amis et Antho.

Introduction

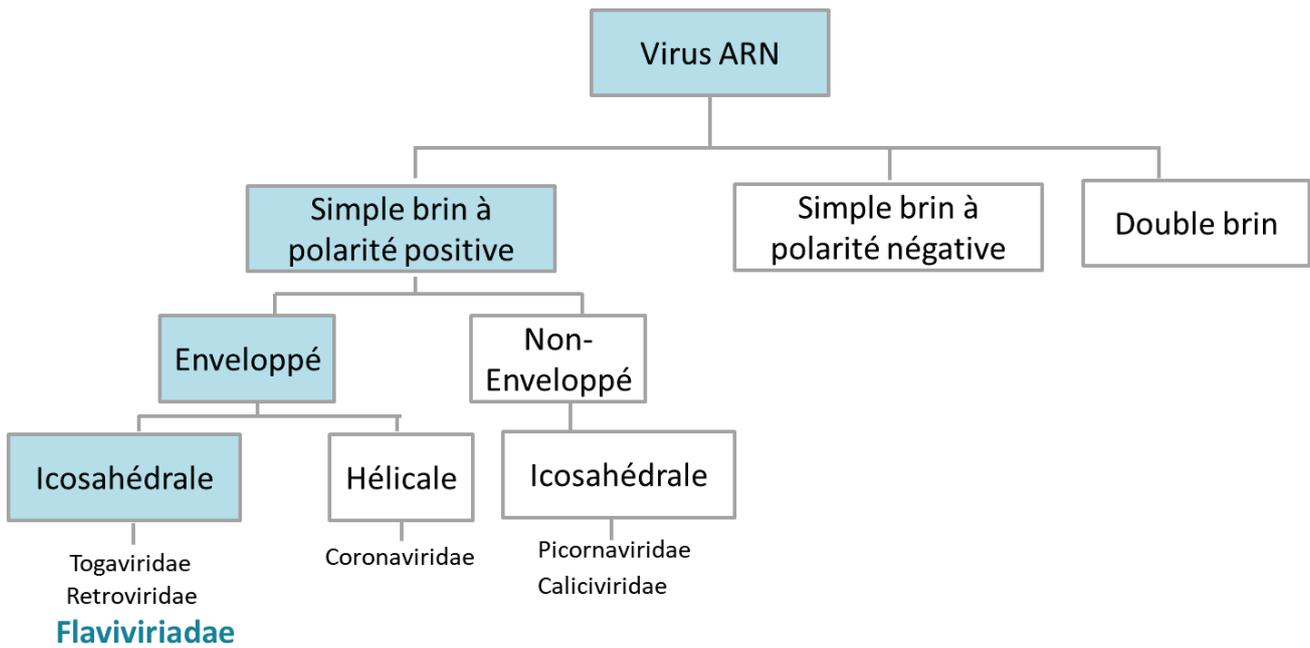


Figure 1: Classification de la famille des Flaviviridae. Traduit de (1). Cette famille regroupe des virus enveloppés dont le génome est un ARN simple brin à polarité positive. La symétrie de leur nucléocapside est icosahédrale.

1 Partie 1 : Les Flavivirus Dengue et Fièvre Jaune

2 1. Classification

3

4 Le genre *Flavivirus* partage la famille des Flaviviridae avec trois autres genres : *Pestivirus*
5 (prototype, virus de la diarrhée virale bovine), *Hepacivirus* (prototype, virus de l'Hépatite C
6 (HCV)) et *Pegivirus*. Cette famille regroupe des virus enveloppés à capsid de symétrie
7 icosahédrale contenant un génome à ARN simple brin à polarité positive associé à des
8 protéines de capsid (C) (Fig. 1).

9 Le genre *Flavivirus* est nommé ainsi d'après le virus de la fièvre jaune (YFV), le prototype du
10 genre. En effet, le mot *flavus* signifie «jaune» en latin et la fièvre jaune est appelée ainsi en
11 raison de sa capacité à causer la jaunisse chez les personnes infectées. L'isolement du YFV
12 marque la découverte du premier virus humain (1).

13 En se basant sur le spectre d'hôte et le type de vecteur, les flavivirus peuvent être classés en 4
14 groupes : les virus transmis par des moustiques, ceux transmis par des tiques, les virus au
15 vecteur inconnu et ceux dont le spectre d'hôtes est restreint aux arthropodes. La majorité des
16 virus transmis par les moustiques et les tiques sont associés à des pathologies humaines dont
17 certaines font partie des préoccupations majeures de santé publique. C'est le cas du YFV, du
18 virus de la Dengue (DENV), du virus de l'encéphalite japonaise (JEV), du virus du Nil
19 Occidental (WNV), du virus Zika (ZIKV) et du virus de l'encéphalite à tique (TBEV).

20 La diversité des vecteurs mais également du spectre d'hôtes ont joué en partie sur la
21 complexité à établir une phylogénie au sein des flavivirus (2). Dans un premier temps, le
22 classement des virus était basé sur des critères sérologiques. Ainsi, 9 sérocomplexes ont pu
23 être établis (3). Le séro groupe de l'encéphalite japonaise comprend les virus JEV et WNV
24 tandis que DENV et YFV appartiennent chacun à un séro groupe qui leur sont propres. DENV
25 possède 4 sérotypes. Le développement des techniques de séquençage a permis de faire
26 évoluer la classification. Tout d'abord réalisée sur la séquence d'une portion de séquence
27 nucléique ou protéique, la classification de certains virus peut être aujourd'hui établie sur la
28 séquence entière du génome ou de la séquence protéique mettant en évidence que les virus
29 transmis par les moustiques du même genre ont des séquences proches (Fig. 2). Ainsi, en plus
30 d'être classés en espèce, les virus comprennent également des sous-groupes appelés
31 génotypes. Ainsi, YFV comprend 5 génotypes (4). DENV est classé en 4 sérotypes dans
32 lesquels des génotypes sont définis : 5 génotypes pour DENV-1, 6 pour DENV-2, 5 pour
33 DENV-3 et 4 pour DENV-4 (4). Les 4 sérotypes de DENV partagent entre 60 et 75%
34 d'identité au niveau de leur séquence protéique et des virus au sein d'un même sérotype ont
35 environ 3% de différence au niveau de leur séquence en acides aminés, 6% au niveau
36 nucléique (5).

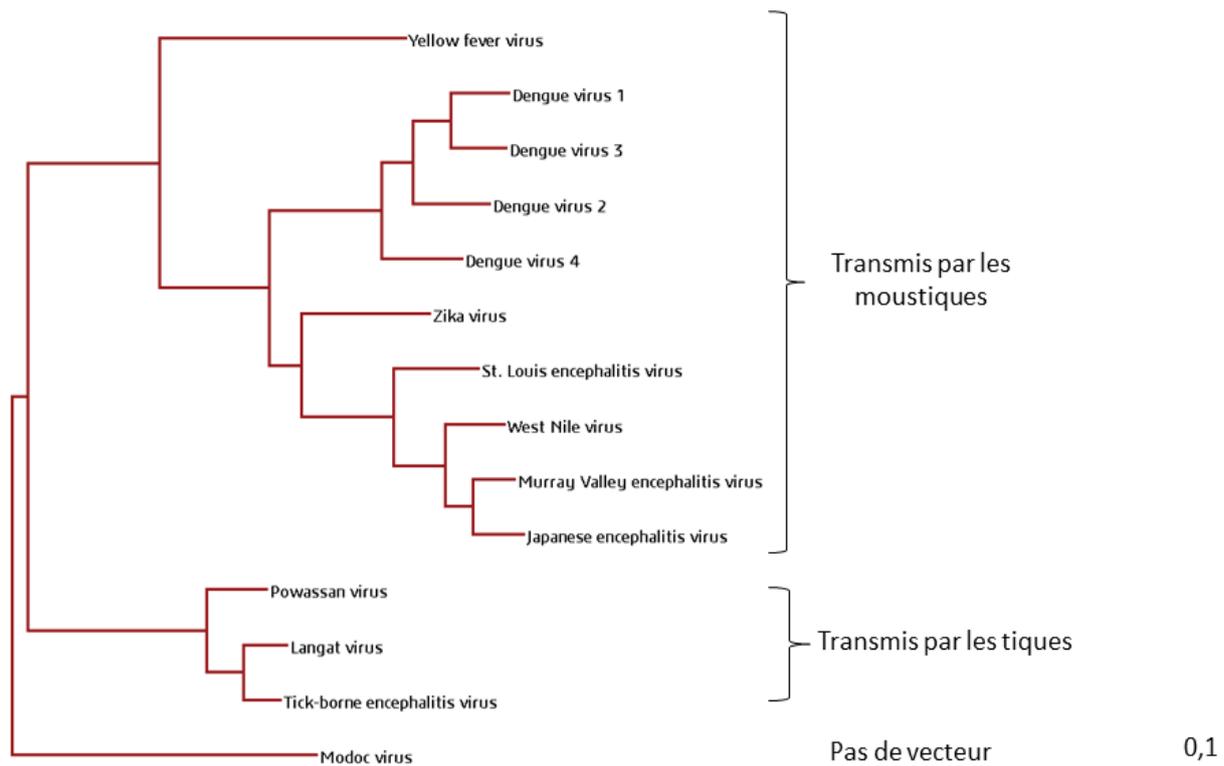


Figure 2 : d’après (6). **Arbre phylogénétique basé sur la séquence protéique complète du génome** des virus : Fièvre jaune, Dengue, Zika, de l’Encephalite de Saint Louis, du Nil Occidental, Encéphalite japonaise, Encéphalite de la Murray Valley, de Powassan, Langat et de l’encephalite à tiques. Les virus transmis par se regroupent selon leur mode de transmission. Cet arbre est calculé par la méthode de maximum de vraisemblance, sur les séquences des polyprotéines entières des virus. Les séquences sont celles des génomes de références de chaque virus de la base Refseq de Genbank

37 2. Organisation du génome

38

39 L'organisation du génome est très conservée parmi les flavivirus (Fig. 3). Il s'agit d'un ARN
40 simple brin à polarité positive dont la taille est d'environ 11 Kb.

41 L'ARN viral possède en 5' une coiffe de type I 5'm⁷GppAmpN₂. La partie codante de l'ARN
42 est flanquée en 5' et en 3' de régions qui ne seront pas traduites (UTR pour en anglais
43 untranslated region). Elles ont une longueur de 100 nucléotides en 5' et varient entre 400 et
44 700 nucléotides en 3' selon les espèces et les souches virales. L'interaction des protéines
45 cellulaires de l'hôte comme TIAR avec la partie 5'UTR est nécessaire à la réplication virale
46 (7). De plus, la région 5' rétrotranscrite servira de site d'initiation à la synthèse d'ARN. La
47 région 3'UTR est très variable au sein des flavivirus surtout entre virus transmis par les
48 moustiques et virus transmis par les tiques. La seule similarité réside dans le fait que cette
49 région forme une structure secondaire en forme de boucle. Elle aurait un rôle dans la
50 réplication de l'ARN viral et dans la traduction puisque les réplicases virales NS3 et NS5
51 ainsi que le facteur d'élongation de la traduction EF1A pourraient interagir avec cette partie
52 (8–10).

53 La partie codante du génome code pour une seule polyprotéine qui sera clivée pendant et
54 après la traduction en 10 protéines : 3 protéines structurales sur l'extrémité N-terminale :
55 capsid (C), précurseur de membrane (prM) et enveloppe (E); et 7 protéines non-structurales
56 (NS) NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 qui pour la plupart sont
57 multifonctionnelles jouent un rôle dans la réplication virale. La polyprotéine sera clivée
58 pendant le cycle viral par des signal peptidases de l'hôte et du virus. Seul le clivage de la
59 liaison entre NS1 et NS2A est réalisé par une protéase qui n'est pas encore identifiée même si
60 certaines études suggèrent qu'il s'agirait plutôt d'une protéase de l'hôte associée aux
61 membranes du réticulum endoplasmique (11).

62 Les fonctions de chacune des protéines virales ont été plus ou moins caractérisées.

63 **Capsid :** La protéine de capsid C est une protéine hautement basique d'environ 12 kDa
64 avec des extrémités N et C terminales chargées et séparées par une région hydrophobe. Les
65 propriétés de cette région semblent conservées parmi les flavivirus, mais la séquence en
66 acides aminés est très variable d'un virus à l'autre. Au cours du cycle de vie du flavivirus,
67 plusieurs sous-unités C s'assemblent pour former la nucléocapsid virale, interagissant et
68 recouvrant le génome ARN (12). La protéine C est également capable d'interagir avec des
69 protéines de l'hôte au niveau du noyau favorisant dans certains cas la réplication virale et d'en
70 d'autres l'induction de l'apoptose (13–15).

71 **prM/M:** Le précurseur membranaire prM est une glycoprotéine de 26 kDa. Durant le cycle
72 viral, prM va être associée à la protéine d'enveloppe E, protégeant alors sa conformation de
73 l'acidité du pH (16). Le clivage de prM en la protéine membranaire M par une protéase de
74 l'hôte est considéré comme une étape cruciale de la maturation des particules virales (17).

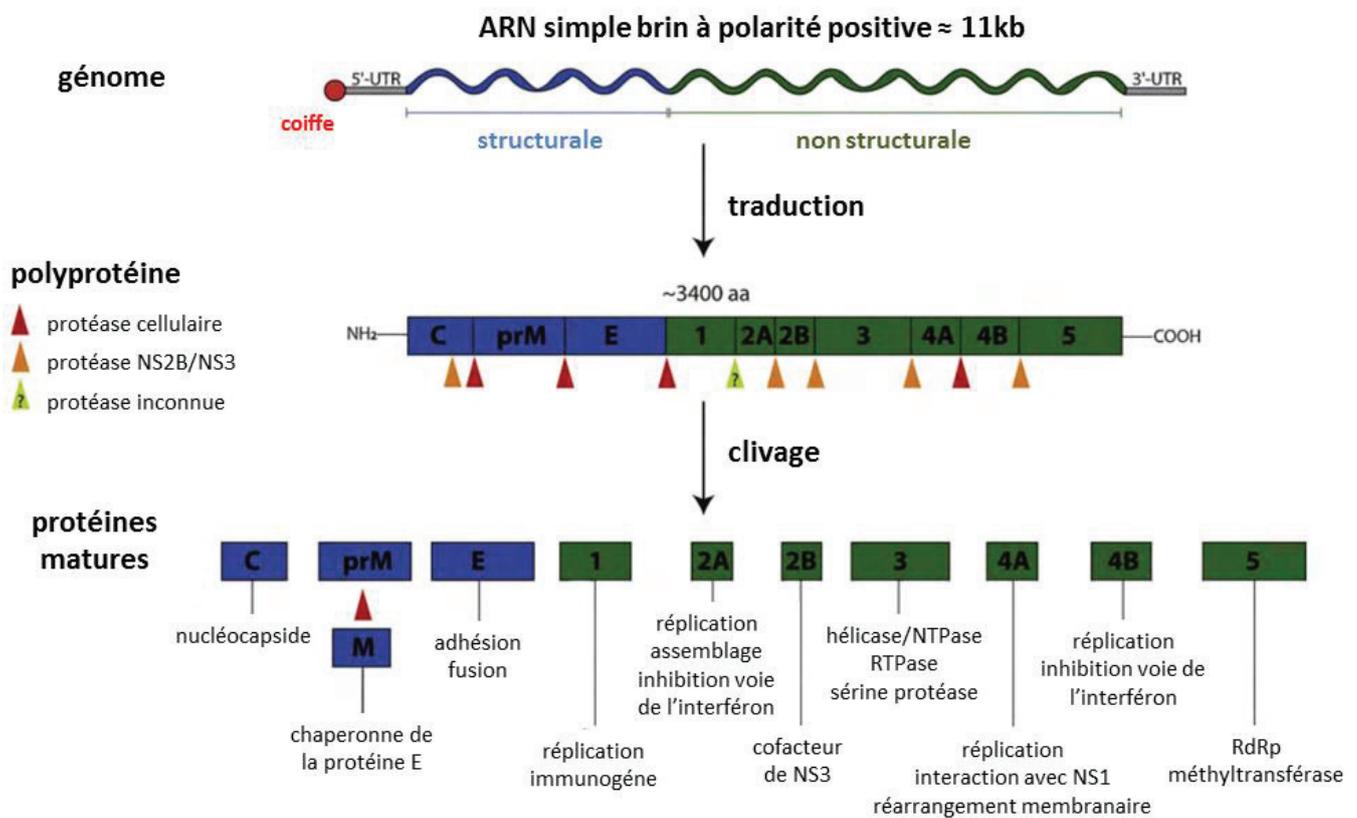


Figure 3 :Organisation du génome et de la polyprotéine des flavivirus - Traduit de (18). Le génome des flavivirus est un ARN simple brin à polarité positive d'environ 11kb comportant un cadre ouvert de lecture d'environ 10 kb flanqué de part et d'autre d'une région 5' et 3' non codantes. Le cadre ouvert de lecture code pour une polyprotéine immature qui est clivée par des protéases de l'hôte et des protéases virales en 10 protéines. 3 protéines structurales en bleu : capsid (C), précurseur de membrane (prM), l'enveloppe (E) et 7 protéines non structurales (NS) en vert : NS1 (1), NS2A (2A), NS2B (2B), NS3 (3), NS4A (4A), NS4B (4B) et NS5 (5). La protéine prM sera clivée durant le cycle viral générant ainsi la protéine M. Les fonctions exercées par ces protéines sont indiquées sous chacune d'elle.

75 **E** : E est une glycoprotéine de 53 kDa présente à la surface des virions de flavivirus. Elle joue
76 un rôle central dans la liaison aux cellules hôtes et la fusion membranaire. Sa séquence en
77 acide aminé est conservée entre 40 et 44% parmi les flavivirus (19).

78 **NS1**: NS1 est une glycoprotéine d'environ 46 kDa. Sous forme de dimère, elle joue un rôle
79 essentiel dans la réplication. NS1 peut être également sécrétée sous forme hexamérique. Elle
80 peut induire une inhibition du complément et possède également une forte capacité à
81 remodeler les membranes lipidiques. Dues à ses fortes propriétés immunogènes, NS1 est
82 proposée comme antigène de nouveau vaccin contre les flavivirus (20).

83 **NS2A** : NS2A est une protéine d'environ 22 kDa qui aurait un rôle dans l'assemblage du
84 virion, en étant impliquée dans le packaging de l'ARN. Cette protéine est clivée par NS3 à
85 son extrémité C-terminale générant ainsi la protéine NS2 α .

86 **NS2B** : NS2B est une protéine de 14 kDa qui joue un rôle de cofacteur de la protéine NS3.

87 **NS3** : NS3 est une protéine de 70 kDa comportant trois activités enzymatiques distinctes :

- 88 - une activité sérine protéase requise avec le cofacteur NS2B pour le clivage de la
- 89 polyprotéine
- 90 - une hélicase/NTPase requise pour dérouler la forme répliquative de l'ARN double brin
- 91 - une activité ARN triphosphatase nécessaire pour coiffer les ARN viraux naissants.

92 **NS4A et NS4B** : NS4A et NS4B sont des protéines ayant certainement un rôle dans la
93 réplication puisqu'elles ont été co-localisées avec le complexe de réplication.

94 **NS5** : Avec ses 103 kDa, NS5 est la protéine des flavivirus qui a le plus haut poids
95 moléculaire. Elle est également la protéine la plus conservée parmi les flavivirus. Les 4
96 sérotypes de DENV partagent près de 75% d'identité au niveau de cette protéine (18). Elle
97 possède deux régions enzymatiques:

- 98 - une activité S-adenosylmethyltransférase nécessaire à la mise en place de la coiffe des
- 99 ARN viraux
- 100 - et une activité polymérase à ARN-ARN dépendante (RdRp) impliquée directement
- 101 dans la synthèse de l'ARN viral.

102 NS5 est également capable d'interagir avec NS3 stimulant ses activités NTPase et RTPase.
103 De plus, il a été montré que la NS5 de DENV peut être localisée dans le noyau. Cette
104 localisation ne serait pas critique à la réplication mais pourrait jouer un rôle dans le
105 remaniement de l'expression de certains gènes de l'hôte (21).

106 La majorité des protéines non structurales ont des fonctions décrites dans le détournement de
107 la réponse immunitaire. Cette fonction est plus amplement décrite dans la section 6.2.1 de la
108 partie I de ce document.

109 En plus du génome, d'autres espèces d'ARN sont présentes en abondance durant la
110 réplication des flavivirus. Ces ARNs sont non codants et sont regroupés en trois classes : les
111 petits ARNs viraux (ARNvs) (22), les génomes interférents défectifs (DIG) (23,24) et l'ARN

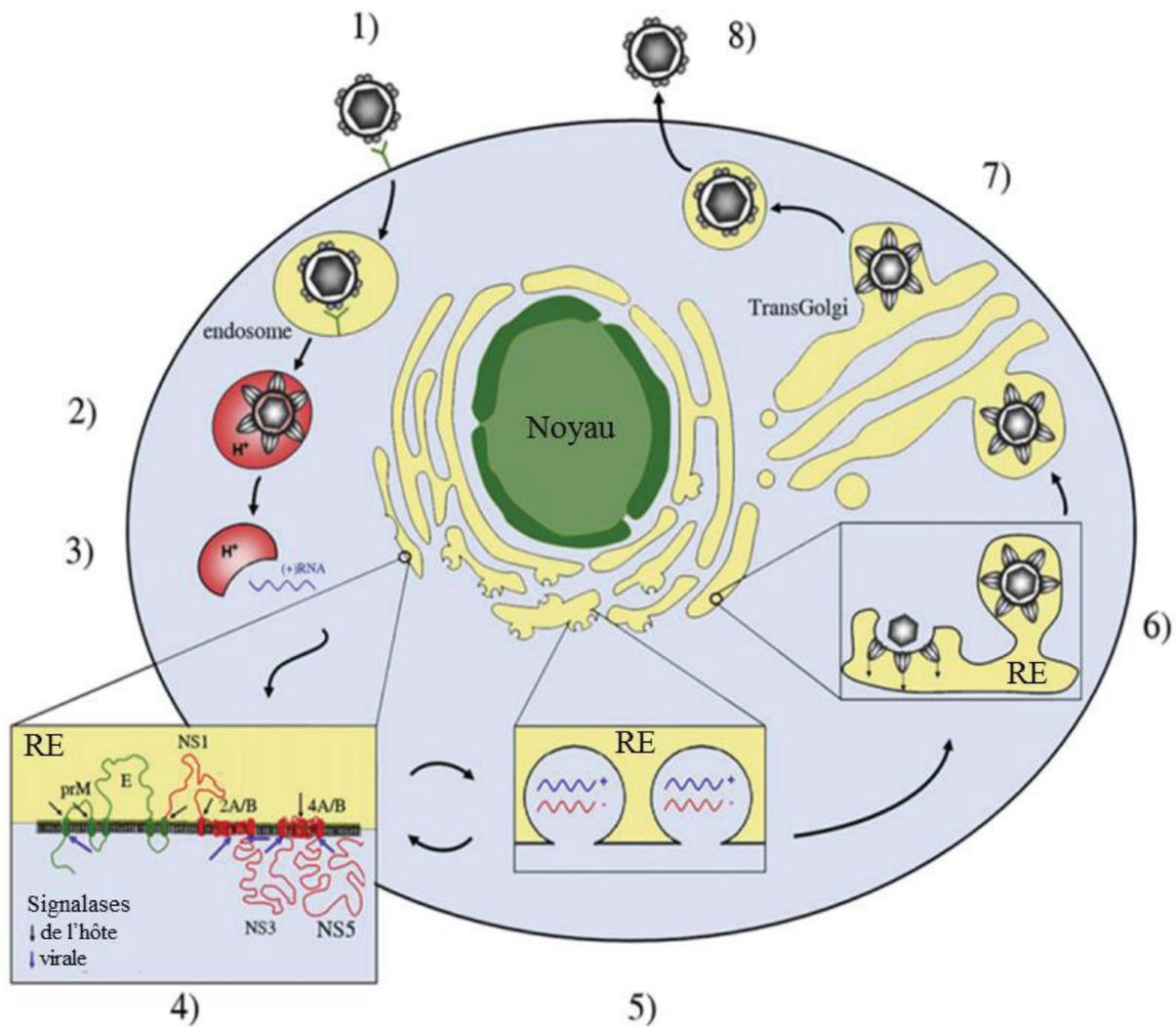


Figure 4: Cycle de répliation cellulaire des flavivirus -Traduit de l'article (25)

1-Attachement et entrée. 2-Fusion du virion à l'endosome 3-Décapsidation et libération de l'ARN viral. 4-Traduction et clivage protéique. 5-Réplication du génome. 6-Assemblage de la particule virale. 7-Maturation par clivage de la protéine prM. 8-Bourgeonnement et sortie de la nouvelle particule virale. RE : réticulum endoplasmique

112 subgénomique des flavivirus (ARNsf) (26). La fonction de DIG et ARNvs n'est pas encore
113 bien décrite au contraire de celle des ARNsf. Ces derniers ont une structure de 0.3 à 0.7kb qui
114 semble être générée à partir de la dégradation en 5' de l'ARN génomique par l'exonuclease
115 cellulaire Xrn1. Ces ARNsf semblent être l'espèce ARN la plus abondante durant l'infection.
116 Ils n'auraient pas de rôle direct dans la réplication puisque des mutations affectant leur
117 production n'altèrent par la réplication virale dans les cellules infectées par YFV ou DENV
118 (27–29). Cependant, ils joueraient un rôle essentiel dans la pathogénicité virale en
119 détournement la réponse immunitaire de l'hôte (plus de détails dans la section 6.2.2 de la
120 partie 1 de ce document) (30).

121

122 3. Cycle viral

123

124 Les principales étapes du cycle de réplication des flavivirus sont répertoriées dans la figure 4.

125 3.1 Attachement et entrée

126 Le cycle de réplication des flavivirus débute par l'étape d'attachement du virus à la surface de
127 la cellule. Ils se fixeraient tout d'abord de manière aspécifique aux glycoaminoglycans puis à
128 des molécules spécifiques. Actuellement, aucun récepteur indispensable à l'entrée du virus
129 n'a été répertorié. De multiples molécules de nature glucidique ou protéique ont été décrites
130 comme jouant un rôle de cofacteurs dans l'attachement des flavivirus. Elles semblent différer
131 selon le type cellulaire ciblé par le virus et également selon l'espèce infectée (Tab. 1). De
132 nombreux co-récepteurs ont été mis en évidence pour DENV alors qu'aucun n'a été décrit
133 pour YFV sauvage.

134 On retrouve par exemple des molécules appartenant aux groupes des lectines de type C
135 comme le DC-SIGN présent à la surface des cellules dendritiques de la peau, les cellules de
136 Langerhans, ou sur certains macrophages (31–33). Bien que des mutations empêchant
137 l'internalisation du DC-SIGN n'affectent pas l'infection des flavivirus, l'identification d'un
138 polymorphisme dans le promoteur du DC-SIGN a été associée à des prédispositions aux
139 formes sévères de dengue (34,35).

140 Dans le cas de DENV, il a été montré que le virion roule à la surface de la cellule entre
141 différents facteurs d'attachement jusqu'à sa fixation sur un récepteur d'entrée localisé au
142 niveau d'une zone à forte concentration de clathrine (36). Ainsi, les flavivirus pénètrent
143 majoritairement dans la cellule par la voie de l'endocytose dépendante de la clathrine (37–39).
144 Le virus suit ensuite la voie endosomale où l'acidification du pH entraîne des réarrangements
145 des protéines à sa surface du virus conduisant à sa fusion avec la membrane endosomale.
146 Cette fusion forme alors un pore qui permet l'excrétion de la nucléocapside dans le
147 cytoplasme (40).

148 Contrairement à YFV où la voie d'endocytose dépendante la clathrine est décrite comme
149 exclusive *in vitro* (41), la voie dépendante de la cavéoline et récepteur indépendante est
150 décrite notamment pour DENV dans les cellules VERO (42).

Molécules	Propriété	Type Cellulaire	Espèce	Virus
Héparane Sulfate, Syndecan	Glycosaminoglycane	ubiquitaire	Mammifère	DENV, JEV, MEV, TBEV, YFV, WNV
Hsp90, Hsp70, GRP78	Protéines heatshock	U937, SK-SY5Y, Macrophages, HepG2, Huh7, Neuroza, BHK-21, C6/36	Mammifère et Moustique	DENV, JEV
DC-SIGN/L-SIGN		THP-1, DC / LSEC, cellules endothéliales	Mammifère	DENV, WNV, ZIKV
Mannose receptor		NIH3T3, Monocytes, Macrophage	Mammifère	DENV
CLEC5A	C type lectine		Mammifère	DENV, JEV
mosGCTL-1			Moustique	WNV
Récepteur de la laminine		HepG2, PS clone D	Mammifère et Moustique	DENV, WNV
Prohibitine	Modulateur des fonctions mitochondriales et transcription	C6/36, CCL-125, whole A.aegypti	Moustique	DENV
Récepteurs TIM et TAM (AXL, TIM-1, TIRO3, ect..)	Phosphatidylserine recepteurs	A549, Huh7, VERO, cellules de rein, cellules épithéliale, astrocytes	Mammifère	DENV, WNV, YFV, ZIKV
Intégrine $\alpha\beta 3$	Récepteur Vitronectine	VERO	Mammifère	DENV, WNV, JEV
Récepteur scavenger de classe B	Récepteur de lipoprotéine à forte densité	VERO, U937, Huh7	Mammifère	DENV
Claudine 1	Composant des jonctions serrées	Huh7, cellules endothéliales	Mammifère	DENV
Neolactotetraosylceramide	Glycosphingolipide	K562, BHK-21, VERO	Mammifère	DENV
NKp44	Récepteur d'activation des cellules NK	NK	Mammifère	DENV, WNV
CD14	Co-facteur de récepteur immunitaire	Monocytes, Macrophage	Mammifère	DENV
CD4	Co-facteur de récepteur immunitaire	Microglie	Mammifère	JEV
Tubuline	Composant du cytosquelette microtubulaire	C6/36	Moustique	DENV

Tableau 1 : Co-récepteurs d'entrée des flavivirus –d'après les revues (43–45)

151 De plus, une voie d'entrée dépendante des anticorps a également été décrite. Elle est
152 communément connue sous le nom d'ADE pour en anglais « antibody dependant
153 enhancement ». Les particules virales opsonisées avec des immunoglobulines peuvent
154 interagir avec des récepteurs Fc présents notamment à la surface macrophages facilitant
155 l'entrée du virus dans les cellules (46). Premièrement décrite pour JEV et WNV, il est
156 suspecté que l'ADE puisse avoir un rôle important dans la pathogenèse de DENV et pourrait
157 être un facteur favorisant la forme sévère de la maladie (plus de détails dans la section 7.3 de
158 cette partie).

159 *3.2 Réplication virale*

160 Une fois le complexe nucléocapsidique dans le cytoplasme cellulaire, l'ARN génomique viral
161 est décapsidé. Il est pris en charge par la machinerie cellulaire pour être traduit en
162 polyprotéine au niveau du réticulum endoplasmique (RE) granuleux. Les protéines virales
163 résultent de clivages co- et post-traductionnels de la polyprotéine virale. Ces clivages sont
164 assurés par des signalases cellulaires ou la protéase virale NS2b-NS3. Après le clivage de la
165 polyprotéine, la protéine C se trouve ancrée dans la membrane du RE. En revanche, les
166 protéines structurales prM et E sont quant à elles transloquées, via un peptide signal en N-
167 terminal, dans la lumière du RE puis dans le réseau trans-golgien où elles subissent des
168 glycosylations. Cette maturation va permettre leur assemblage en hétérodimères qui se
169 retrouveront par la suite à la surface des virions immatures. Enfin, après clivage, les protéines
170 NS3 et NS5 sont cytosoliques, tandis que les protéines hydrophobes NS2a, NS2b, NS4a et
171 NS4b sont membranaires. Après la traduction et la maturation des protéines, le complexe de
172 réplication, intégrant les protéines non structurales et des facteurs cellulaires, est assemblé au
173 niveau de la région 3' de l'ARN viral. La réplication virale s'effectue au niveau des
174 membranes du RE de la cellule infectée. La fixation du complexe de réplication initie la
175 synthèse d'un brin d'ARN complémentaire de polarité négative. Lors de la réplication, des
176 complexes ARN de formes différentes sont détectées dans les cellules infectées. Des ARN
177 doubles brins ou formes réplicatives (FR), qui sont un appariement des ARN sens (polarité
178 positive) et anti-sens (polarité négative). Des formes intermédiaires de réplication, issues des
179 FR et qui sont constituées d'ARN double brin et de simples brins naissants. Dans les formes
180 intermédiaires, le brin de polarité négative ou brin matrice sert de base pour l'amplification
181 des brins positifs. Les brins positifs sont ainsi synthétisés en excès (environ 10 fois) par
182 rapport au brin d'ARN négatif (47).

183 Classiquement la réplication est décrite comme associée à la membrane du RE granuleux
184 libérant l'ARN viral dans la lumière du RE. Aujourd'hui, il est bien établi que l'infection par
185 les flavivirus entraîne une réorganisation membranaire conduisant à la mise en place de
186 structures spécifiques servant de niche à la réplication virale appelée complexes de réplication
187 (48). Trois structures distinctes ont été décrites : les paquets vésiculaires (VP), les membranes
188 dites « convoluted » en anglais (CM) et les sacs à virus (VB) (49–51). Les VP sont des
189 invaginations du RE que l'on retrouve dans les cellules de mammifères ainsi que

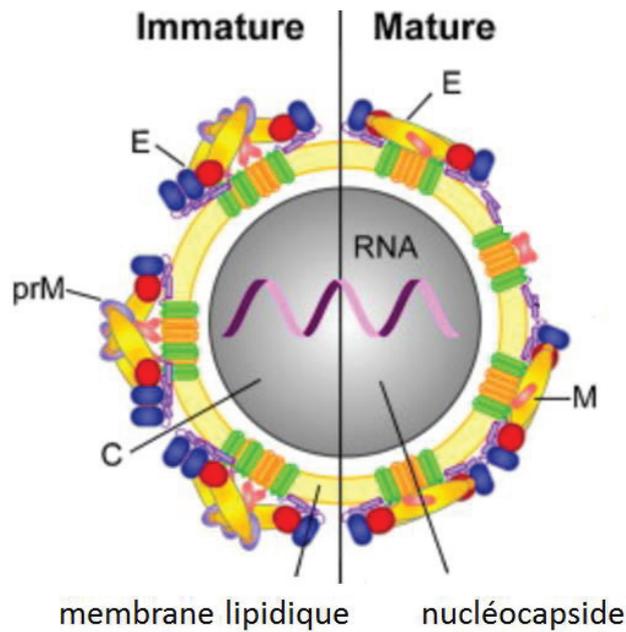


Figure 5 : Représentation schématique d'une particule de flavivirus- Traduit de (19).

A gauche, une particule immature, à droite, une particule mature. Au centre, la capsid (C) et le génome ARN forme la nucléocapside qui est entourée d'une membrane lipidique de l'hôte associée aux protéines virales d'enveloppe (E) et de membrane (M) ou pré-membrane (prM). Le clivage de pré-M en M va être une étape déterminante pour le choix de la structure du virion.

190 dans celles de moustique. Elles sont connectées au cytoplasme via un système de pores.
191 L'ARN viral ainsi que les protéines non structurales requises à la réplication NS5, NS3, NS1,
192 NS4A et NS4B ont été identifiés au sein de cette structure démontrant son rôle certain dans la
193 réplication. Cependant, il n'est pas encore décrit si cette structure est indispensable à la
194 réplication. Elle pourrait également servir de protection vis-à-vis des senseurs cytosoliques de
195 l'immunité innée ou des nucléases cytosoliques. Les CM sont des structures dérivées du RE
196 lisse enrichies en NS2B, NS3, NS4A et NS4B. Leur fonction n'est pas encore connue mais
197 elle pourrait participer à la modulation de l'immunité innée (52). Les VB sont des citernes
198 dilatées du RE pouvant accumuler des virions nouvellement synthétisés (d'après la revue :
199 (30)).

200 *3.3 Assemblage et sortie des particules infectieuses*

201 L'étape d'assemblage des flavivirus est encore aujourd'hui une étape très peu comprise.

202 L'ARN néosynthétisé est encapsidé avec des protéines C formant la nucléocapside. La
203 protéine C s'assemble en dimère mais son organisation dans la nucléocapside n'est pas encore
204 très claire (12). L'assemblage des particules virales a lieu dans la lumière du RE granuleux et
205 la maturation de ces particules a lieu dans le réseau trans-golgien où prM est clivée en M par
206 une protéase furine résidant dans le Golgi. Le clivage de prM en M libère alors l'hétérodimère
207 prM-E permettant à E de former des homodimères. La maturation consiste également en des
208 réarrangements conformationnels des protéines E. Cette étape de maturation est essentielle
209 pour assurer la transition du virus de fusion-incompétent non infectieux vers des virions
210 matures, compétents et infectieux. Un blocage du clivage prM/M conduit au relargage de
211 virions immatures non infectieux (53).

212 *3.4 Structure des particules virales*

213 La microscopie cryoélectronique et la reconstruction d'image ont permis de fournir des
214 informations précieuses sur la structure des flavivirus (Fig. 5).

215 Les particules virales sont constituées d'une bicouche lipidique provenant de l'hôte où sont
216 insérées les protéines E et M. La quantité de protéines M dans la bicouche lipidique est
217 variable selon les flavivirus. Cette bicouche entoure la nucléocapside constituée du génome
218 viral associé à la protéine C. Les protéines E et M n'interagissent pas avec la nucléocapside.

219 L'infection par les flavivirus est connue pour produire un mélange de particules matures,
220 immatures et partiellement matures. Dans certaines études près de 90% des particules de
221 DENV issues de l'infection de cellules de moustiques C6/36 sont des particules partiellement
222 matures (54).

223 La particule infectieuse mature est une particule d'environ 50 nm de diamètre alors que la
224 particule immature, plus large, mesure 60 nm. Sa surface est dite lisse contrairement à la
225 particule immature qui a une surface en pics. C'est l'arrangement de la protéine E qui confère
226 une forme plutôt qu'une autre. La particule mature est constituée de près de 90 homodimères
227 de protéines E qui s'organisent en tête à queue parallèlement à la surface du virion alors que
228 la protéine E de la particule immature est sous forme monomérique s'arrangeant par 3 sous
229 forme de pic (55–57). Les particules immatures sont considérées

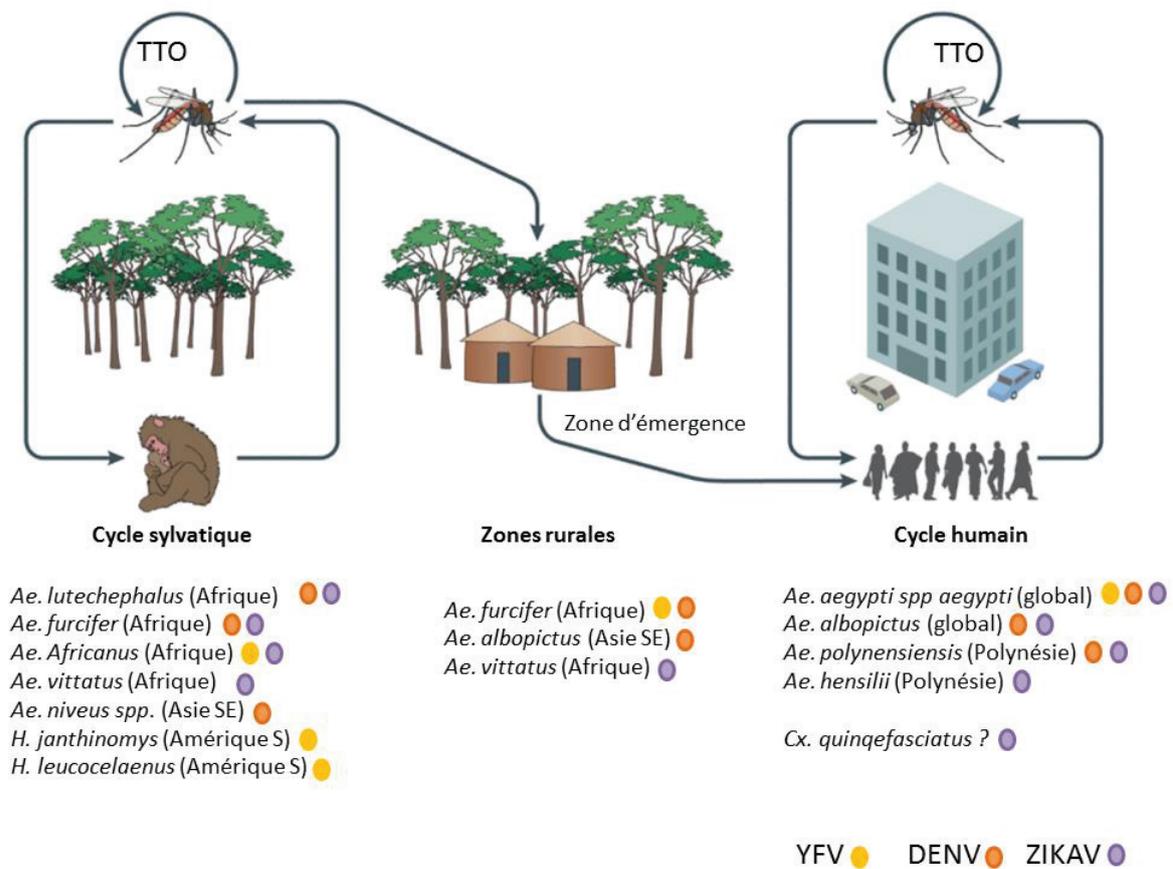


Figure 6 : Cycle de transmission de YFV (point jaune), DENV (point orange) et ZIKV (point violet). Traduit et adapté de (58,59). YFV, DENV, ZIKV circulent dans un cycle humain et un cycle sylvatique. Chez le moustique une transmission transovarienne (TTO) est aussi possible; *Ae* : *Aedes*; *Cx*: *Culex* ; *H*: *Haemagogus*.

230 comme non infectieuses puisqu'en théorie la protéine E ne peut pas interagir dans cette
231 conformation avec les récepteurs d'entrée ; néanmoins la fixation d'anticorps à leur surface
232 peut, par les mécanismes d'ADE, favoriser leur entrée, rendant alors possible une infection du
233 virion (60,61). Il existe également des particules partiellement matures qui vont alterner pics
234 et zones lisses à leur surface. Il s'agit de particules où le clivage de prM en M n'est pas réalisé
235 pour l'ensemble des protéines prM. Il semblerait que l'efficacité du clivage varie selon le type
236 de cellules : il serait plus efficace dans des cellules humaines primaires que dans des cellules
237 d'insecte ou des cellules issues de lignées tumorales. Les virions partiellement matures
238 peuvent être infectieux (62).

239 Outre ces particules, il existe également des particules non infectieuses de 30 nm qui ne
240 contiennent pas de nucléocapside. Le réarrangement de leur protéine E est sensiblement
241 proche de celui des particules matures mais ces particules ne sont constituées que de 30
242 dimères de E. On parle de particules recombinantes subvirales. Ces particules seraient non
243 infectieuses mais capables néanmoins du mécanisme de fusion (63,64).

244 4. Epidémiologie

245 Plus de 50% des flavivirus ont été associés à des pathologies humaines. Nous décrirons dans
246 cette partie seulement l'épidémiologie de deux des pathogènes majeurs de l'homme à savoir
247 YFV, DENV, virus au cœur de notre projet.

248 4.1 Cycle écologique

249 Le cycle de vie des flavivirus fait intervenir de multiples hôtes parmi les vertébrés. On peut
250 parler de pléiotropie. Les cycles écologiques de YFV et DENV sont similaires. Ils circulent
251 tous deux dans un cycle humain (ou urbain) et un cycle sylvatique (Fig. 6). Dans le cycle
252 sylvatique, les virus sont maintenus entre primates non humains et moustiques des genres
253 *Aedes* et *Haemagogus* en Amérique du Sud pour YFV (58,59,65).

254 Dans le cycle humain, les virus sont maintenus entre humain et moustique du genre *Aedes*,
255 principalement *Aedes aegypti*. La transmission s'effectue par un cycle intermédiaire dans les
256 zones rurales où le vecteur moustique *Aedes* permettrait la transmission des virus du singe à
257 l'Homme. Jusqu'à 2015, très peu de cas de transmission de personne à personne n'avaient été
258 décrits chez les flavivirus hormis dans les cas accidentels de don d'organe ou de transfusion
259 sanguine (66) ou dans le cas rare de transmission placentaire reporté pour JEV (67).
260 Cependant, ce sont les épidémies de ZIKV en Amérique du Sud en 2015 qui ont mis en
261 évidence une possible transmission du virus par voie sexuelle et par voie placentaire chez
262 l'Homme à une fréquence non négligeable. La transmission directe Homme-singe n'a pas été
263 décrite. Il semble que les souches virales isolées à partir des humains et des primates non
264 humains sont génétiquement différentes, indiquant que leurs cycles de transmission ont
265 divergé dans le passé. Chez le moustique une transmission verticale (ou transmission
266 transovarienne) a également été démontrée par isolement du virus à partir de larves de
267 moustiques participant alors au maintien du virus dans l'environnement (68–70).



Figure 7: Distribution géographique des deux pathogènes majeurs du genre *Flavivirus* (71). Les cartes montrent la distribution géographique des virus YFV et DENV. Ces distributions correspondent également à celles mises à jour en 2018 pour YFV et 2017 pour DENV par le centre de contrôle et de prévention des maladies (72,73)

269 *4.2 Distribution géographique*

270 Les flavivirus ont une distribution géographique mondiale mais les espèces sont restreintes à
 271 des endémies ou épidémies spécifiques. La distribution des arthropozoonoses causées par ces
 272 virus est étroitement liée au mode de vie des vecteurs responsables de leur transmission mais
 273 aussi de leurs hôtes réservoirs.

274 La dengue, maladie transmise par le virus DENV, sévit principalement dans les régions
 275 tropicales et subtropicales (Fig. 7). DENV-4 semble être le sérotype que l'on retrouve avec la
 276 plus faible occurrence et sa distribution sur le continent Africain de 2000 à 2013 est plus
 277 faible que les autres sérotypes (74). La co-circulation de différents sérotypes ou de différentes
 278 souches d'un même sérotype a été reportée dans la littérature (75–78). Près de 4 milliards de
 279 personnes sont ainsi exposées au risque d'infection du virus soit près de 40% de la population
 280 mondiale. Des études dénoncent qu'en réalité près de 390 millions personnes par an dans le
 281 monde seraient infectées et que parmi ces personnes, 50 à 100 millions développent des
 282 symptômes (79,80) . On dénombre 500 000 cas sévères nécessitant une prise en charge
 283 hospitalière. Ces cas sont mortels dans près de 5% des cas correspondant alors au décès de
 284 près de 20 000 personnes chaque année. Avec les déplacements aériens et le réchauffement
 285 climatique qui favorisent l'installation du vecteur, la dengue est devenue une menace au-delà
 286 des zones équatoriales (81). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2015, en
 287 France métropolitaine, 135 cas de dengue ont été déclarés. La plupart étaient importés mais 6
 288 cas autochtones ont été détectés à Nîmes (82). En avril 2018, 1816 cas autochtones ont été
 289 confirmés sur l'île de la Réunion contre moins de 100 en 2017 (83).

290 La distribution géographique de YFV est moins étendue que celle de DENV. La maladie de la
 291 fièvre jaune est endémique dans les forêts tropicales d'Afrique et d'Amérique Latine (Fig. 8).
 292 Selon l'OMS, chaque année 80 000 à 200 000 cas sont dénombrés dans le monde. Le nombre
 293 de morts est estimé entre 30 000 et 60 000 chaque année. D'après l'OMS, du 1er juillet 2017
 294 au 28 février 2018, 723 cas confirmés de fièvre jaune ont été reportés au Brésil parmi lesquels
 295 274 morts (37,8%). Ce nombre de cas est plus haut qu'en 2016/2017 sur la même période où
 296 576 cas ont été confirmés incluant 184 morts.

297 *4.3 Dispositif de surveillance*

298 L'essentiel des mesures mises en œuvre est dirigé contre la prolifération des vecteurs. La lutte
 299 anti-larvaire en période inter-épidémique, l'information et la sensibilisation du public visent à
 300 limiter la multiplication des gîtes larvaires (84). Le dispositif de surveillance s'appuie
 301 également sur la surveillance entomologique (des moustiques vecteurs) et épidémiologique
 302 (des cas humains) pour prévenir et évaluer les risques de dissémination.

303 Des études mathématiques développent également des modèles prédictifs en se basant sur des
 304 données environnementales comme par exemple la température ou le taux d'humidité. Le but
 305 est de prédire les régions favorables au fort développement des vecteurs (85) ou à la survenue
 306 d'une épidémie humaine (86).

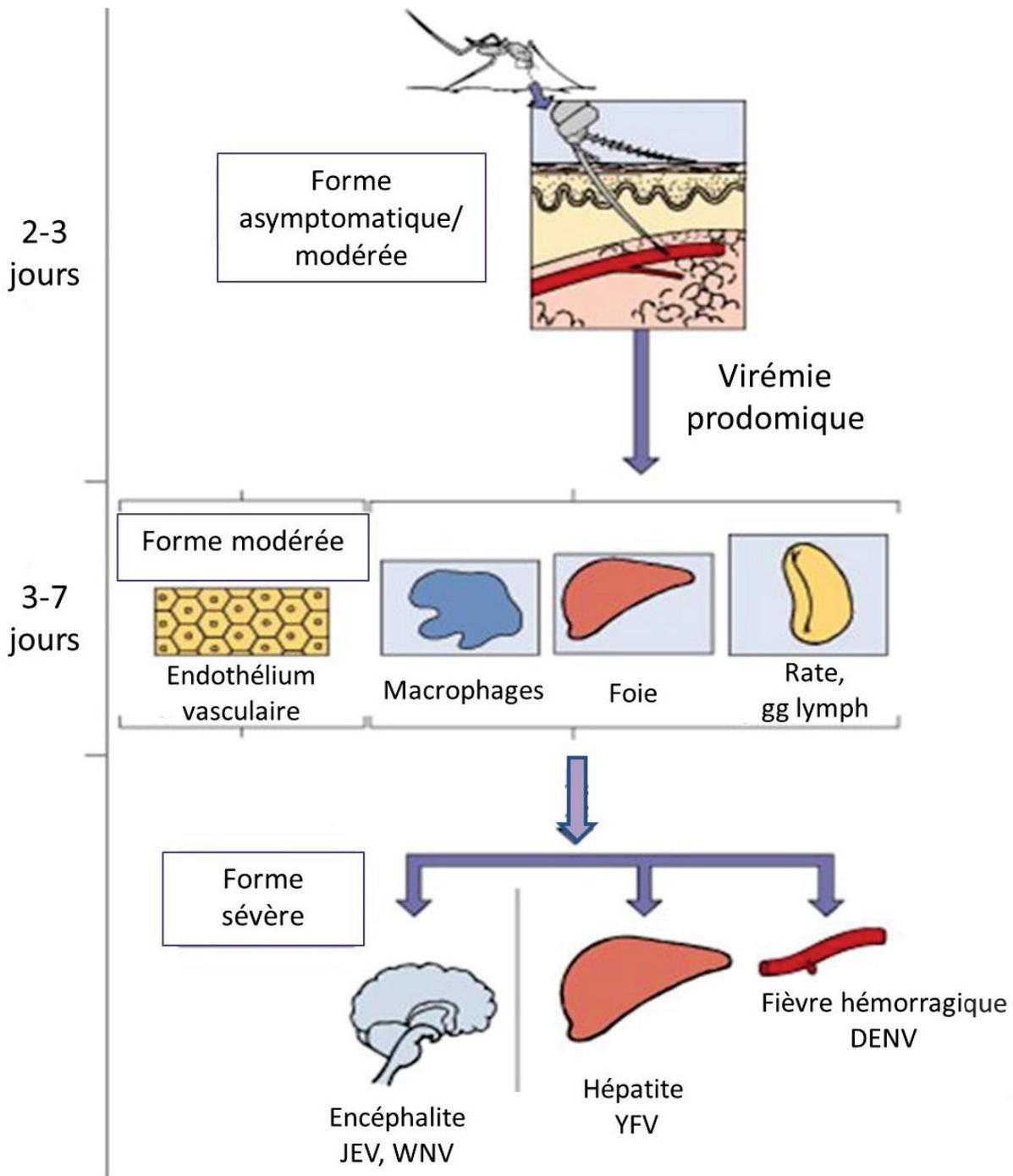


Figure 8 : Route de progression des flavivirus dans l'organisme. Traduit et adapté de (87).
gg lymph : ganglions lymphatiques

307 5. Pathogenèse de l'infection par les flavivirus

308

309 Selon les dommages causés, les flavivirus peuvent être regroupés en deux catégories : ceux
310 qui causent des fièvres hémorragiques comme c'est le cas de DENV et YFV et ceux qui
311 causent des encéphalites incluant WNV, JEV.

312 *5.1 Route de progression des virus au sein de leur hôte*

313 Après une incubation de 4 à 10 jours, un arthropode infecté peut transmettre le virus jusqu'à
314 la fin de sa vie. L'inoculation du virus à l'Homme s'effectue via la piqûre d'un arthropode
315 infecté au niveau de la peau. La dose de virus inoculée par le moustique dans les conditions
316 naturelles n'est pas connue avec exactitude mais il semblerait qu'elle se situe entre 3 et 4
317 \log_{10} PFU pour YFV (88). La route de progression dans le corps n'a pas été clairement établie
318 (Fig. 8). Il apparaît que pour tous les flavivirus, les cellules dendritiques (DCs) du derme
319 notamment les DCs résidentes appelées cellules de Langerhans, mais aussi les kératinocytes et
320 les macrophages soient les premières cellules à être infectées. Les DCs migrent à partir du site
321 de piqûre vers les ganglions lymphatiques où les virus vont se répliquer activement puis être
322 disséminés dans la circulation et aux organes.

323 Dans le cas des virus encéphaliques, ils entrent alors dans le système nerveux central en
324 traversant la barrière hémato-encéphalique par un mécanisme non défini.

325 Les virus à fièvres hémorragiques, DENV et YFV, sont caractérisés par des fortes fièvres et
326 des fuites capillaires associées à une réduction du volume plasmatique et un défaut du
327 système de coagulation. Paradoxalement, les formes sévères de la maladie de dengue sont
328 caractérisées par une augmentation de la perméabilité vasculaire sans dommage
329 morphologique des endothéliums capillaires (18). Ces pathologies sont également associées à
330 une atteinte multi-organes comme des atteintes du cœur, des reins et du foie où des antigènes
331 viraux ont été détectés. Cependant, l'étendue de la réplication virale dans ces tissus et leur
332 contribution dans la pathologie n'est pas encore claire. La réplication virale dans le foie
333 semble tout de même critique dans l'établissement de la maladie fièvre jaune (89).

334 Bien que des effets cytopathiques directs des virus puissent contribuer à la sévérité de la
335 maladie, des dérégulations de la réponse immunitaire innée semblent également jouer un rôle
336 important dans ces pathologies.

337

338 *5.2 Maladies*

339 La plupart des cas d'infection par les flavivirus sont asymptomatiques variant entre 50% des
340 cas pour YFV et 90% des cas pour DENV.

341 Pour l'ensemble des flavivirus, après environ 1 semaine d'incubation, certains symptômes
342 peuvent apparaître. Le plus souvent, ces symptômes sont de type grippal incluant de la fièvre,
343 des maux de tête, des courbatures associées à des douleurs abdominales, des nausées et
344 vomissements. Les symptômes peuvent ensuite évoluer vers une maladie aux symptômes
345 sévères (Tab. 2). Dans le cas de DENV, il arrive également parfois que les symptômes

Virus	Proportion de cas asymptomatique	Symptômes modérés	Symptômes sévères	Taux de mortalité	Séquelles	Références
YFV	50%	symptômes de type grippal (fièvre, maux de tête, courbatures), nausée, douleur abdominale, vomissements	hémorragie associée à une thrombocytopénie + atteinte du foie (transaminase > 1000 IU/L, jaunisse, hépatomégalie) + atteinte multi-organe : système nerveux (léthargie, agitation) cœur, rein, poumon	12 à 25%	Non	(90)
DENV	50 - 90%	symptômes de type grippal, nausée, douleur abdominale, vomissements	hémorragie associée à une thrombocytopénie + atteinte multi-organes : -foie (transaminase > 1000 IU/L, jaunisse, hépatomégalie) - système nerveux (léthargie, agitation) - cœur, rein, poumon	5% (20 000 personnes/an)	Non	(91)
ZIKV	80%	symptômes de type grippal, nausée, douleur abdominale, vomissements, conjonctivite	atteinte neurologique (microcéphalie, atteinte de Guillain-Barré)	84 cas reportés (sans compter les avortements)	Oui	(92)
JEV	1:25 à 1:1000	symptômes de type grippal, nausée, douleur abdominale, vomissements	atteinte neurologique (méningite, myélite, encéphalite)	20 à 30% des cas	Oui 20 à 50% des cas	(93)
WNV	80%	symptômes type grippal, nausée, douleur abdominale, vomissements	atteinte neurologique (encéphalite, méningite, désorientation, coma, paralysie)	0,6%	Oui	(94)

Tableau 2 : Symptômes induits par les flavivirus

346 grippaux ne soient pas visibles et que seule la forme sévère est détectée. Les 4 sérotypes de
347 DENV peuvent être responsables des 3 formes cliniques suivantes : la dengue avec ou sans
348 signes annonciateurs d'une progression de la maladie vers une forme sévère et la dengue
349 sévère. Différents signes annonciateurs d'une forme sévère ont été répertoriés par l'OMS :
350 des douleurs abdominales, des vomissements persistants, des signes d'épanchements
351 liquidiens, des saignements muqueux, une léthargie ou une agitation, une hépatomégalie (>2
352 cm), ou encore une augmentation de l'hématocrite ($\geq 20\%$) concomitante avec une diminution
353 rapide des plaquettes. L'apparition de signes d'alarme doit conduire à une exploration et une
354 prise en charge hospitalière immédiate. La forme sévère de la maladie se caractérise par des
355 fuites plasmatiques importantes et des dommages au niveau des organes incluant une atteinte
356 hépatique caractérisée par une montée du taux de transaminases (> 1000 IU/L) et une atteinte
357 du système nerveux central du patient (95).

358 Après une possible période de rémission de courte durée, la phase de sévérité de la fièvre
359 jaune est appelée phase d'intoxication. Elle est caractérisée par une recrudescence de fièvre,
360 une jaunisse, des syndromes hémorragiques, une thrombocytopénie ainsi qu'une atteinte
361 multi-organes touchant principalement le foie et le rein. La réplication virale dans le foie
362 semble critique dans l'établissement de la maladie fièvre jaune (89). Dans près de de la moitié
363 des cas, la maladie évolue vers une forme sévère. Les survivants n'ont pas de séquelle notable.

364 Aussi bien dans le cas de DENV que YFV, l'explication de l'évolution d'une forme à l'autre
365 de la maladie n'est pas connue. Le phénotype clinique semble principalement affecté par
366 l'âge, la prédisposition génétique et le statut immunitaire (98)(99). De nombreuses études
367 s'accordent en effet à dire que les individus d'âges extrêmes, enfants ou personnes âgées, ont
368 un risque plus élevé de développer une pathologie sévère (96–98). Dans le cas de la dengue,
369 les formes sévères surviendraient plus fréquemment chez des individus de moins de 15 ans
370 (99). De plus, certains facteurs de comorbidité tels que les maladies cardiovasculaires, le
371 diabète ou la drépanocytose peuvent également favoriser le développement de formes sévères
372 (100,101). La malnutrition a aussi un impact sur la pathologie (102).

373 Dans le cas de l'infection par DENV, une ré-infection par un sérotype différent de celui ayant
374 induit l'infection primaire pourrait également être un facteur de risque de progression vers une
375 forme grave (103,104). Certaines études reportent que le sérotype pourrait également être
376 associé à la sévérité de la pathologie. Le plus souvent, c'est DENV-2 qui corrèle avec la
377 sévérité (105–107). Cependant, ce point est controversé puisque certaines études ne trouvent
378 pas de corrélation entre sérotype et sévérité (108) ou bien l'associe à un autre sérotype (109).

379 Enfin, la virulence des souches est également un facteur important qui peut aussi moduler le
380 degré de sévérité de la maladie (110).

381

382 **6. Rôle de l'immunité dans la pathogenèse induite par les flavivirus**

383 Que ce soit pour l'immunité innée ou pour l'immunité adaptative, le système immunitaire
384 semble jouer un double rôle dans l'infection des flavivirus : d'une part dans la protection

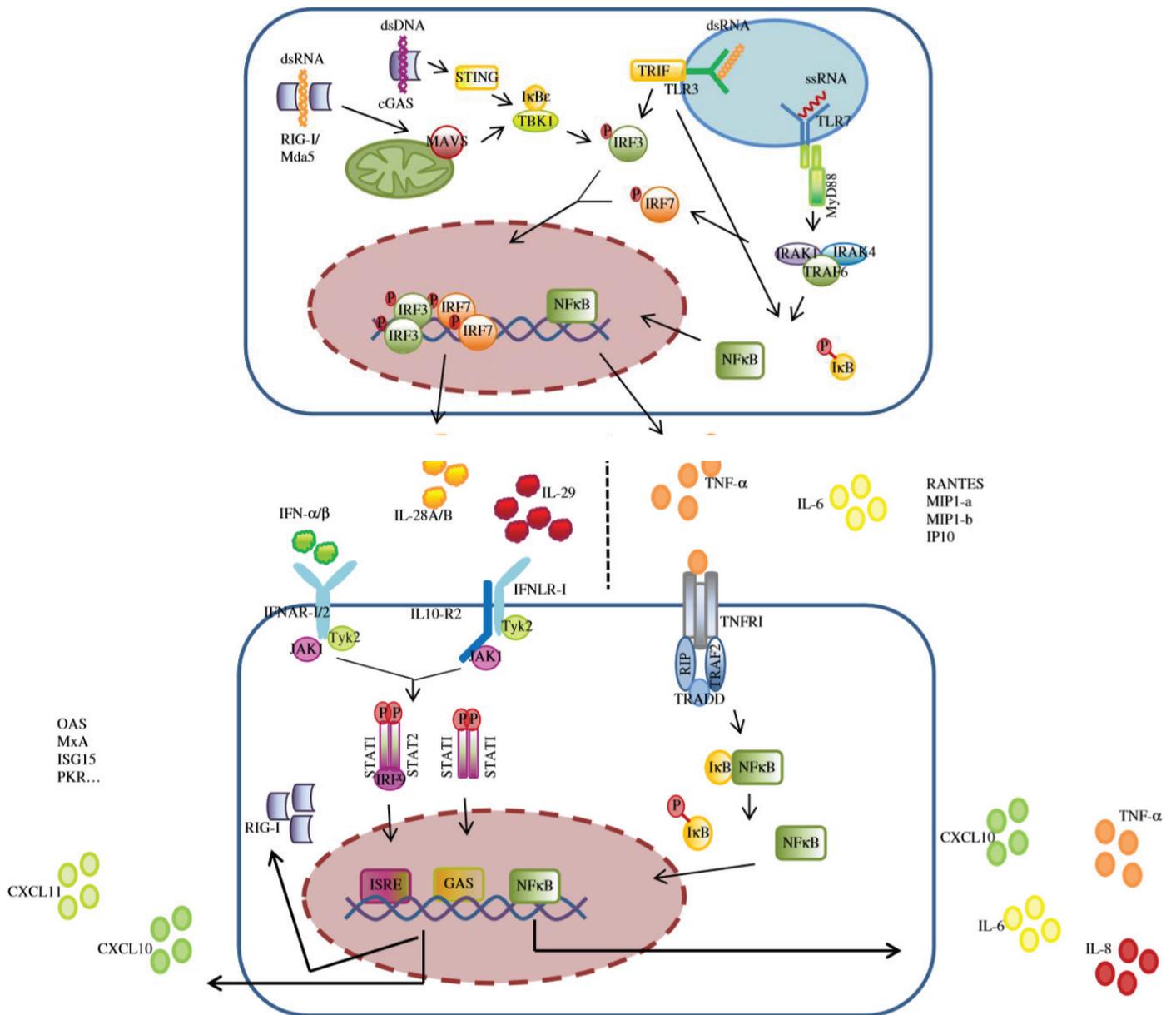


Figure 9: Voies de signalisation de l'immunité innée (111).

Les cellules humaines possèdent des PRRs qui permettent la reconnaissance de différents PAMPs de pathogènes. Cette reconnaissance entraîne une cascade de signalisation intracellulaire qui conduit à la sécrétion de cytokines et chimiokines dont les IFN-I (IFN- α/β), les IFN-III (IL-28/29) et TNF- α . Ces molécules vont se fixer sur leur récepteur respectif présent sur les cellules infectées et les cellules avoisinantes entraînant une cascade de signalisation qui conduit à l'activation des ISGs.

385 contre les virus et leur élimination et d'autre part dans la pathogenèse. Cette dernière est très
386 certainement liée aux stratégies d'évasion que les flavivirus ont développée au cours de leur
387 évolution.

388 *6.1 Immunité innée induite par l'infection des flavivirus*

389 6.1.1. Généralité sur la reconnaissance des virus

390

391 L'immunité innée est la première ligne de défense contre les pathogènes. Un schéma
392 récapitulatif des principales voies de signalisation est représenté dans la figure 9. Pour détecter
393 l'invasion de pathogènes, les cellules de mammifères utilisent des récepteurs membranaires
394 ou cytosoliques regroupés sous le nom de récepteurs de reconnaissance de motifs
395 moléculaires (PRR, acronyme de Pattern Recognition Receptor). Ces récepteurs sont des
396 protéines capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (en anglais
397 Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMPs) ou associés aux dommages tissulaires (en
398 anglais Damage-Associated Molecular Pattern, DAMPs). Les PRRs sont classés en 4
399 catégories : les récepteurs de type Toll (en anglais Toll-like receptors, TLR), les récepteurs de
400 type RIG-I (Retinoid-inducible gene I (RIG-I)-Like Receptors (RLR), les récepteurs de type
401 NOD (NOD like-receptors, NLRs) et les récepteurs de lectines de type C (C-type lectin
402 receptors, CLR). La fixation du ligand aux PRRs entraîne l'activation de protéines
403 adaptatrices conduisant à la mise en place d'une cascade de signalisation. Celle-ci conduit à
404 l'activation de facteurs de transcriptions tels que IRF3, IRF7, NF- κ B, ATF2 et AP-1 qui une
405 fois activés entraînent la transcription de gènes codant pour de nombreuses cytokines dont les
406 interférons (IFN) de type I (IFN- α/β) et IFN de type III (IFN λ ou IL28/IL29) (112). Chacun
407 des IFN sécrétés se lie à son récepteur présents à la surface des cellules infectées et cellules
408 non infectées voisines, conduisant à l'activation de la voie JAK / STAT (113). Cette
409 stimulation conduit à la formation de l'hétérodimère STAT1/STAT2 qui migre dans le noyau
410 et s'associe à IRF9 formant le complexe appelé ISGF3. Celui-ci active les éléments
411 régulateurs stimulés par l'IFN (ISRE), favorisant l'expression de plus d'une centaine de gènes
412 regroupés sous le nom de gènes stimulés par les IFNs (ISGs) (114). Les ISGs ont un très large
413 spectre d'activité qui peut être divisé en trois catégories : les effecteurs anti-viraux qui ont une
414 action directement contre les virus (ex : OAS/RNaseL, IFITM), les régulateurs positifs de la
415 voie de signalisation IFN (ex : cGAS, IRF, RLRs) et ceux qui sont inhibiteurs de la voie IFN
416 (ex : SOCs, USP18) (115).

417

418 6.1.2 TLRs

419

420 Les TLRs sont des protéines transmembranaires présentes au niveau des membranes
421 plasmiques des cellules ou en intracellulaire au niveau des endosomes. Il existe 10 TLRs
422 chez l'Homme nommés TLR1 à 10 (116). TLR3, -7, -8, et -9 sont capables de détecter les
423 ARNs ou ADNs viraux simple ou double brin. Ils sont présents au niveau de la membrane des
424 endosomes. A l'inverse, TLR1, -2, -4, -5, et -6 sont localisés à la surface de la cellule et sont
425 majoritairement décrits comme reconnaissant des PAMPs des parois et des membranes
426 bactériennes. Cependant ils sont également capables de reconnaître quelques PAMPs viraux

427 tels que l'hémagglutinine du virus de la rougeole (117) ou encore des protéines non
428 structurales (118).

429 Différents TLRs sont impliqués dans la réponse face à l'infection des flavivirus.
430 Cependant, il semble que les flavivirus n'induisent pas les mêmes TLRs et que la fonction
431 d'un même TLR peut-être différente selon le virus (119,120). Prenons l'exemple du TLR3.
432 D'un côté, sa surexpression *in vitro*, entraîne la production de cytokines et inhibe la
433 réplication de DENV suggérant un rôle important de ce TLR dans la réponse antivirale (119).
434 D'un autre côté, TLR3 a été montré comme favorisant l'infection par WNV en facilitant
435 d'une part sa réplication dans les cellules nerveuses et d'autre part sa propagation dans le
436 cerveau (120).

437 Concernant les autres TLRs, l'expression de TLR2 et TLR4 est augmentée dans les
438 monocytes de patients infectés par DENV (121). Dans le cas de YFV, à notre connaissance
439 seule des données au sujet des TLRs induits suite au virus atténué 17D sont disponibles dans
440 la littérature. Suite à la vaccination, l'expression des TLR3 et TLR9 est augmentée dans les
441 cellules NKs (pour en anglais « Natural Killer ») (122) et celle de TLR7 dans les cellules
442 mononucléées sanguines périphériques (PBMC) (123). De plus, l'activation des cellules
443 dendritiques *in vivo* semble dépendant des TLR2, 7, 8 et 9 (124).

444

445 6.1.3 RLRs

446 Les membres de la famille des RLRs, RIG-I et MDA5 sont des protéines ubiquitaires
447 cytosoliques capables de détecter les virus à ARN. Plusieurs études ont démontré que RIG-I
448 reconnaît préférentiellement les ARNs simple brin à l'extrémité 5' triphosphates libre.
449 Cependant Kato *et al.* ont montré plus récemment que RIG-I et MDA5 peuvent tous deux lier
450 l'ARN double brin de façon longueur dépendante : RIG-I lierait et serait activé par les petits
451 ARNs double brin tandis que MDA-5 reconnaîtrait les génomes ARN double brin de grande
452 taille ou les long duplexes d'ARN produits durant la réplication du génome. Un troisième
453 membre de la famille des RLRs a été décrit : LGP2 (125). Tout d'abord décrit comme
454 inhibiteur de la voie des RLRs (126), LGP2 apparaît aujourd'hui comme régulateur positif de
455 RIG-I et MDA-5 (127).

456 Concernant les flavivirus, RIG-I a été montré comme impliqué dans la reconnaissance
457 de tous les flavivirus testés à ce jour à savoir JEV, WNV et DENV (128). MDA-5 participe
458 aussi à la résistance de l'infection de DENV (129). Le rôle des RLRs dans le contrôle de YFV
459 n'a pas été encore étudié. Cependant, RIG-I, MDA-5 et LGP2 ont leur expression augmentée
460 dans les PBMC issues d'individus vaccinés par YFV-17D suggérant un possible rôle de ces
461 PRRs dans la réponse à YFV *in vivo* (123).

462 6.1.4 NLRs

463 Les NLRs détectent des DAMPs de l'environnement cellulaire. La détection de ces
464 signaux de danger conduit à la formation d'un complexe de signalisation appelé
465 inflammasome qui conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de la famille des
466 IL-1 β incluant IL-1 β , IL-18 et IL-33. Ces cytokines se fixent ensuite à leur récepteur respectif
467 conduisant à l'activation de NF- κ B (130). Certains NLRs comme NOD1 and NOD2 peuvent

468 conduire à l'activation des IRF et des voies NF- κ B et MAPK favorisant la production d'IFN.
469 A l'inverse, d'autres NLRs ont été démontrés comme inhibant la signalisation IFN, par
470 exemple les NLRs, NLRX1 et NLRC5 (131,132).

471 Les infections de DENV chez l'Homme sont associées à un taux d'IL-1 β élevé dans le
472 sang suggérant une activation potentielle de l'inflammasome (133,134). Des études *in vitro*
473 suggèrent en effet que l'inflammasome NLRP3 est activé suite à l'infection de DENV
474 (133,135). Dans le cas de YFV, IL-1 β a été trouvé induit *in vitro* aussi bien par la souche
475 sauvage de YFV que la souche atténuée (136). Suite à la vaccination, l'expression des
476 caspases 1 et 5 est augmentée. Ces 2 caspases étant présentes dans la voie de l'inflammasome
477 NLRP1 indique un potentiel activation cette voie suite à l'infection de 17D (137)

478

479 6.1.5 CLR

480 Les CLR comprennent un grand nombre de protéines qui reconnaissent une grande
481 diversité de ligands. Décrits comme majoritairement favorables à une protection contre les
482 pathogènes champignons et bactériens, dans le cadre d'une infection virale les CLR semblent
483 plutôt en faveur de l'infection et de la propagation virale (138). Nous avons en effet décrit en
484 amont de cette partie, que la protéine DC-SIGN est un co-récepteur facilitant l'entrée des
485 flavivirus dans les cellules cibles. Néanmoins, il semble que d'autres CLR soient plutôt en
486 faveur de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires suggérant qu'un rôle antiviral puisse
487 leur être aussi assigné.

488 Chen *et al.* ont noté que CLEC5 peut interagir directement avec DENV conduisant au
489 relargage de cytokines pro-inflammatoires (139).

490 6.1.6 Autres récepteurs

491 Plus récemment, il a été montré que la voie cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-STING,
492 qui habituellement reconnaît les virus à ADN, est aussi capable de reconnaître les virus à
493 ARN incluant DENV (140). La mécanistique de reconnaissance n'est pas encore bien
494 comprise mais certains dommages mitochondriaux induits par DENV semblent impliqués
495 dans le processus (141).

496 D'autres récepteurs de surface incluant les récepteurs du complément ainsi que des
497 récepteurs Fc participent à la mise en place d'une réponse immunitaire innée efficace. La
498 fixation du ligand entraîne une cascade de signalisation intracellulaire qui conduit à la
499 production et au relargage de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines.

500

501 6.2 Mécanismes d'évasion de l'immunité innée

502 Grâce à leurs protéines NS et aux ARN sf, les flavivirus ont mis en place des stratégies
503 d'évasion permettant de détourner les voies de l'immunité innée (Fig. 10). Nous ne
504 répertorions ici que celles mises en place par DENV et YFV.

505 6.2.1 Par les protéines NS

506 Les protéines structurales peuvent interférer à plusieurs niveaux en amont et en aval des voies
507 de signalisation de l'IFN-I.

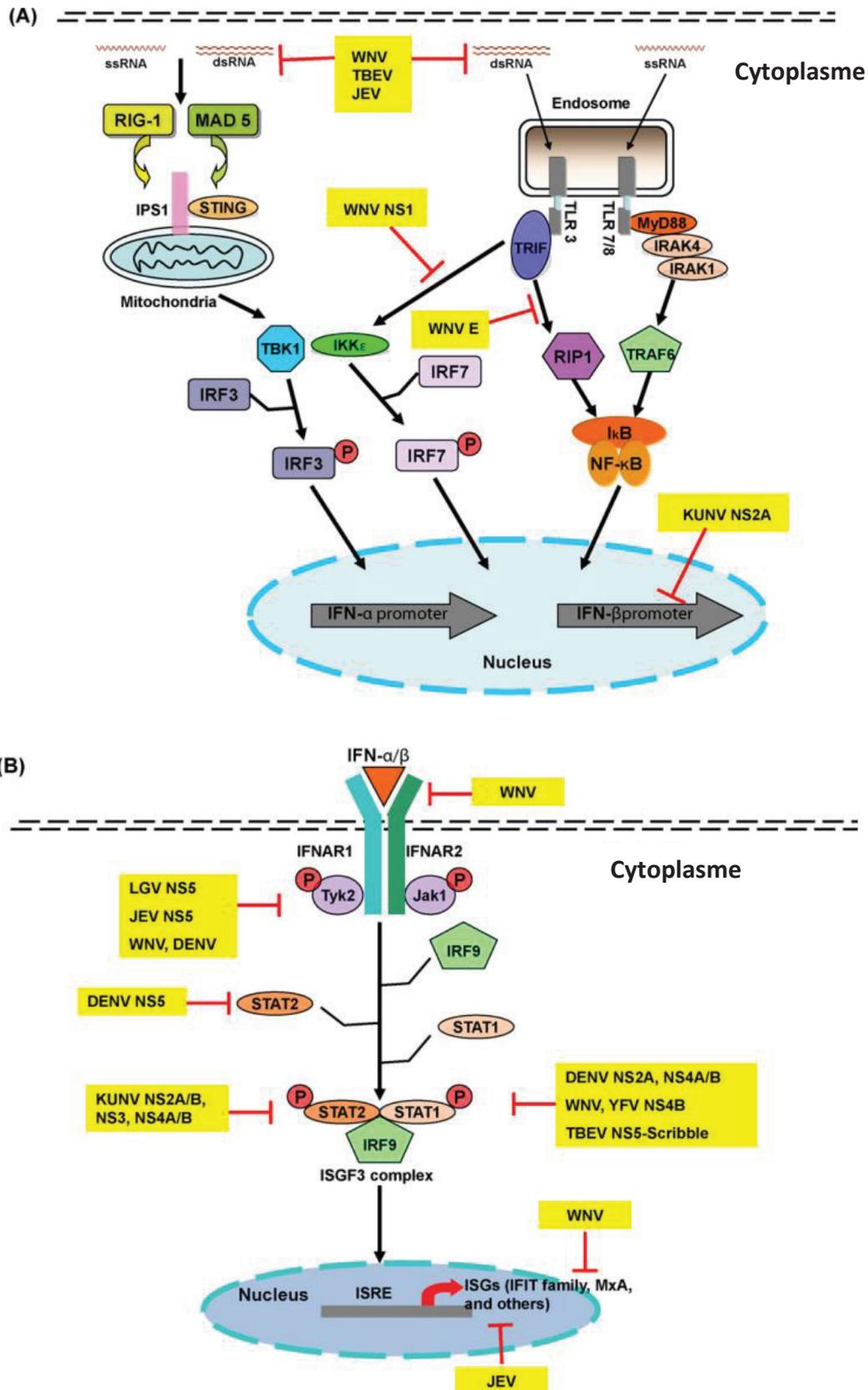


Figure 10: Détournement des réponses immunitaires innées par les protéines non structurales des flavivirus (142) (A) Détournement des voies en amont de la transcription des gènes IFN-I (B) Détournement des voies en aval des protéines IFN-I

508 Sur les voies de signalisation en amont de l'IFN :

- 509 - NS4A de DENV empêcherait la phosphorylation du complexe TBK1/IRF3 (143). Elle
510 pourrait également agir comme protéine séquestratrice de MAVS, évitant l'interaction
511 de MAVs avec RIG-I (144).
- 512 - NS2B de DENV peut se lier au récepteur cGAS conduisant à sa dégradation
513 lysosomale (145).
- 514 - Le complexe NS2B-NS3 interagirait également avec la kinase de la famille des
515 Ikk(146). Il est également capable d'interférer avec IFN-I notamment à travers le
516 clivage de STING, protéine adaptatrice de cGAS et de RIG-I,MDA-5 (147). NS4B de
517 YFV peut serait également capable d'interagir avec STING (148)
- 518 - NS3 de DENV utilise un autre mécanisme. Elle entre en compétition avec RIG-I et
519 fixe la protéine chaperone 14-3-3 ϵ , responsable du déplacement du complexe RIG-I-
520 ARN à la membrane mitochondriale (149).
- 521

522 En aval de l'IFN, les protéines ciblées sont essentiellement STAT1 et STAT2.

- 523 - Différents mécanismes inhibant l'activité de STAT1 ont été reportés. Ils consistent
524 soit à un blocage de sa phosphorylation soit à inhiber sa translocation nucléaire.
525 NS2A, NS4A, NS4B de DENV et NS4B de YFV en seraient capables (150).
- 526 - NS5 de DENV pourrait également se lier et induire la dégradation de STAT2 à travers
527 le protéasome (151,152). Pour YFV, la protéine NS5 pourrait interagir uniquement
528 avec STAT2 phosphorylé en la présence d'IFN-I et une ubiquitine ligase (153).

529 De façon intéressante, certains mécanismes d'évasion semblent réalisés uniquement par
530 certaines souches au sein d'une même espèce de flavivirus. Par exemple, l'étude de
531 Dalrymple *et al.* démontre que, contrairement à DENV-2 et DENV-4, seule la NS4A de
532 DENV-1, est capable de bloquer la signalisation de RIG-I en inhibant la phosphorylation de
533 TBK1/IRF3 (143). L'émergence de mutations au sein des protéines NS au cours de
534 l'évolution pourrait expliquer ces différences d'évasion comme le montre l'étude récente avec
535 ZIKV où une mutation dans NS1 apparue après 2012 dans le génotype asiatique confère la
536 capacité à cette protéine d'inhiber l'IFN-I (154).

537 6.2.2 Par l'ARN sf

538

539 Chez DENV, les ARN sf impactent négativement l'induction de l'interféron en se liant à
540 TRIM25, une ubiquitine ligase qui facilite l'interaction de RIG-I avec MAVS (155,156). Les
541 ARN sf jouent aussi un rôle dans l'expression d'ISGs au niveau post-transcriptionnel. En
542 effet, les ARN messenger codant pour les protéines G3BP1, BP2 et CAPRIN, qui sont des
543 ISGs impliqués dans la traduction d'autres ISG, peuvent être la cible des sfRNA. (157).

544 Liu *et al.* démontrent également que les ARN sf de DENV sont capables de moduler les voies
545 Bcl2 et AKT/PI3K conduisant à la mort cellulaire des cellules (158). De façon intéressante,
546 des souris infectées par WNV déficient dans la production d'ARN sf survivent toutes alors

547 que toutes succombent lors de l'infection par le virus sauvage. Les ARN sf pourraient donc
548 moduler la pathogenèse des flavivirus (28).

549 **6.3 Facteurs solubles :**

550 • Complément :

551 Le système du complément est une cascade biochimique de plus de 35 protéines qui jouent un
552 rôle important dans la réponse immune innée contre différents pathogènes à travers leur lyse,
553 la chimioattraction, l'opsonisation et l'activation des mastocytes.

554 Le rôle de protection du complément a été par exemple visualisé *in vivo* chez la souris C3^{-/-}.
555 Celle-ci est plus susceptible à l'infection par WNV avec une propagation virale plus
556 importante et une réduction du titre d'anticorps (159). Des études récentes ont démontré que
557 le complément serait également capable de diminuer les infections de flavivirus en
558 restreignant le mécanisme d'ADE (160). Cependant, DENV, YFV et WNV semblent avoir
559 développés des techniques de détournement du système de complément notamment par le
560 biais de la protéine NS1 (161–163). Finalement, le complément a aussi été décrit comme
561 pouvant favoriser la pathogenèse des flavivirus. En effet, un taux élevé de certaines protéines
562 du complément a été retrouvé chez les patients atteints de dengue sévère (164,165).

563 • Cytokines et chimiokines :

564 Le rôle des cytokines et chimiokines dans la protection est indispensable comme l'indiquent
565 les études sur souris déficientes aux récepteurs d'IFN-I ou déficientes aux récepteurs CCR5,
566 récepteurs de chimiokines. Les souris meurent rapidement suite aux infections par DENV
567 (166). Dans le cas de YFV, le rôle des IFN-I paraît aussi indispensable à la protection contre
568 le virus. Les souris IFN-I ^{-/-} sont hautement susceptibles à l'infection de YFV sauvage
569 conduisant à la mort des souris (167).

570 Cependant, une réponse immunitaire exacerbée de l'hôte semble jouer un rôle direct dans la
571 pathogenèse des flavivirus et porte le nom de choc cytokinique. Dans le cas de la maladie
572 sévère de la dengue et de la fièvre jaune, il est pensé que ce choc cible l'endothélium
573 vasculaire pouvant conduire à une augmentation de la perméabilité vasculaire, donnant lieu à
574 des manifestations hémorragiques responsables de la pathologie (168,169). Des taux élevés de
575 cytokines proinflammatoires et de chimiokines sont retrouvés chez les patients atteints de
576 dengue. La plupart de ces molécules sont retrouvées à un niveau plus élevées chez les patients
577 atteints de forme sévère. C'est le cas par exemple du TNF- α (170), des interleukines IL-6, IL-
578 8, IL-13 et IL-18 (171–173). Dans le cas de la maladie fièvre jaune, la contribution des
579 médiateurs inflammatoires a aussi été démontrée. Le niveau d'IL-6, MCP-1, IP-10, TNF α et
580 IL-1RA a été retrouvé statistiquement plus élevé chez les patients atteints de la forme fatale
581 de la maladie que chez les patients atteints de la forme hémorragique non fatale (174).

582

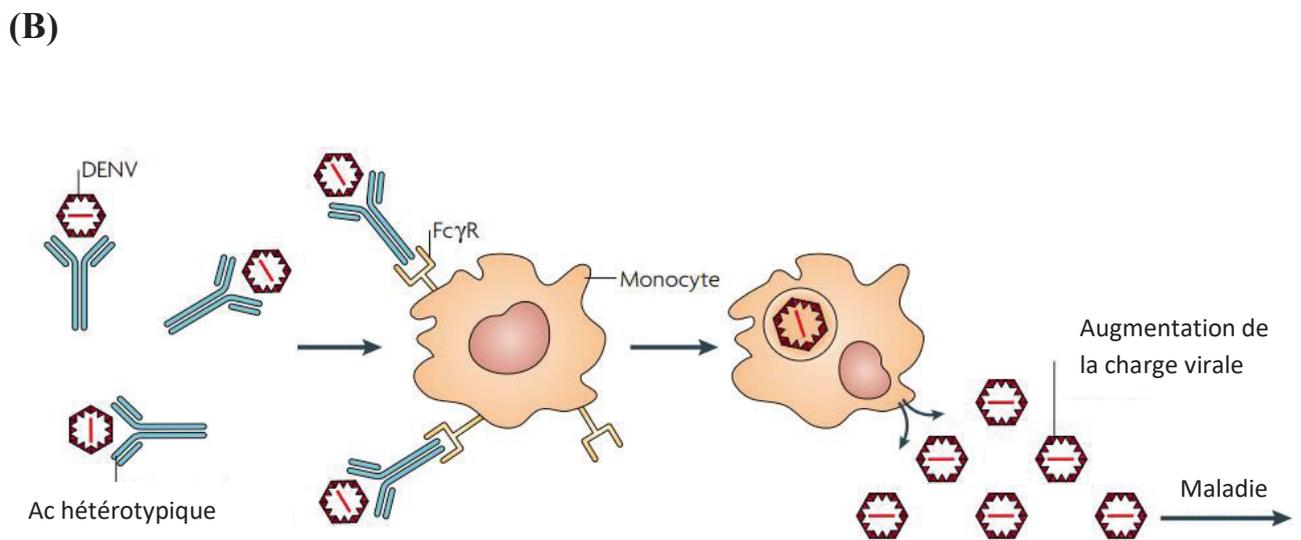
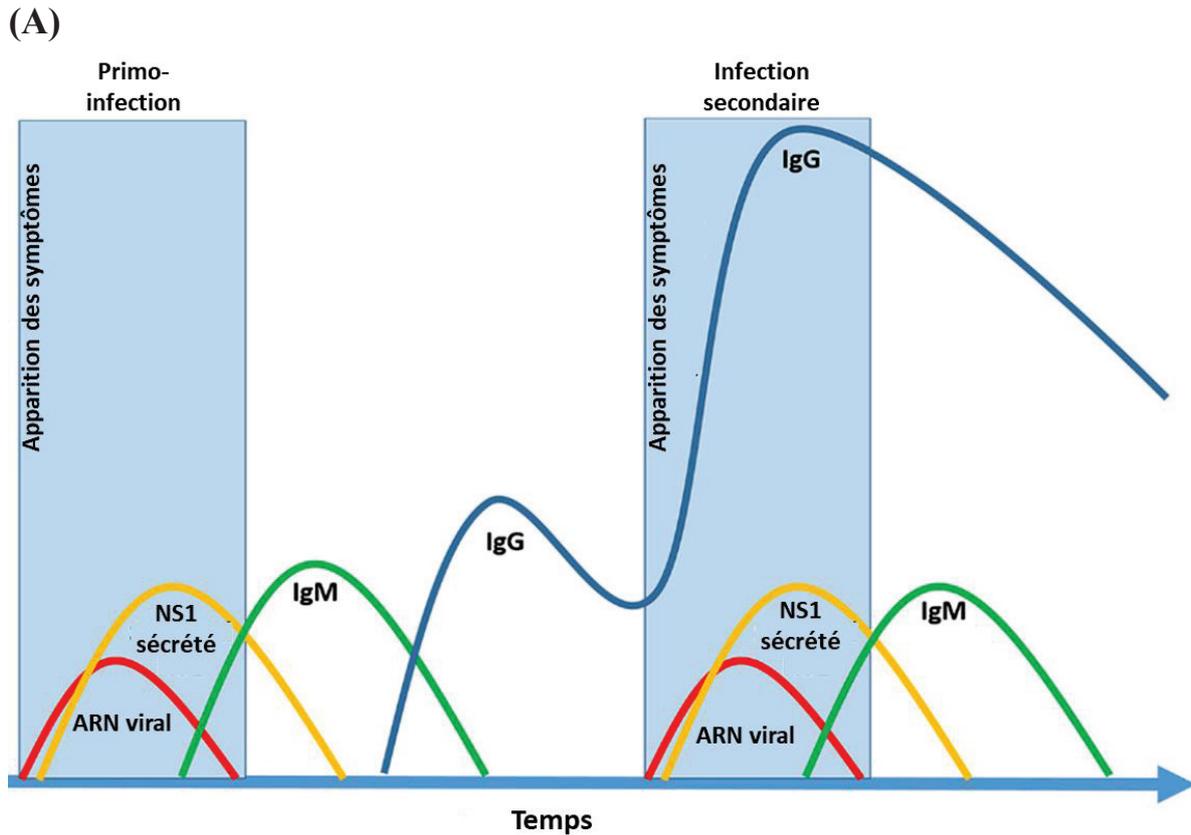


Figure 11: Conséquence d'une infection secondaire (A) Profil schématique de la quantité d'ARN viral de NS1, des anticorps anti-flavivirus IgM et IgG dans le sang après une première et une seconde infection (175). (B) Facilitation de l'infection dépendante des anticorps (ADE). L'ADE a lieu lors d'une infection hétérotypique, les anticorps (Ac) non neutralisants d'une primo-infection se lient aux particules virales de la nouvelle infection. Ce complexe Ac-virus s'attache aux récepteurs Fc γ présents à la surface de cellules puis est internalisé (176)

583 6.4 Réponse adaptative :

584 6.4.1 Réponse humorale

585 Lors de l'infection par les flavivirus, la réponse humorale est importante pour le contrôle de
586 l'infection virale et de la dissémination des virus. Ce contrôle est principalement établi par des
587 anticorps neutralisants qui ciblent des épitopes localisés sur la protéine E. Ces anticorps
588 inhibent l'attachement du virus et/ou dans une étape en aval de l'attachement (177).

589 Cependant des réponses humorales différentes ont été établies entre les flavivirus. Par
590 exemple, chez la souris déficiente en lymphocytes B fonctionnels, la dissémination et la
591 persistance de WNV est beaucoup plus longue que chez les souris non mutées (178) alors que
592 dans le cas d'une infection par DENV, aucun impact ni sur la sévérité de la pathologie ni sur
593 la virémie n'est remarqué (166).

594 Lors d'une infection primaire (ou primo-infection), une réponse IgM se met tout d'abord en
595 place puis une réponse IgG qui est généralement plus élevée après la deuxième semaine de la
596 maladie. Au cours d'une infection secondaire, la réponse en IgG augmente généralement plus
597 rapidement (Fig. 11A). Les anticorps homotypiques neutralisants, spécifique du virus
598 rencontrés, confèrent une protection à vie contre le virus. Dans le cas de DENV par exemple,
599 l'infection par un sérotype de DENV confère chez le sujet une protection à vie contre ce
600 sérotype (179).

601 Les anticorps IgG ont également une réactivité croisée entre les flavivirus, connus sous le
602 nom d'anticorps hétérotypiques neutralisants, qui confèrent une certaine protection. Par
603 exemple, une première infection par JEV, YFV ou DENV-1 confère une protection contre une
604 infection secondaire de YFV chez le hamster (180). De plus, chez l'Homme, les personnes
605 primo-infectées par DENV semblent moins sujets à des formes sévères de YFV que les sujets
606 naïfs (181). Du fait de cette cross-réactivité, le diagnostic par détection des anticorps IgG et
607 IgM par technique ELISA fait face à un réel défi.

608 Il existe en revanche des anticorps à réactivité croisée mais non neutralisants qui pourraient
609 favoriser une infection secondaire plus sévère (182), expliquée par le mécanisme d'ADE
610 surtout décrit dans le cas des infections DENV (179,183) et JEV (184). L'ADE a lieu
611 lorsqu'un virus complexé à un anticorps entre dans une cellule via un récepteur Fcγ (Fig.
612 11B). Ce phénomène a été montré *in vitro* comme favorisant la réinfection des flavivirus dans
613 des lignées de macrophages (46,185). Les évidences *in vivo* sont plus controversées. Chez la
614 souris, certaines pré-expositions aux anticorps favorisent la progression de la pathogenèse
615 alors que pour d'autres aucun impact sur l'infection n'est visualisé (186–188). Chez l'homme,
616 l'évidence est indirecte. Les sera de patients atteints de dengue fatale développent des
617 mécanismes d'ADE *in vitro* plus importants que les patients atteints de dengue non fatale
618 (189,190). De plus, une étude récente réalisée sur une cohorte de patients démontre une
619 corrélation directe entre le niveau d'anticorps pré-existant et la sévérité de la dengue. Les
620 auteurs définissent un intervalle de titre d'anticorps pour lequel le risque de sévérité est élevé.
621 Cet intervalle est beaucoup plus large dans le cas d'une infection secondaire que lors d'une
622 primo-infection. Néanmoins que ce soit lors d'une primo-infection ou lors d'une infection
623 secondaire, un fort taux d'anticorps est protecteur de l'infection (104).

624 La théorie de l'ADE comme facteur d'aggravation de la sévérité est un sujet controversé et
625 n'est pas admis par l'ensemble de la communauté scientifique. Une deuxième théorie postule
626 que l'infection secondaire par DENV conduit à l'expansion dominante de lymphocytes T
627 (LTs) cross-réactifs de faible affinité pour les antigènes du nouveau sérotype. La
628 reconnaissance des nouveaux peptides par ces LTs induirait une production anormale de
629 cytokines par ces cellules, pouvant être responsables du choc cytokiniques observé chez
630 certains patients. Cette théorie est connue sous le nom de «péché antigénique d'origine» ou de
631 «peptide modifié ligand» (191).

632 La théorie de l'ADE et celle du « péché antigénique d'origine » ne sont pas mutuellement
633 exclusives et reposent toutes deux sur le fait que l'infection antérieure par la dengue est un
634 facteur de risque de développement d'une maladie plus grave. Cependant, 99% des infections
635 secondaires de dengue sont bénignes et certaines infections primaires peuvent également
636 conduire à une pathologie sévère suggérant que d'autres facteurs pourraient également être
637 impliqués (192,193).

638 6.4.2 Immunité cellulaire :

639 Les chimiokines sécrétées lors de la phase de reconnaissance vont notamment conduire au
640 recrutement des LTs sur le site de l'infection. Les LTs cytotoxiques ou LTs CD8+ sont
641 particulièrement importants pour la clairance des flavivirus (194).

642 Les infections par la dengue sont associées à une réduction du nombre de LTs CD4 +, de LTs
643 CD8 + et de cellules NKs (195). Les niveaux de ces cellules sont les plus bas lorsque la fièvre
644 s'installe et que la phase sévère débute, puis augmentent ensuite. Le nombre de cellules B
645 n'est pas affecté. En accord avec cette suggestion, chez l'Homme, l'étude de S. Green *et al.*
646 montre que les patients atteints de dengue sévère ont une activation des LTs CD8+ plus
647 importante que les patients atteints de dengue non sévère.

648 La protéine CD8 à la surface des LTs cytotoxiques reconnaît la protéine CMH-I à la surface
649 des cellules entraînant une liaison étroite entre le LT et la cellule cible. De nombreux virus ont
650 développé la capacité de diminuer l'expression du CMH-I des cellules infectées de façon à
651 échapper aux LTs. Ce n'est pas le cas des flavivirus qui à l'inverse induisent une
652 augmentation de l'expression des CMH-I et II et l'expression de certaines molécules
653 d'adhésion incluant ICAM-1, VCAM et E-selectin (196). Certains auteurs voient ce paradoxe
654 comme un moyen de favoriser une auto-immunité et donc la destruction de tissu du soi
655 comme observé dans le cas de WNV infection (197).

656 Les LTs CD4+ sont aussi critiques dans la protection contre les flavivirus comme illustré dans
657 le modèle souris infecté par YFV (198). Cependant, leur rôle dans la protection ou la
658 pathogenèse des flavivirus a été moins étudié que celui des LTs CD8+.

659 7. Traitements et approches vaccinales

660 7.1 Traitements

661 Aucun traitement n'est actuellement commercialisé et approuvé pour soigner une infection
662 par un flavivirus. L'administration de drogues non spécifiques comme le paracétamol,

663 l'aspirine et d'autres médicaments non stéroïdiens anti-inflammatoires est utilisée. Toutefois,
664 en cas de suspicion d'infection de DENV ou YFV, la prise d'aspirine et d'anti-inflammatoires
665 est à éviter en raison des propriétés anticoagulantes de ces produits et des risques
666 hémorragiques qui s'y rattachent. Pour pallier à la coagulopathie observée dans ces deux
667 maladies, des transfusions sanguines sont réalisées. Une réhydratation orale ou par
668 intraveineuse est également effectuée.

669 L'insuffisance hépatique aigüe retrouvée dans le cas de la fièvre jaune peut donner lieu à des
670 transplantations du foie. Néanmoins le taux de survie suite à cet acte chirurgical est évalué à
671 20% (199).

672 Des projets de recherche sont en cours pour identifier des molécules anti-virales en réalisant
673 un criblage des chimiothèques existantes, en utilisant des techniques à haut débit ou par des
674 approches par anticorps (pour revue récente voir (200,201)). Le criblage des interactions entre
675 flavivirus et cellules hôtes constitue également un enjeu important pour le développement de
676 petites molécules.

677 Les protéines virales E, NS3 et NS5 sont des cibles attractives pour ces molécules car elles
678 portent des fonctions essentielles pour l'infection. NS3 et NS5 sont les plus étudiées pour les
679 approches médicamenteuses puisque des traitements antiviraux contre d'autres virus (HIV,
680 Herpes par exemple) ciblent déjà les protéases ou polymérases virales. La protéine E est la
681 cible principale des traitements par anticorps même si certains composés sont développés
682 pour empêcher le changement conformationnel de E afin d'éviter sa fusion avec la membrane
683 de l'hôte (202). Des composés aux cibles non spécifiques ont également été rapportés comme
684 le curcumin qui pourrait inhiber DENV-2 (203).

685 *7.2 Approches vaccinales*

686

687 Des vaccins sont disponibles contre YFV, TBEV, JEV et DENV. Différents types de vaccins
688 ont été développés : vaccin vivant atténué, inactivé, vaccin chimérique, vaccin à ADN ou
689 encore des vaccins à sous-unité.

690 Le premier vaccin développé est celui contre YFV. A l'origine le vaccin a été généré par des
691 passages successifs de la souche YFV-Asibi sur des tissus de souris et de poulet. Deux sous-
692 types de 17D sont actuellement utilisés pour la manufacture du vaccin : 17DD par Bio-
693 Manguinhos au Brésil et 17D-204 sous le nom de Stamaril® par Sanofi Pasteur en France,
694 l'Institut Pasteur au Sénégal, l'institut Chumakov en Russie et sous le nom de YF-VAX® par
695 Sanofi Pasteur aux USA et YF Vaccine Live en Chine. Encore aujourd'hui, le vaccin produit
696 par Sanofi Pasteur est amplifié sur œufs. Une seule immunisation entraîne plus de 98% de
697 séroconversion et un taux d'anticorps neutralisants persistants sur plus de 30 ans. Des effets
698 secondaires ont été répertoriés : 38.3/100 000 doses ont provoqué des fièvres, rougeurs et
699 douleurs au site d'injection. Des troubles sévères ont également été reportés dans une
700 proportion comprise entre 1.1 et 4.7/100 000 doses comme des troubles neurologiques ou des
701 atteintes hépatiques similaires à une infection naturelle (204). Des contre-indications à la

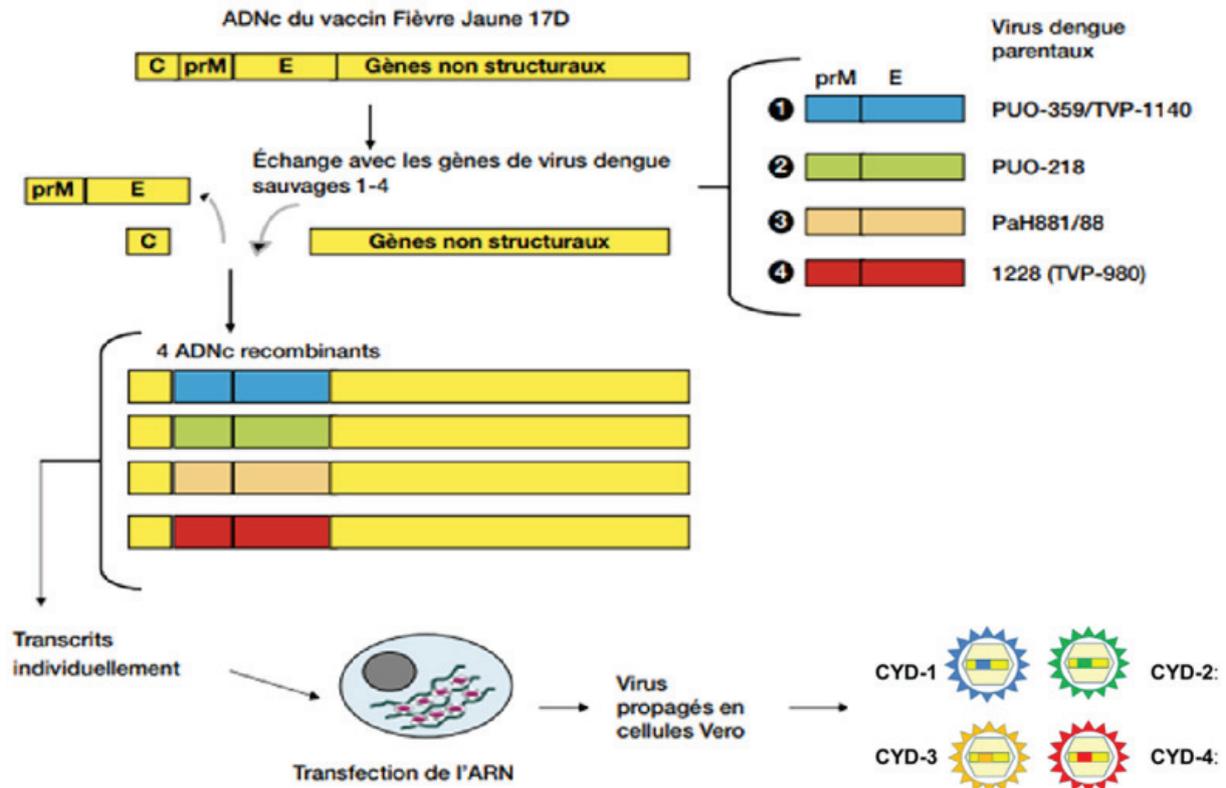


Figure 12: Construction du vaccin CYD-TDV Dengvaxia®. D'après (205,206)

Il s'agit d'un vaccin tétravalent obtenu par clonage des gènes codant les protéines prM et E des souches Dengue 1 Thaïlandaise PUO-359/TVP-1140, Dengue 2 Thaïlandaise PUO218, Dengue 3 Thaïlandaise PaH881/88 and Dengue 4 Indonésienne 1228/TVP-980 dans l'ADN complémentaire codant pour le génome de la souche YF-17D 204 déléetée de ses gènes codant les protéines prM et E.

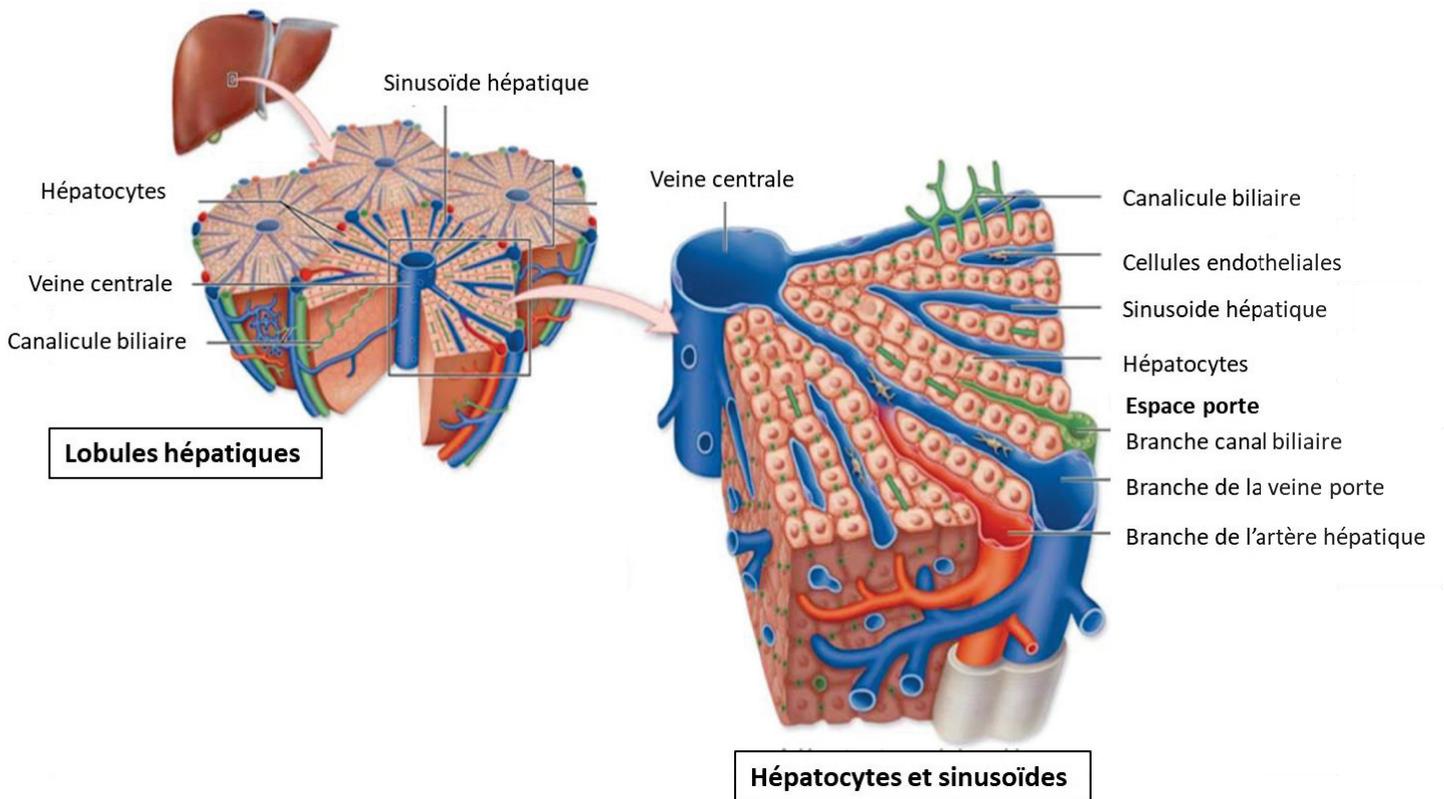
702 vaccination sont ainsi émises pour les enfants de moins de 9 mois, les personnes
703 immunodéprimées et les femmes enceintes (207).

704 Le vaccin 17D est aujourd'hui utilisé pour développer d'autres vaccins contre d'autres
705 flavivirus, ses parties non structurales servant de support dans des vaccins chimériques. C'est
706 le cas du vaccin chimérique ChimeriVax-JE contre la JEV, commercialisé en Thaïlande et en
707 Australie par Sanofi Pasteur basé sur le squelette de 17D dans lequel les protéines pr-M et E
708 sont remplacées par les protéines de la souche JEV SA14614-2. Une approche vaccinale
709 similaire contre ZIKV est également envisagée (208,209).

710 Enfin, le seul vaccin contre DENV actuellement commercialisé utilise également cette
711 technologie de chimère. Il s'agit du vaccin CYD-TDV Dengvaxia[®] développé par Sanofi
712 Pasteur. Il s'agit d'un vaccin tétravalent obtenu par clonage des gènes codant les protéines
713 prM et E des souches Dengue 1 Thaïlandaise PUO-359/TVP-1140, Dengue 2 Thaïlandaise
714 PUO218, Dengue 3 Thaïlandaise PaH881/88 and Dengue 4 Indonésienne 1228/TVP-980 dans
715 l'ADN complémentaire codant pour le génome de la souche YF-17D 204 déléetée de ses gènes
716 codant les protéines prM et E (Fig. 12). Le vaccin est composé d'un mélange lyophilisé
717 unidose des quatre valences à $5 \log_{10} \text{DICCC}_{50}$ de chaque sérotype (205). Enregistré pour la
718 première fois en 2015 au Mexique, il est recommandé pour des individus de 9 à 45 ans
719 vivants dans des zones endémiques. Son efficacité de protection a tout d'abord été évalué en
720 Thaïlande en phase 2b (210) puis à plus grande échelle sur 2 études cliniques en phase III en
721 2014 comptant plus de 30 000 participants âgés de moins de 16 ans (211,212). Les participants
722 des 2 études ont reçu 3 doses de vaccin au cours de la première année. Les taux d'efficacité
723 globale pour la dengue symptomatique au cours des 25 premiers mois étaient de 60,3% (IC à
724 95%, 55,7 à 64,5) pour tous les participants des deux études de phase III. Des analyses
725 complémentaires ont récemment confirmé les observations préliminaires d'un rôle majeur de
726 l'exposition antérieure au virus de la dengue dans la performance des vaccins. Les niveaux
727 d'efficacité étaient statistiquement significatifs chez les participants séropositifs mais restaient
728 faibles à modestes chez ceux qui étaient séronégatifs (213).

729 D'autres vaccins sont également en voie de développement parcourant les différentes phases
730 cliniques (pour revue récente voir : (204,214)). Les approches vaccinales contre les flavivirus
731 restent encore un défi aujourd'hui. Certaines pathologies comme celles induites par WNV et
732 ZIKV n'ont pas encore de vaccins approuvés. De plus, même lorsque le produit est
733 commercialisé, la vaccination rencontre des succès variables dus en partie à la nécessité
734 d'administration répétée pour une immunité efficace (ex tous les 4 ans pour TBEV). La
735 variabilité qui existe au sein d'une même espèce de virus augmente également la difficulté de
736 production de vaccins efficaces. C'est le cas de DENV où l'existence des 4 sérotypes rend
737 difficile la découverte d'un vaccin efficace contre l'ensemble des sérotypes. Néanmoins, les
738 bénéfices de la vaccination contre les flavivirus restent indéniables comme l'illustre l'exemple
739 du programme de vaccination contre TBEV conduit en Autriche : le taux de couverture de
740 85% a eu pour conséquence de diminuer drastiquement le taux d'incidence qui est passé de
741 5,7/100 000 personnes (moyenne de 1972 à 1981) à 0,9/100 000 (moyenne de 2002 à 2011)
742 (204).

(A)



(B)

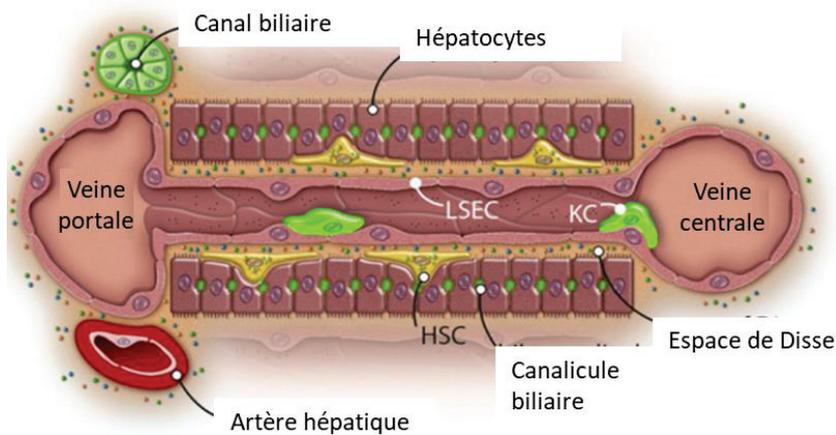


Figure 13 : Architecture du foie (A) Représentation schématique de l'organisation d'un lobule hépatique. Il s'agit de l'unité structurale et fonctionnelle du foie. Traduit de (215) **(B)** Organisation du foie en travée -Traduit de (216). KC : Cellules de Kupffer ; LSEC : cellules endothéliales des sinusoides du foie ; HSC : cellules étoilées du foie.

Partie 2 : L'atteinte hépatique dans le cadre d'une infection par DENV et par YFV

743
744
745

746 Les maladies de la dengue et de la fièvre jaune sont toutes deux caractérisées par des
747 symptômes à fièvres hémorragiques ayant un fort impact sur la santé publique à l'échelle
748 mondiale. Elles sont causées par des virus phylogénétiquement proches, maintenus dans
749 l'environnement dans un cycle écologique similaire. Les formes sévères des maladies sont
750 caractérisées par une atteinte multi-organes en particulier une atteinte au niveau du foie.

1. Le foie

751
752

753 Avec ses 1,5 kg, le foie est le plus gros organe du corps. Il est situé du côté droit de la cavité
754 abdominale, sous le diaphragme, protégé par les côtes.

1.1 Architecture et composition cellulaire

755
756

757 Le foie est entouré d'une capsule conjonctive fibreuse, ou capsule de Glisson, dont les
758 prolongements divisent le foie en plus de 100 000 lobules d'environ 1 à 2 millimètres qui
759 représentent l'unité anatomique du foie (Fig. 13). Chaque lobule hépatique est une structure
760 hexagonale avec au centre la veine centrale (ou centolobulaire) à partir de laquelle les
761 hépatocytes forment des travées à disposition radiaire. Aux coins extérieurs de l'hexagone se
762 trouvent des espaces portes appelés espaces portes de Kiernan. Chacun de ces espaces
763 contient une branche de la veine porte, une branche de l'artère hépatique et une branche du
764 canal biliaire. On dénombre ainsi trois zones au sein d'un lobule : la zone portale, proche de
765 l'espace porte, la région centrolobulaire, proche de la veine centrale et au milieu des deux, la
766 région midzonale.

767 Le sang arrive au foie par deux voies. La première voie est celle de la veine porte où le sang
768 provient des organes rate, pancréas, intestin et est donc riche en nutriments et pauvre en
769 oxygène. Cette veine se divise dans le foie en un réseau de sinusoides séparant les travées
770 d'hépatocytes et dont le sang va représenter 75% du volume sanguin du foie. La deuxième
771 voie est celle de l'artère hépatique issue directement du tronc cœliaque transportant un sang
772 riche en oxygène et pauvre en nutriments. Elle constitue un réseau de capillaires en continuité
773 avec les sinusoides veineux.

774 Les hépatocytes, aussi appelés cellules parenchymateuses, sont les principales cellules du
775 foie (60-70% des cellules) (217). Ils conditionnent et supportent les principales fonctions
776 hépatiques. L'organisation des hépatocytes en travée leur confère une forme polarisée à 3
777 domaines, essentielle pour la sécrétion biliaire et le métabolisme hépatique. La partie basale
778 ou domaine canaliculaire concourt à la constitution des canalicules biliaires. Les canalicules
779 biliaires n'ont pas de paroi propre, leur paroi est constituée de la membrane plasmique des

780 hépatocytes : chaque hépatocyte a une dépression qui forme la moitié d'un canal, et c'est
781 l'accolement de ces 2 hémi-canaux qui forme les canalicules. Ces canalicules se jettent dans
782 des canaux biliaires qui eux sont bordés de cellules spécialisées appelées cholangyocytes
783 représentant 3% des cellules de foie (217). Le domaine latéral des hépatocytes consiste en une
784 interaction inter-hépatocytes. La partie apicale ou domaine vasculaire est le côté par lequel
785 l'hépatocyte est en contact avec les capillaires sinusoides, par l'intermédiaire de l'espace de
786 Disse (218).

787 Les sinusoides sont bordés de cellules endothéliales appelées LSEC (pour Liver Sinusoid
788 Endothelial Cells). Ce sont des cellules hautement spécialisées, différentes des cellules
789 endothéliales qui tapissent la veine porte ou l'artère hépatique, caractérisées notamment par
790 l'absence d'expression des molécules d'adhésion E et P-sélectine. Ainsi, elles ne constituent
791 pas un endoderme jointif mais fenestré permettant le transfert de molécules et protéines du
792 sang vers les hépatocytes. Attachées à la paroi sinusoidale, les cellules de Kupffer (KCs) sont
793 des macrophages hépatiques résidents représentant environ 2% des cellules du foie. Ils jouent
794 le rôle de phagocytes et de sécréteurs de protéases et de cytokines (219).

795 Entre les cellules endothéliales et les hépatocytes se trouve l'espace de Disse qui contient les
796 cellules étoilées (ou cellules de Ito) représentant environ 1,5% des cellules de foie (217). Ces
797 cellules qui stockent la vitamine A sont responsables de la synthèse de facteurs de croissance
798 (ex : HGF) et ont un rôle important dans les processus de fibrose hépatique.

799 Enfin, des cellules immunitaires résidentes sont retrouvées dans le foie à savoir des cellules
800 dendritiques (DCs), des cellules NK (Natural Killer) et des cellules NKT. Le foie est
801 constamment exposé à des antigènes non dangereux liés aux produits alimentaires et
802 commensaux issus du tractus gastro-intestinal. Lorsqu'il rencontre un pathogène, il doit donc
803 exercer une réponse immunitaire appropriée contre celui-ci tout en maintenant une tolérance
804 vis-à-vis du soi et des antigènes du non-soi non dangereux.

805

806 **1.2 Fonctions**

807 Le foie est un organe filtrant essentiel au métabolisme et à l'assimilation d'un ensemble de
808 molécules provenant de la circulation sanguine et des voies digestives. Il participe activement
809 à plusieurs fonctions :

- 810 - métabolisme glucidique : stabilisation du taux de glucose dans le sang grâce à sa
811 capacité de captation et d'entrepôt du glucose sous forme de glycogène et au besoin,
812 dégradation du glycogène en glucose.
- 813 - métabolisme protidique : synthèse de la majeure partie des protéines plasmatiques y
814 compris l'albumine et la plupart des globulines autres que les gammaglobulines.
815 L'albumine a un rôle important dans le maintien de la pression osmotique et joue
816 également un rôle dans le transport de certaines hormones, protéines et vitamines. Les
817 globines comprennent les facteurs de coagulation suivants : le fibrinogène, la
818 prothrombine (facteur II) et les facteurs V, VII, IX et X qui participent activement à la

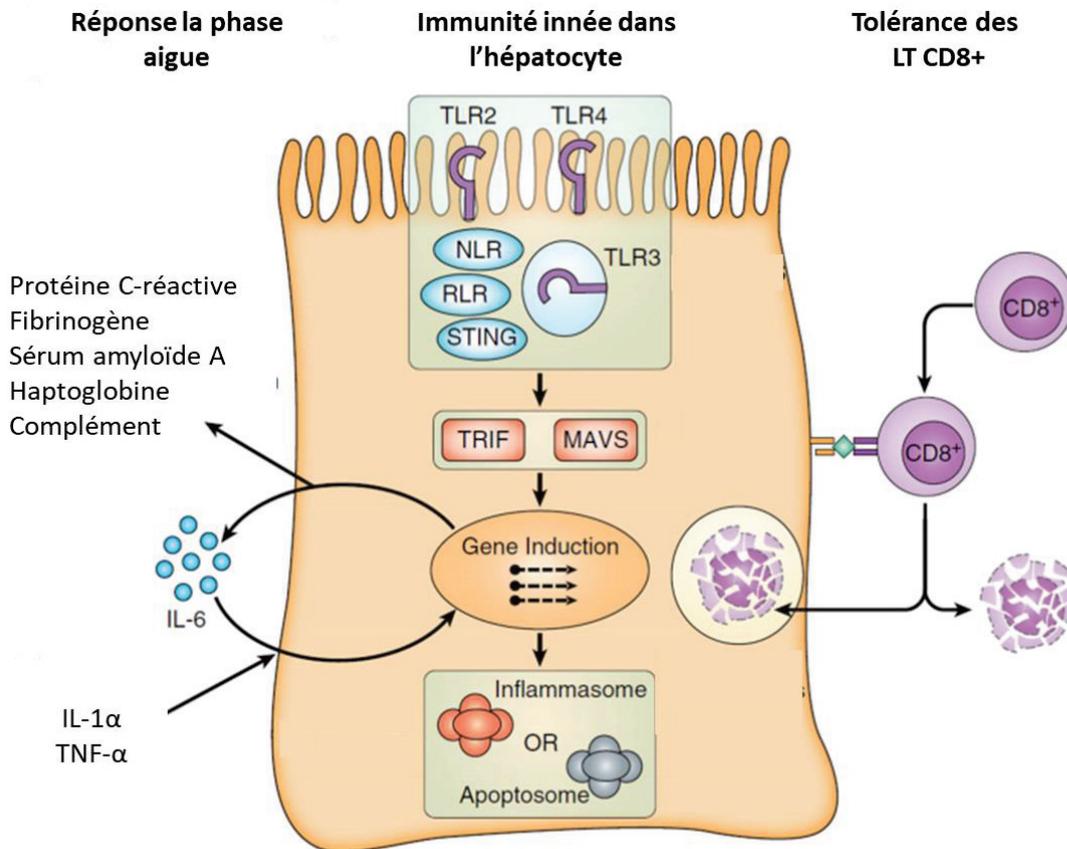


Figure 14 : Hépatocytes et réponses immunitaires. Traduit de (220). Suite à l'invasion d'un pathogène, les cytokines sécrétées notamment par les KCs et les DCs entraînent une cascade de signalisation conduisant à la production des protéines de la phase aigüe à travers l'induction de la cytokine IL-6 (gauche). Les hépatocytes sont également capables de répondre directement à l'invasion de pathogènes grâce à l'expression de PRRs. Suivant les PRRs activé la réponse engendrée peut être l'activation de l'inflammasome, de l'apoptose ou encore de la sécrétion IFN (pour plus de détails voir partie 1, section 6.1 de ce document). Les hépatocytes sont aussi des cellules présentatrices de l'antigène non conventionnelles exprimant CMH-I et CMH-II. L'activation des LTs CD8+ peut conduire à une activation abortive due à l'absence des molécules de co-stimulation ou les hépatocytes sont aussi capables d'internaliser les LTs puis de les dégrader.

- 819 - formation des caillots sanguins et donc à l'hémostase. Le foie est aussi le siège de la
820 dégradation de la plus grande partie des acides aminés en les catabolisant en urée.
821 - métabolisme lipidique : captation notamment des acides gras et estérification en
822 triglycérides. Il est aussi le lieu de synthèse majoritaire du cholestérol, constituant
823 majeur des membranes cellulaires nécessaire à la formation des sels biliaires. Ces sels
824 biliaires sont responsables de la formation de la bile, indispensable à la digestion des
825 aliments.
826 - Détoxification : Grâce à son système enzymatique très riche, le foie métabolise de
827 nombreuses substances toxiques (par exemple l'alcool) afin de les empêcher de passer
828 dans la circulation générale de l'organisme. Lorsque le foie n'est pas en mesure
829 d'exercer cette fonction, par exemple dans le cas d'une cirrhose, les conséquences sur
830 l'organisme vont être très importantes pouvant notamment causer de l'inflammation
831 dans le cerveau.

832 La quasi-totalité des fonctions exercées par le foie sont réalisées par les hépatocytes. De ce
833 fait, ils produisent et contiennent un grand nombre d'enzymes présentes au niveau de leur
834 réticulum endoplasmique (RE) lisse et dans leurs microsomes.

835 Le métabolisme hépatique est sensible à un ensemble de paramètres physico-chimiques liés à
836 l'âge, au sexe, la flore intestinale, un contexte pathologique ou encore à un polymorphisme
837 génétique (221–225).

838

839 *1.3 Les hépatocytes, des agents immunologiques :*

840

841 Les hépatocytes participent activement à la réponse immunitaire innée (Fig. 14).

842 Ils vont tout d'abord jouer un rôle central dans la mise en place de la phase aigüe en réponse
843 aux cytokines sécrétées par les DCs et les KCs principalement TNF- α , IL-1 α et IL-6 (226).
844 Les protéines de la phase aigüe (APP) sont exclusivement produites par le foie et plus
845 précisément par les hépatocytes. Elles forment un groupe hétérogène de protéines
846 plasmatiques et sont des composants critiques pour restaurer l'homéostasie après l'infection.
847 Ces protéines ont des fonctions :

- 848 - hémostatique comme c'est le cas par exemple du fibrinogène, de la prothrombine ou
849 encore du facteur de coagulation VIII.
850 - microbicide et phagocytaire comme c'est le cas par exemple des molécules du
851 complément dont nous avons évoqué le rôle dans la protection et la pathogénèse des
852 flavivirus dans la section 7.2 de la partie 1. 80% à 90% des composants du système du
853 complément sont synthétisés par les hépatocytes (227).
854 - anti-thrombotique comme c'est le cas par exemple de l' α 1-acid glycoprotéine.
855 - anti-protéolytique comme c'est le cas de l' α 1-antitrypsine qui protège les tissus des
856 enzymes produites par les cellules inflammatoires.

857

858 Les hépatocytes sont aussi la source majeure de PRRs solubles de l'organisme. Ces PRRs
859 vont avoir deux fonctions principales: l'activation du complément et l'opsonisation des
860 pathogènes favorisant leur phagocytose. 4 classes majeures de PRRs solubles sont identifiées:
861 les collectines, les pentraxines, les lipides transférases, et les protéines reconnaissant les
862 peptidoglycanes. Ces protéines sont sécrétées dans la circulation sanguine jouant un rôle
863 important dans l'immunité innée locale et systémique (227).

864 Les hépatocytes vont aussi répondre directement aux agressions environnantes grâce à
865 l'expression de PRRs et leur capacité à sécréter des cytokines et chimiokines anti et pro-
866 inflammatoires. De plus, ils peuvent interagir localement avec les cellules professionnelles de
867 l'immunité innée, comme les NKs via leur CMH-I ou les NKTs via leur CD1d, mais
868 également avec les cellules professionnelles de l'immunité adaptative. En effet, les
869 hépatocytes expriment le CMH-I et sous certaines conditions inflammatoires sont capables
870 d'induire l'expression de CMH-II. Ainsi, des études *in vitro* et *in vivo* démontrent que les
871 hépatocytes sont capables de présenter des antigènes aux LTs naïfs, les classant ainsi dans les
872 cellules présentatrices de l'antigène (APC) non conventionnelles. Néanmoins les hépatocytes
873 n'expriment pas les molécules de co-stimulation nécessaires à la pleine activation des LTs,
874 l'interaction des hépatocytes avec les LTs va conduire à une activation abortive entraînant la
875 mort des LTs. Remarquons que les LSEC sont aussi des APC non conventionnelles (220,228).

876 L'activation des voies de l'immunité innée va avoir un impact non négligeable sur les
877 fonctions métaboliques des hépatocytes. En effet, il est aujourd'hui bien établi qu'une
878 interaction étroite existe entre immunité et métabolisme (225). Les récepteurs nucléaires
879 illustrent parfaitement cette interaction. Parmi ces récepteurs, on retrouve le récepteur X du
880 prégnane (PXR) et le récepteur constitutif d'androstane (CAR), acteurs majeurs de la fonction
881 de détoxification entéro-hépatique (229). L'expression de ces récepteurs peut être étroitement
882 régulée par des médiateurs pro-inflammatoires. L'IL-6 et l'IL-1 β sont par exemple capables
883 d'inhiber l'expression de ces récepteurs (230,231). De plus, une inhibition fonctionnelle entre
884 NF- κ B et PXR a été révélée : l'activation de NF- κ B inhibe l'induction du CYP3A4 par le
885 PXR *in vivo* (232) et *in vitro* (233). A l'inverse, les récepteurs nucléaires peuvent aussi
886 directement jouer sur l'immunité innée. C'est le cas de LXR et PXR qui peuvent inhiber
887 l'activité de NF- κ B (229,234) ou encore de PXR qui serait capable d'induire l'expression des
888 TLR-2, -4, -9 et NLR, NOD-1 and -2 et NLRP3 (235).

889

890 **2. Mise en évidence de l'atteinte hépatique chez des** 891 **patients infectés par DENV et YFV : données cliniques et** 892 **histologiques**

893

894 La sévérité du dysfonctionnement du foie dans le cas de YFV est considérée comme unique
895 parmi les virus hémorragiques. Pour autant, très peu d'études répertorient des données
896 cliniques attestant de l'atteinte hépatique ont été reportées dans la littérature. *A contrario*,
897 dans le cas de la DENV, de nombreuses études de cohortes prospectives et rétrospectives ont

898 été menées pour évaluer l'atteinte hépatique. Pour cela, des données médicales ont été suivies
899 sur des périodes plus ou moins longues sur des patients atteints plus ou moins sévèrement.

900 **2.1 Données d'observation clinique**

901 En moyenne, près de 40% des patients infectés par DENV manifestent une sensibilité à la
902 palpation au niveau de l'hypochondrium droit (236). De plus, une augmentation du volume
903 du foie appelée hépatomégalie, est retrouvée dans 24 à 100 % des cas selon les études (237–
904 239). Dans le cadre d'une méta-analyse réalisée en 2013, l'hépatomégalie a été
905 préférentiellement associée à la forme sévère de la dengue (240). Des cas d'hépatomégalie ont
906 également été répertoriés chez les patients atteints de YFV dans une proportion, qui à notre
907 connaissance, est inconnue. De manière générale, l'hépatomégalie peut être liée à
908 l'accumulation de lipides dans les hépatocytes, à une obstruction des canaux irrigants
909 (cholestase, congestion), à un abcès ou à une inflammation importante (241).

910 Dans 2 à 29% des cas de dengue, une jaunisse est reportée classant ce paramètre dans les
911 manifestations atypiques de la Dengue (242–244). Dans le cas de YFV, la fréquence de
912 jaunisse est plus importante et peut atteindre 70% des cas (245). Ce symptôme est
913 significativement associé à un risque de mortalité plus élevé puisque qu'on dénombre parmi
914 les personnes atteintes de jaunisse, un taux de mortalité variant entre 20 et 50% (245). La
915 jaunisse ou ictère est liée à une augmentation du taux de bilirubine libre ou conjuguée dans le
916 sang. Elle peut avoir plusieurs origines : une hémolyse rapide de globules rouges, une
917 insuffisance hépatique, ou une anomalie du transport canaliculaire lié par exemple à une
918 obstruction des canaux biliaires ou à l'action de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1
919 et IL-6) qui peuvent inhiber le transport (246).

920 **2.2 Données biologiques et biochimiques**

921 Pour évaluer l'atteinte hépatique, différents tests fonctionnels peuvent être réalisés afin de
922 mesurer la quantité d'enzymes et des protéines spécifiques dans le sang.

923 **2.2.1 Les transaminases**

924 Classiquement, les taux d'aspartate transaminase (AST) et d'alanine transaminase
925 (ALT) sont mesurés. Les AST sont principalement exprimées par les cellules musculaires
926 cardiaques et squelettiques mais aussi par les hépatocytes. Les ALT sont quant à elles
927 principalement produites par les hépatocytes. Il s'agit d'enzymes cytoplasmiques. Leur
928 présence dans leur sang est donc le signe de dommages cellulaires.

929 Chez 65 à 96% des patients atteints de dengue, le taux de transaminase est retrouvé
930 élevé avec une persistance pouvant atteindre jusqu'à 60 jours après les premiers symptômes
931 (236,238,243,247,248). De nombreuses études cliniques établissent le degré de sévérité de
932 l'atteinte hépatique en fonction de la quantité de transaminases détectée dans le sang. Ainsi, le
933 grade, où l'atteinte hépatique est la plus sévère, est caractérisé par un taux de transaminases
934 au moins 10 fois supérieur à la normale (> 300 UI/L). Il regroupe près de 4% des patients
935 (247,249). Enfin, une étude observant le taux de transaminases chez des patients infectés par
936 DENV-1, DENV-2 et DENV-3 montrent que seuls les patients infectés par DENV-2 et
937 DENV-3 ont un taux d'ALT significativement plus élevé que le contrôle suggérant que
938 certains sérotypes de DENV pourraient favoriser des dommages hépatiques (250).

939 Le taux de transaminases dans le cas de DENV est préférentiellement associé à la sévérité de
940 la maladie (240).

941 C'est également le cas pour YFV où le taux de transaminases est directement corrélé à
942 la sévérité de la maladie et où les patients qui survivent ont une concentration de
943 transaminases significativement plus faible que ceux qui ont un pronostic mortel (88,251).
944 Cependant, le taux de ces enzymes dans le cas de YFV semble drastiquement supérieur à
945 celui observé dans les cas de DENV. En effet, dans une étude réalisée au Brésil, les groupes à
946 symptômes dits faibles (asymptomatique ou fièvre) et sévères présentent des taux de
947 transaminases médians autour de 650 UI/L et 1670 UI/L respectivement soit 20 à 40 fois
948 supérieurs à la normale (245). Ces données suggèrent que les dommages hépatiques observés
949 dans le cas de YFV seraient beaucoup plus importants que dans le cas de DENV.

950 Etonnamment, contrairement à ce qui est retrouvé dans les infections par les virus de
951 l'hépatite B et C (HBV et HBC), le taux d'AST chez les patients atteints de DENV et YFV est
952 souvent retrouvé supérieur à celui des ALT. L'atteinte des muscles cardiaques et squelettiques
953 dans le cas des infections par ces deux flavivirus pourrait expliquer cette observation (88,236)

954 2.2.2 Autres protéines

955 Outre le taux de transaminases, le taux d'albumine dans le sang est également
956 quantifié. Chez certains patients atteints de dengue, le taux d'albumine se retrouve diminué.
957 Ce paramètre est associé à la sévérité de la maladie (240). Néanmoins, il faut noter que
958 certaines études n'associent pas ce paramètre à une atteinte du foie mais plutôt à une atteinte
959 du rein. En effet, l'albuminémie serait liée à une augmentation de la perméabilité rénale
960 expliquant la forte concentration d'albumine dans les urines.

961 Le taux de bilirubine, qui peut directement être associé à la jaunisse, est retrouvé
962 également élevé chez certains patients atteints de DENV (244). Dans le cas de YFV, tout
963 comme la jaunisse, ce taux a été significativement associé à un risque plus élevé de mortalité
964 (245,251).

965 Plus rarement, les taux de créatine kinase, d'alkaline phosphatase et de gamma-
966 glutamyl transférase sont mesurés et retrouvés parfois altérés chez les patients atteints de
967 DENV et de YFV (243,248,251).

968

969 2.2.3 Coagulation

970 Lorsqu'une rupture d'un vaisseau sanguin survient, l'organisme réagit par la
971 formation d'un caillot limitant la fuite plasmatique et permettant la réparation du vaisseau.
972 Plusieurs étapes sont nécessaires à la formation d'un caillot :

- 973 - l'agglutination de plaquettes au niveau de la brèche
- 974 - l'activation des facteurs de coagulation. Celle-ci conduit à la conversion du
975 fibrinogène soluble en fibrine insoluble.
- 976 - l'association de la fibrine soluble aux plaquettes.

977 On voit donc que différents facteurs peuvent favoriser une hémorragie : la réduction du
978 nombre de plaquettes, la réduction du taux de facteurs de coagulation ou la réduction de leur
979 activité.

980 La réduction du taux de facteurs de coagulation peut résulter soit d'une consommation
981 intravasculaire, soit d'une synthèse altérée par le foie (252). La coagulopathie de

982 consommation (ou coagulation intravasculaire disséminée) est visible par la formation de
983 petits caillots sanguins qui consomment les facteurs de coagulation rendant la coagulation
984 anormale. En général, elle n'est pas une cause majeure de saignement mais peut le devenir en
985 cas d'activation simultanée du système de lyse de la fibrine. Afin d'évaluer la fluidité du sang,
986 des mesures du taux de prothrombine (TP) et du temps de thromboplastine partielle (TTP)
987 sont effectués. Ces mesures exprimées en secondes quantifient la vitesse de coagulation du
988 sang permettant de faire une estimation du taux de certains facteurs de coagulation.

989 Dans le cas de YFV, une réduction des facteurs de coagulation II (ou trombine), V,
990 VII, IX, et X et une prolongation du TTP et du TP ont été démontrées. L'hémorragie dans la
991 fièvre jaune survient en cas d'atteinte hépatique marquée. La réduction de la synthèse des
992 facteurs de coagulation par le foie est probablement l'explication prééminente des
993 saignements anormaux. Cependant, des tests indiquent qu'un syndrome de coagulation
994 intravasculaire disséminée a aussi été visualisé (88).

995 D'après T.P. Monath *et al.*, chez les patients atteints de dengue sévère, la fonction
996 hépatique et la synthèse des facteurs de coagulation sont relativement bien maintenues par
997 rapport à la fièvre jaune (88). Il est vrai qu'en général, dans le cas de la DENV, de légères
998 diminutions des taux des facteurs II, V, VII, VIII, IX, X et XII sont observés associés à une
999 TPP normal ou légèrement prolongé, tandis que la réduction des taux de fibrinogène et de
1000 plaquettes est beaucoup plus importante (253,254). De façon intéressante, des anticorps anti-
1001 thrombine capables aussi bien d'une activité anti-thrombine et pro-fibrinolytique ont été
1002 détectés dans le sang de patients atteints de DENV (255). L'ensemble de ces points seraient
1003 donc plutôt en faveur que le foie n'a pas un rôle prépondérant dans la coagulopathie observée
1004 dans le cas de DENV (252).

1005 2.2.4 Atteinte hépatique aigüe

1006 L'ensemble des paramètres décrits ci-dessus peut aider à diagnostiquer une atteinte hépatique
1007 aigüe. Elle est définie par une évidence d'une coagulation anormale associée à une altération
1008 mentale (encéphalopathie) chez des patients non atteints de cirrhose. Dans le cas de la dengue,
1009 les atteintes hépatiques aiguës sont rares, d'une incidence allant de 0.31% à 0.77%. Elles sont
1010 fortement associées à un taux de mortalité élevé (256) si le patient ne reçoit pas les soins
1011 appropriés (257). Dans le cas de YFV, le taux d'incidence n'est pas reporté dans la littérature,
1012 mais ce cas de figure est suffisamment fréquent pour que des cas de transplantation du foie
1013 aient été effectués (199).

1014 2.2.5 Limites

1015 Il est difficile d'établir au sein d'une étude si un paramètre peut être associé ou non à la
1016 sévérité de la maladie. En effet, les études comportent souvent un nombre de patients limité et
1017 les prélèvements sont réalisés alors que les patients sont rarement au même stade de la
1018 maladie (asynchronisation). Il est également très rare que les études comportent des patients
1019 sans signes de progression vers une forme sévère et enfin, les études possèdent généralement
1020 des populations de patients très hétérogènes en termes d'âge, de genre, ou encore de facteurs
1021 de prédisposition (obésité, malnutrition, alcool).

1022 2.3 Données sur coupes histologiques

1023 Des analyses histologiques ont été réalisées sur des foies de patients décédés suite à une
1024 infection par DENV et YFV. De manière générale, des dommages parenchymateux sont
1025 retrouvés. Le tissu a une architecture altéré parfois même décrit comme friable dans certains
1026 cas de YFV (258). De plus, des dérégulations métaboliques sont observées avec l'apparition
1027 d'une rétention anormale de lipides au sein des hépatocytes, visualisée soit sous forme de
1028 petites vacuoles autour du noyau (microstéatose) soit de grosses vacuoles avec déplacement
1029 du noyau en périphérie (macrostéatose). Ces stéatoses sont essentiellement présentes dans la
1030 région midzonale pour YFV et au niveau de l'espace porte dans le cas de la DENV. Des zones
1031 nécrosées sont également constatées avec à proximité la présence de corps de Councilman
1032 caractéristique d'une nécrose acidophile. Des cellules apoptotiques caractérisées par une
1033 dégénération des noyaux et un gonflement des mitochondries sont aussi observées. Enfin, des
1034 techniques d'immunohistochimie et d'immuno-électromicroscopie ont permis de mettre en
1035 évidence la présence d'antigènes de DENV et YFV principalement dans les hépatocytes mais
1036 aussi dans les cellules de Kupffer. La détection des antigènes NS3 et de l'ARN viral a permis
1037 de valider que les virus se répliquent au sein de ces cellules (259,260). Dans certains cas,
1038 DENV a également été détecté dans les cellules endothéliales du foie associé ou non à la
1039 détection d'une répllication virale (d'après les revues (88,236,261)).

1040 Comme ces résultats sont des descriptions sans véritables données chiffrées et réalisées par
1041 différents laboratoires il est difficile de comparer la sévérité des dommages liée aux infections
1042 de YFV et DENV. Il existe quelques données chiffrées dans les cas de dengue où le
1043 pourcentage de cellules infectées est répertorié. Celui-ci est très variables allant de plus de
1044 90% d'hépatocytes infectées à 4-7 hépatocytes/0,96mm² de tissu (260). A notre connaissance,
1045 dans le cas de fièvre jaune, aucun dénombrement n'a été reporté dans la littérature.
1046 Cependant, dans les deux cas, certaines études ne détecte aucun antigène dans le foie (262–
1047 264) . La technique de détection utilisée et la préparation des échantillons peuvent avoir un
1048 impact sur la détection des antigènes. En effet, l'étude de J.A.S. Quaresma *et al.*, montre une
1049 détection d'antigènes de YFV dans les hépatocytes par immunohistochimie alors qu'en
1050 microscopie électronique aucune particule infectieuse n'est visualisée (263). Une seule étude
1051 compare avec une technique similaire des échantillons de YFV et de DENV. Dans cette étude,
1052 les antigènes de DENV sont retrouvés essentiellement dans les KCs, et en faible quantité dans
1053 l'endothélium. Aucune zone de nécrose n'est décrite mais des congestions vasculaires sont
1054 observées, associées à une infiltration de cellules immunitaires. Dans le cas de YFV, les
1055 antigènes viraux ont été détectés occasionnellement dans les cellules de Kupffer et
1056 majoritairement dans les hépatocytes de la région midzonale dans ou proche des zones
1057 nécrotiques.

1058 Aussi bien dans le cas de DENV que YFV, une inflammation et une infiltration de cellules
1059 immunitaires ont pu être visualisées sur les coupes histologiques. Dans le cas de YFV, les
1060 coupes histologiques montrent que la majorité des cellules recrutées sont des LTs CD4+. Des
1061 LTs CD8+, des lymphocytes B, des NKTs et des DCs sont aussi visualisées (265,266). En
1062 comparaison des dommages observés, beaucoup d'auteurs reportent que le nombre de cellules
1063 recrutées est faible (263). Alors que d'autres hépatites virales endommagent le foie

	Primates non humains		
Modèle	Alouatta sp	Macaque Rhesus	Macaque Rhesus
Voie d'injection	infection naturelle	?	IP
Virus	YFV souche non renseignée	YFV souche non renseignée	YFV souche non renseignée
Domage du foie	+++	+++	+++
Enzymes hépatiques			AST/ALT (24h avant lamort)
Dégénération des hépatocytes	+++	+++	+++ (24h avant la mort)
Stéatose	+++	+++	
Hyperplasie des KCs		+	++ (1ère cellules infectées)
Infiltration de cellules immunitaires	19/98		
Hémorragie du foie		endothélium préservé extravasation des GRs hémorragies (2/3)	
Références	(269)	(258)	(88)

	Hamster		Souris
Modèle	M. Sauratus	M. Sauratus	A129
Voie d'injection	IP 10 ⁶ TCID ₅₀	IP 10 ⁶ TCID ₅₀	SC 10 ⁴ PFU
Virus	Jimenez adaptée	Jimenez adaptée	Asibi
Domage du foie	+++ puis régénération		+++
Enzymes hépatiques		AST et ALT élevés (4-6 X) Bilirubie total élevée	
Dégénération des hépatocytes	Nécrose massive puis régénération	+++	+++
Stéatose	Microstéatose dans 85-100% lobule puis résorption		+++
Infiltration cellules immunitaires	+++		+++
Hémorragie du foie			congestion vasculaire dépôt de fibrine
Autres observations		Icteric serum	Hepatomégalie Ictère du foie
Références	(267)	(268)	(167)

Tableau 3 : Evaluation de l'atteinte hépatique suite à une inoculation de YFV dans différents modèles animaux

1064 indirectement par le biais de la réponse immunitaire cellulaire, la fièvre jaune provoque une
1065 infection cytopathique directe des hépatocytes (270).

1066 Dans le cas de la DENV, il n'est pas encore établi si la majorité des dommages sont liés à des
1067 effets directs du virus, au système immunitaire ou à l'interaction des deux. L'infiltration de
1068 cellules mononucléaires comme des macrophages ou des lymphocytes a été observée avec la
1069 présence de macrophages hyperplasiques marquant leur activité. Dans l'étude de
1070 Bhamarapavati N *et al.*, sur 100 foies de patients examinés, 64 cas d'infiltration de cellules
1071 immunitaires sont rapportés (271). Dans l'étude de Huerre *et al.*, sur 5 foies analysés, 4
1072 montrent une histopathologie mais non associés ou très faiblement à une réponse
1073 inflammatoire (272).

1074

1075 **3. Mise en évidence de l'atteinte hépatique dans le cas** 1076 **d'animaux infectés par DENV et YFV : données cliniques et** 1077 **histologiques**

1078

1079 **3.1 Atteinte hépatiques chez les animaux infectés par YFV**

1080 La souris, le hamster et les primates non humains (NHPs) sont utilisés comme modèles
1081 animaux pour étudier la pathogenèse de YFV (Tab. 3).

1082 **3.1.1 Modèle NHPs**

1083 Certaines espèces de NHPs étant des hôtes naturels de YFV, les changements
1084 histopathologiques suite à une infection naturelle ont pu être rapportés. Dans l'étude de Leal
1085 SG *et al.*, les lésions les plus fréquemment observées sont retrouvées au niveau du foie. Ces
1086 lésions sont caractérisées par une apoptose et une nécrose des hépatocytes de la région
1087 midzonale associées à une stéatose. Une infiltration de cellules mononucléaires est mise en
1088 évidence dans 19 foies sur 98 observés (269).

1089 Des expériences réalisées chez le macaque Rhésus montrent également que le foie est
1090 l'organe qui a les lésions les plus frappantes. Son aspect est friable avec une déstructuration
1091 des tissus. Une microstéatose est souvent retrouvée dans la région midzonale. Il semble
1092 cependant que l'accumulation de lipides chez l'animal soit plus importante que celle
1093 observée. De plus, une nécrose est aussi visualisée avec une dégénération des hépatocytes
1094 dans la région midzonale. Une hyperplasie des KCs est observée mais en plus faible quantité
1095 que chez l'homme. L'endothélium des sinusoides est préservé (258).

1096 Un des avantages des modèles animaux est qu'ils offrent la possibilité de suivre plus
1097 facilement la progression de la pathologie hépatique à différents intervalles après l'infection.
1098 C'est le cas de l'étude de Monath *et al.* qui montre qu'après une injection intrapéritonéale de
1099 YFV chez le singe Rhésus, les KCs sont les premières cellules à être infectées. Une virémie
1100 est ensuite détectée suggérant une virémie secondaire libérée par le foie. En parallèle, le virus
1101 est détecté dans les hépatocytes puis les organes lymphoïdes secondaires. La dégénérescence

	Souris		
Modèle	C56BL/6	C56BL/6	AG129
Voie d'injection	IV 10 ⁸ PFU	IV 10 ⁸ PFU	IP 10 ⁴ vs 10 ⁷ PFU
Virus	DENV-2	DENV-2	DENV-2
Détection antigène dans foie	oui dès 14 h.p.i		quantité virus 10 ⁴ = 10 ⁷
Enzymes hépatiques		AST et ALT augmentent J3-J7 (rq: virus inactivé ASL/ALT augmentent aussi à J3)	10 ⁴ (AST/ALT) < 10 ⁷
Dégénération des hépatocytes	Apoptose dépendante en partie des NKs et LT CD8+	oui	dommage 10 ⁴ < 10 ⁷
Immunité du foie	Expression CXCL10, CCL5 Infiltration d'abord NKs (dépendant de CXCL10) puis LT CD4+ et LT CD8+	LT CD4+ (37%) LT CD8+ (63%)	avec dose 10 ⁷ , lymphocytes agrégés dans zone porte et dans sinusoides
Hémorragie du foie			avec dose 10 ⁷ , quelques foyers hémorragiques
Autres observations		2nd inoculation: AST augmentent rapidement et infiltration LT aussi (%LT CD8+)	
Références	(273)	(274)	(275)

Tableau 4 : Exemples d'études démontrant une atteinte du foie dans le cas d'une inoculation de DENV chez différents modèles murins

1103 des hépatocytes et l'élévation du taux d'enzymes hépatiques ne sont visibles que 24 heures
1104 avant la mort des animaux (88).

1105 La pathologie fièvre jaune observée chez le singe est proche de celle observée chez
1106 l'homme mais avec une sévérité beaucoup plus exacerbée. En effet, les singes Rhesus
1107 meurent 5 jours après inoculation du virus (276).

1108 Le modèle de singe a aussi servi à l'étude du vaccin 17D. A notre connaissance une seule
1109 étude reportée dans la littérature évalue l'impact de 17D sur le foie. Seulement quelques foci
1110 d'infection ont été observés au niveau de cet organe (277).

1111 3.1.2 Modèle hamster

1112 Un modèle de pathogenèse moins virulent que chez le singe a pu être établi chez le hamster
1113 syrien doré en utilisant des souches de YFV adaptées au modèle (adaptation par passages
1114 successifs). Dans l'étude de Tesh RB *et al.*, une cinétique a été réalisée chez le hamster.
1115 L'infection de cellules de Kupffer n'y est pas mentionnée. Il est noté que la dégénérescence
1116 des hépatocytes progresse rapidement entre le jour 2 et le jour 5 post-infection. Elle est
1117 associée à une expansion de la microstéatose dans la quasi-totalité de la zone
1118 parenchymateuse. Ensuite, survient l'infiltration des cellules immunitaires au niveau du foie.
1119 La nécrose diminue ainsi que l'expansion de la microstéatose jusqu'à ce que les cellules se
1120 régénèrent et se multiplient (268).

1121 3.1.3 Modèle murin

1122 Les souris sont naturellement résistantes à l'infection par les flavivirus. Le gène OAS1b a été
1123 identifié comme un des facteurs génétiques jouant un rôle dans cette résistance (278). Les
1124 souris peuvent être infectées par les flavivirus mais le titre de virus amplifiés sur ces tissus *ex*
1125 *vivo* est 1000 à 10 000 fois plus faible que celui obtenu sur tissus d'animaux susceptibles à
1126 l'infection (279). Pour pallier à cette résistance, des études ont recours à des souris dont le
1127 système immunitaire est altéré. Néanmoins, le taux de survie chez ces souris peut parfois être
1128 compromis et ce même en inoculant le vaccin 17D. Par exemple, l'étude de Lee et Lobigs
1129 démontre qu'une inoculation sous cutanée de 17D dans une souris AG129, déficiente pour les
1130 récepteurs des IFN-I et -II, résultent en la mort de 88% des souris associée à un taux d'AST
1131 particulièrement élevé (280). Des souris A129, déficientes seulement pour le récepteur aux
1132 IFN-I, sont alors utilisées permettant notamment la comparaison de l'infection de YFV et de
1133 17D (167). Il apparaît que YFV et YFV17D se distinguent facilement sur la base de la
1134 morbidité, de la mortalité et de la pathogenèse. Tout comme chez le singe, des antigènes
1135 viraux peuvent être détectés dans le foie suite à l'inoculation du vaccin. Néanmoins
1136 l'histopathologie provoquée est nettement moins sévère. L'infection par YFV présente un
1137 viscérotropisme prononcé, provoquant une histopathologie sévère du foie et de la rate, en
1138 corrélation avec une induction dérégulée des cytokines. De plus, contrairement à 17D, des
1139 signes d'hépatomégalie et d'ictère du foie sont observés. Une microstéatose propagée sur une
1140 grande partie du parenchyme lobulaire est également reportée.

1141 **3.2 Atteinte hépatique chez les animaux infectés par DENV**

1142 **3.2.1 Modèle NHPs**

1143 Les modèles d'infection de la dengue incluent les macaques Rhesus et les chimpanzés.
1144 Les deux modèles montrent une virémie détectable lors d'injection en sous-cutanée ou dans le
1145 derme (281). Une limitation majeure de ce modèle pour étudier la pathogenèse de dengue et
1146 l'efficacité des vaccins est que l'infection conduit souvent à des symptômes subcliniques
1147 (282) et ne récapitule pas les symptômes observés chez les patients. La thrombocytopenie par
1148 exemple n'a jamais été observée chez les NHPs mais une diminution modérée du taux de
1149 plaquettes a quand même été documentée chez *M. mulatta* (282,283).

1150 A notre connaissance aucune étude n'évalue l'impact de l'infection de DENV au niveau du
1151 foie. Quelques études mentionnent que le virus peut être détecté dans le foie (284) ou qu'un
1152 taux anormal d'enzymes hépatiques peut être détectée chez certains animaux (282) (285) et ce
1153 quel que soit le sérotype de DENV injecté (286).

1154 Enfin, des études de toxicité du vaccin CYD ont aussi été réalisées démontrant qu'
1155 aucun signe d'infection du foie n'est observé après une inoculation du vaccin (277).

1156 **3.2.2 Modèle murin**

1157 Les premiers modèles de dengue ne reflétaient pas les signes cliniques observés chez
1158 l'homme (287). Les souris immunocompétentes comme les souris A/J, BALB/c et C57BL/6
1159 supportent une réplication de DENV mais les souris A/J et BALB/c meurent souvent après
1160 avoir développé une paralysie (288,289) suggérant une atteinte neurotropicque qui n'est que
1161 très rarement reportée chez l'homme.

1162 Contrairement aux études réalisées chez le singe, de nombreuses études décrivent le
1163 signe d'atteinte hépatique dans le cas d'une infection DENV (Tab. 4) (274,290–293). Elles
1164 montrent que le virus peut être détecté dans le foie, que de l'apoptose d'hépatocytes et une
1165 dérégulation légère des enzymes transaminases peuvent être visualisée. De nombreuses études
1166 cherchent à comprendre l'origine de cette atteinte hépatique. Différentes cytokines ont pu être
1167 détectées au niveau du foie suite à l'infection CXCL10, CCL2, CCL3 et CCL5 suggérant le
1168 recrutement de cellules immunitaires (273,294). L'étude de Sung *et al.* démontre que le
1169 recrutement se fait en deux vagues. Une première consiste au recrutement des cellules NKs en
1170 réponse à la sécrétion de CXCL10, la deuxième permet le recrutement de LTs dont
1171 principalement des LTs cytotoxiques. Ces cellules ont été montrées comme ayant une
1172 responsabilité majeure des dommages hépatiques observés (273). Une deuxième inoculation
1173 de virus conduit à une aggravation des dommages hépatiques associée à un recrutement plus
1174 importants de LT CD8+ (274).

1175 De plus, des souris déficientes en iNKT sont plus résistantes à l'infection sévère de
1176 DENV et développent des dommages et une charge virale hépatiques moins importants. Les
1177 iNKT semblent donc aussi impliqués dans la pathogenèse hépatique observée chez la souris
1178 (295). La mutation des chimiorécepteurs CCR4 ou CCR2 favorise aussi la protection et
1179 diminue les dommages hépatiques même si le titre viral au niveau du foie n'est pas différent
1180 (294). CCR4 pourrait jouer un rôle important dans le recrutement et l'activation des iNKT et
1181 des LT CD8+ (103). Enfin plus récemment la cytokine IL-22 a été démontrée comme jouant
1182 un rôle dans la protection de la pathogenèse du foie à l'inverse de IL-17A qui favoriserait les
1183 dommages hépatiques (296). R.Guabiraba et B. Ryffel émettent l'hypothèse que les NKs

1184 seraient la principale source d'IL-22 dans le parenchyme hépatique jouant un rôle dans
1185 l'hémostase du tissu tandis que les LT CD8+ produiraient eux massivement de l'IL-17 dans le
1186 foie et contribueraient à une réponse inflammatoire massive responsable des dommages
1187 hépatiques observés dans les cas sévères (103).

1188 Les modèles murins de DENV seraient donc en faveur de dommages liés en majorité à
1189 une réponse immunitaire dérégulée. Néanmoins, il faut garder en tête que, comme tout
1190 modèle, ce modèle présente des limites à savoir l'utilisation parfois de souche DENV adaptée
1191 à l'animal ou encore l'inoculation de virus à forte dose (10^8 PFU). Encore aujourd'hui, le
1192 parallèle avec la pathogenèse hépatique de l'homme n'a pas été établi.

1193

1194 **4. Mise en évidence de l'atteinte hépatique dans le cas de** 1195 **cellules infectées par DENV et YFV : données *in vitro***

1196

1197 **4.1 Modèle de foie *in vitro* :**

1198 Les hépatocytes étant les composants majoritaires du foie et assurant la majorité de ses
1199 fonctions, ils constituent la plupart des modèles d'étude *in vitro* du foie. Le modèle d'étude le
1200 plus physiologique est celui des hépatocytes primaires (PHHs) isolés directement à partir de
1201 l'organe. Cependant, certains inconvénients limitent leur utilisation : (1) la variabilité inter-
1202 donneurs. Elle peut avoir des conséquences directes sur le résultat expérimental et également
1203 compliquer l'établissement des conditions de culture (ex : difficulté d'adhésion sur le support
1204 de culture pour certains lots de cellules) (2) culture à court terme. Les cellules vont
1205 rapidement perdre leur phénotype en culture, en moins d'une semaine pour certains lots (3)
1206 disponibilité limitée des dons souvent associée à des donneurs ayant des pathologies
1207 métaboliques du foie (ex : alcoolisme, diabète, obésité).

1208 Pour pallier à ces limites, la plupart des études utilisent des lignées hépatiques. Elles
1209 possèdent, de par leur propriété tumorale, la capacité de se diviser indéfiniment procurant
1210 alors un avantage économique indéniable. Néanmoins, les mutations génétiques retrouvées
1211 dans ces cellules peuvent éloigner la compréhension de mécanismes physiologiques. C'est le
1212 cas par exemple de la lignée Huh-7 qui possède une faible expression du PRR, TLR-3, et dont
1213 certains clones présentent des mutations dans le gène codant pour RIG-I (297). La lignée
1214 HepG2 possède quant à elle des mutations induisant une faible expression des cytochromes
1215 P450 (298). Les cellules HepaRG constituent une lignée particulière puisque leur utilisation
1216 nécessite une phase de différenciation cellulaire. Dérivées de cellules de carcinome
1217 hépatocellulaire, elles peuvent être progénitrices de deux types de cellules distinctes selon les
1218 conditions de culture : les hépatocytes et les cellules biliaires (299).

1219 Ces dernières années, un nouveau modèle de cellules a été développé : les hépatocytes dérivés
1220 de cellules souches pluripotentes (iHeps). Le principe est de différencier des cellules, le
1221 plus souvent des fibroblastes dermiques, en cellules souches puis de les redifférencier en
1222 hépatocytes. Afin de s'assurer que les cellules obtenues en fin de différenciation soient bien
1223 des hépatocytes, une liste de critères de caractérisation a été établie. Un hépatocyte est

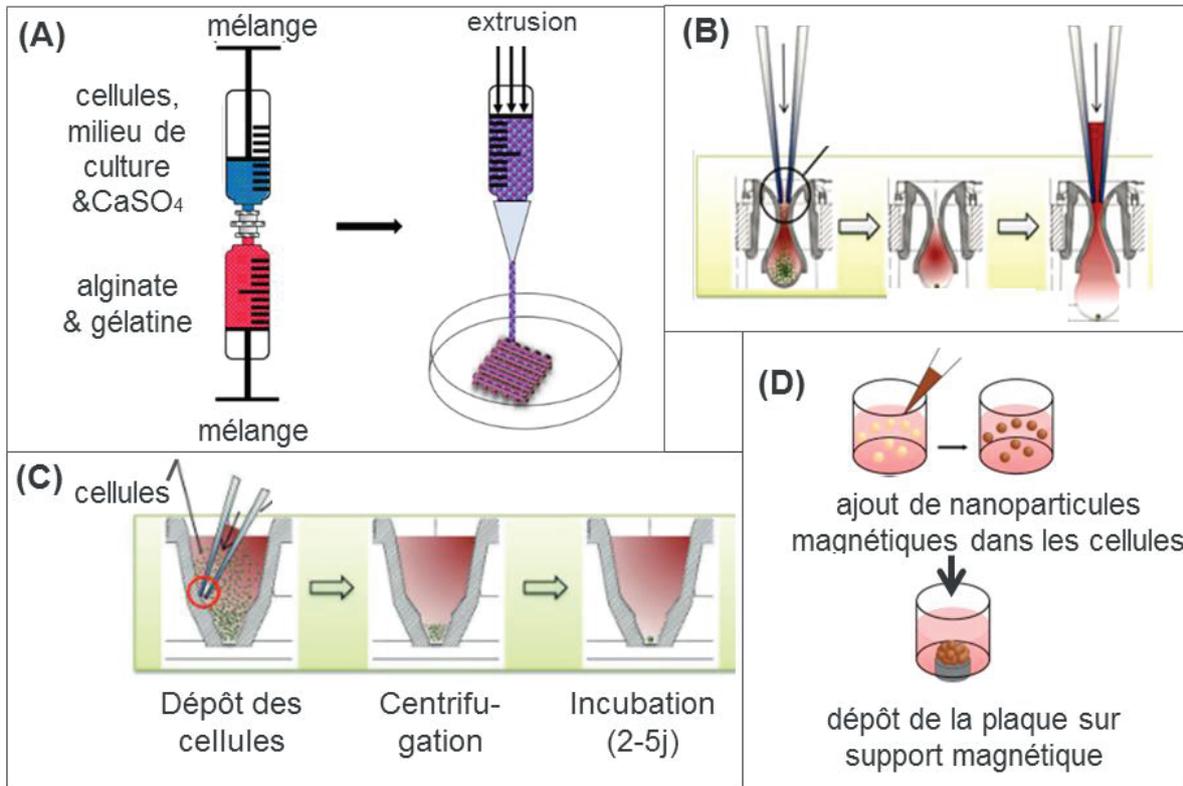


Figure 15 : Techniques permettant la formation de sphéroïdes hépatiques. (A) par technique de bioprinting (300) **(B)** par système de microgouttelette. Ici exemple de l'utilisation du système « Hanging Drop » du fournisseur InSphero® **(C)** par utilisation de plaque à très faible adhérence. Ici par exemple, des plaques ULA Gravity TRAP InSphero® **(D)** par l'utilisation de nanoparticules et de support magnétiques (301).

1224 caractérisé par la synthèse d'albumine, d'urée, de fibrinogène. De plus, des tests à l'aide de
1225 drogues doivent être effectués afin de s'assurer que les fonctions de détoxification sont bien
1226 actives. Enfin, la fonction de stockage des glycogènes peut être visualisée en utilisant une
1227 coloration PAS (réaction de Schiff) (302). Les cellules souches pouvant se multiplier de façon
1228 indéfinie, ce modèle possède l'avantage de pouvoir procurer un nombre infini d'hépatocytes
1229 issus d'un même donneur.

1230 L'étude des profils d'expression des différents types cellulaires suite à l'exposition de drogues
1231 démontre que les iHeps ainsi que les HepaRG seraient les modèles possédant un métabolisme
1232 le plus proche de celui des hépatocytes primaires (303). De plus, les iHeps ont des réponses
1233 immunitaires innées proches de celles observées dans les cellules primaires et sont considérés
1234 comme plus immunocompétents que certaines lignées hépatiques classiquement utilisées pour
1235 l'étude d'HCV (111,304).

1236 *In vivo*, la coopération cellulaire est indispensable pour assurer l'ensemble des fonctions de
1237 l'organe. Pour se rapprocher au mieux des conditions physiologiques, des mises au point de
1238 co-culture de différents types cellulaires ont été établis comme par exemple la co-culture entre
1239 hépatocytes et cellules de Kupffer permettant d'étudier avec plus de finesse l'inflammation et
1240 l'hépatotoxicité *in vitro* (305). Des systèmes de co-culture en sandwich alternant hépatocytes,
1241 collagène et LSEC ont aussi été évalués (306,307).

1242 De plus, ces dernières années, afin de se rapprocher de la morphologie du foie, de nombreuses
1243 méthodes ont été développées pour permettre la culture des cellules en trois dimensions (3D)
1244 (Fig. 15) :

- 1245 - utilisation de plaques à très faible adhérence (308,309)
- 1246 - utilisation de plaques magnétiques associées à l'ajout de nanoparticules magnétiques
1247 dans les hépatocytes (301)
- 1248 - utilisation d'un système de bioprinting (300)
- 1249 - utilisation d'un système de microgouttelette (310,311).

1250 La culture 3D favorise la viabilité et la stabilité des cellules sur des temps de culture plus
1251 longs et permet également d'utiliser un nombre de cellules plus faible par condition réduisant
1252 le coût expérimental.

1253 La co-culture est également envisageable pour les systèmes 3D comme démontré dans l'étude
1254 de Bell *et al.*, dans laquelle les hépatocytes sont associés à des KCs, des cholangyocytes et des
1255 cellules étoilées (309).

1256 En plus des modèles statiques, les systèmes microfluidiques ajoutent de la complexité aux
1257 modèles de cultures cellulaires existants (312).

1258

1259 **4.2 Etudes de la permissivité des cellules du foie à DENV et YFV**

1260 *In vitro*, la permissivité des hépatocytes aux virus DENV et YFV a été démontrée.
1261 Pour YFV, toutes les données publiées sont des études menées sur lignées hépatiques. C'est le

1262 cas également pour la plupart des études de DENV, néanmoins la permissivité des
1263 hépatocytes a également été montrée sur PHHs et iHeps (313,314). Généralement un seul
1264 sérotype est étudié et principalement le sérotype 2. Cependant, les études de Thepparit *et al.*
1265 comparent la réplication et l'internalisation des 4 sérotypes de DENV dans la lignée cellulaire
1266 HepG2. Elles mettent en évidence que la propagation est différente selon les sérotypes et que
1267 cette observation peut être liée à un mode d'entrée différent ou à l'utilisation de co-récepteurs
1268 différents (315,316).

1269 Comme observé *in vivo*, le pourcentage d'hépatocytes infectés *in vitro* par DENV est
1270 variable. Il oscille entre 20 et 90% sur lignées, est supérieur à 90% sur iHeps et à 70% sur
1271 PHHs (313,314,317,318). Pour YFV, une étude comparant 17D et YFV démontre que sur
1272 lignée hépatique ces deux virus n'infectent pas les cellules avec la même facilité : dans le cas
1273 de YFV, moins de 10% des cellules Huh7 ou HepG2 sont infectées alors que 90-100% le sont
1274 avec la souche vaccinale 17D (41). Cette étude démontre que les mécanismes d'entrée utilisés
1275 par 17D et YFV peuvent être différents. Si la réplication dans les lignées THLE-3 et Huh7 n'a
1276 été démontrée qu'avec la souche vaccinale 17D (319), cette dernière se réplique mieux que la
1277 souche sauvage Asibi dans les cellules HepG2 (319,320) et inversement dans les cellules
1278 PH5CH8 (321).

1279 Des études d'infectivité des souches chimériques CYD ont aussi été menées *in vitro*
1280 sur différentes lignées de cellules hépatiques (HepG2, HUH7 et THLE3) comparant les
1281 cinétiques de croissance des CYD et de leurs souches parentales YF-17D et virus Dengue
1282 sauvages. Il a pu être montré une réplication réduite des CYD par rapport à la souche 17D sur
1283 cellules HepG2 et THLE3 mais pas sur les Huh7 qui dans tous les tests menés se comportent
1284 plutôt comme les cellules Vero (319). Ces résultats suggèrent que les virus CYD seraient
1285 moins hépatotropiques que le virus vaccinal YF-17D comme suggéré dans l'étude chez le
1286 singe (277).

1287 Finalement, une seule étude compare l'infection de DENV-1 et YFV sur lignée
1288 HepG2. Elle démontre que le nombre de cellules infectées ainsi que le nombre de particules
1289 infectieuses produites sont plus importants pour YFV que DENV. De plus, l'infection par
1290 DENV induit une apoptose plus précoce que celle de YFV (322).

1291 Outre des études sur hépatocytes, la permissivité de KCs primaires aux virus DENV et
1292 YFV a aussi été évaluée. Il semble que DENV peut être internalisée dans ces cellules mais ne
1293 puisse ni s'y répliquer ni s'y propager. YFV quant à lui se réplique activement et mieux que la
1294 souche 17D (323).

1295

1296 **4.2 Réponses cellulaires induites *in vitro* suite aux infections DENV et YFV**

1297 L'induction de l'apoptose suite à l'infection de DENV a été visualisée *in vitro*,
1298 démontrant que le virus en lui-même est capable d'induire directement des dommages
1299 hépatiques (282,313). Il semble que l'activation du facteur de transcription NF- κ B soit un pré-
1300 requis pour l'induction de la mort cellulaire (324). De plus, l'accumulation de protéines
1301 virales dans le RE peut aussi être à l'origine de la mort cellulaire (325).

1302 Des marqueurs précoces d'apoptose ont été décrits avec la souche 17D (IEX-1, IRF-1, DEC-
1303 1) dès 1 heure post infection dans les cellules HepG2 (320).

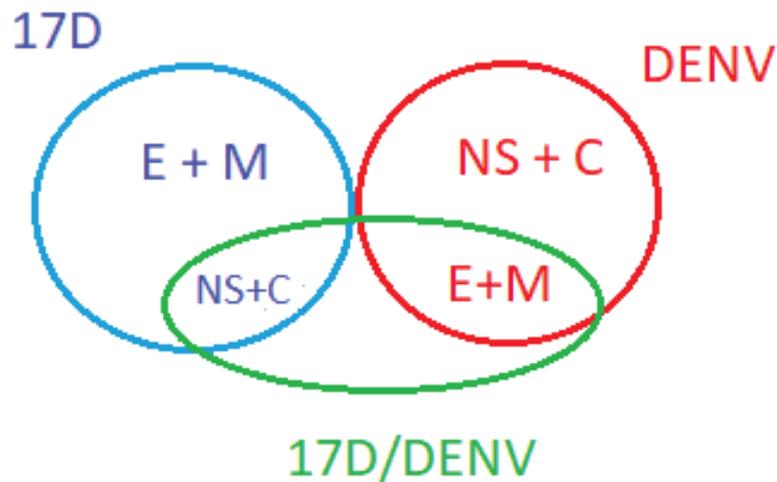
1304 Des approches « omiques » ont été utilisées afin d'étudier l'ensemble des réponses
1305 induites suite à l'infection d'hépatocytes. L'infection de iHeps par DENV-2 induit l'activation
1306 des voies IFN et NF-κB ainsi que l'expression de cytokines pro-inflammatoires (313). Une
1307 étude de RNA-seq a aussi été menée comparant une souche DENV-1 sauvage et sa souche
1308 homologue atténuée ayant pour but d'identifier des modifications post-transcriptionnelles des
1309 ARN cellulaires (326).

1310 Une analyse protéomique de cellules HepG2 infectées par DENV identifie 17 protéines
1311 différentes de la condition non infectée, protéines principalement impliquées dans la
1312 régulation de la transcription et de la traduction (317).

1313 Au sein du laboratoire Sanofi Pasteur, une étude comparant le transcriptome de PHHs 3D
1314 infectés par 17D et YFV a permis de mettre en évidence une dynamique de réponse
1315 immunitaire innée différente entre 17D et YFV. La souche 17D met notamment en place une
1316 réponse interféron plus précoce que la souche YFV (311).

1317

Objectifs



Comparaison	Régions communes	Conclusion si phénotype similaire	Conclusion si phénotype différent
DENV vs 17D/DENV	Enveloppe (E) et Membrane (M)	Phénotype lié aux protéines E et M	Phénotype lié aux protéines NS et C
17D/DENV vs 17D	Protéines non structurales (NS) et Capside (C)	Phénotype non lié à E et M de DENV	Phénotype lié à E et M de DENV

Figure 16 : Stratégie d'utilisation des souches chimériques 17D/DENV dans le but de comprendre le rôle des régions structurales et non structurales dans l'infection de DENV

1318 La fièvre jaune et la dengue sont des pathologies virales humaines causées par des flavivirus,
1319 le virus de la fièvre jaune (YFV) et le virus de la dengue (DENV) respectivement. Ces deux
1320 virus circulent dans l'environnement dans un cycle écologique similaire et sont transmis à
1321 l'homme par le biais de la piqûre du moustique principalement du genre *Aedes*. Les formes
1322 sévères des maladies, parfois mortelles, sont caractérisées par une atteinte du foie. Pour
1323 autant, la sévérité avec laquelle ces deux virus affectent le foie semble différente. Dans le cas
1324 de la fièvre jaune, le foie semble être un organe de prédilection puisqu'une répllication active
1325 du virus est détectée aussi bien chez l'homme qu'au sein des modèles animaux. De plus, la
1326 maladie est caractérisée par des cas de jaunisses fréquents (>70%), des dérégulations des
1327 enzymes hépatiques importants (taux de transaminase pouvant atteindre près de 20 à 40 fois la
1328 quantité normale) et une diminution de la synthèse des facteurs de coagulation. Néanmoins, le
1329 peu d'études cliniques répertoriées dans la littérature sont majoritairement des revues basées
1330 sur des observations descriptives du début-milieu du 19^{ème} siècle.
1331 Dans le cas de la dengue, les données cliniques répertoriant l'atteinte hépatique sont
1332 nombreuses. La fréquence des jaunisses se situe entre 2 et 29% des cas, les taux de
1333 transaminases peuvent atteindre plus de 10 fois la quantité normale dans 3% des patients et la
1334 diminution de la synthèse des facteurs de coagulation semble faible.
1335 Ces données suggèrent que l'atteinte hépatique dans le cas de la dengue est moins sévère que
1336 celle dans le cas de la fièvre jaune. Néanmoins, encore aujourd'hui, aussi bien pour la dengue
1337 que pour la fièvre jaune, les mécanismes associés à la pathogénèse hépatique sont mal
1338 compris. L'étude développée ici s'inscrit dans cette problématique.
1339

1340 L'objectif de cette thèse est de comparer les infections de YFV et DENV dans un modèle *in*
1341 *vitro* d'hépatocytes afin d'identifier les facteurs qui pourraient expliquer leur différence de
1342 pathogénèse hépatique. Le rôle respectif des protéines non structurales et structurales dans
1343 l'infection de DENV sera en particulier évalué.

1344 Dans le but de répondre à cet objectif, deux approches ont été réalisées :

- 1345 (1) L'évaluation de la permissivité des hépatocytes aux virus et la production des
1346 particules virales (**Etude I et II**)
- 1347 (2) L'analyse des réponses cellulaires induites suite aux infections par technique de RNA-
1348 seq (**Etude III**)

1349
1350 Afin de représenter au mieux la diversité du virus DENV, nous avons inclus au sein du projet
1351 les 4 sérotypes de DENV (DENV1-4). L'infection des 4 sérotypes de DENV est ainsi
1352 comparée à celle de YFV sauvage. De plus, l'infection des chimères 17D/DENV (ou CYD)
1353 est aussi étudiée. Ces souches sont composées des régions prM et E des 4 sérotypes de DENV
1354 choisis et des protéines non structurales et de capsid de la souche YFV-17D. La comparaison
1355 des infections de DENV, 17D/DENV et YFV-17D permettra ainsi d'identifier le rôle respectif
1356 d'une part des protéines d'enveloppe et d'autre part des protéines non structurales et de
1357 capsid dans la pathogénèse DENV (Fig. 16).

1358

1359 De par sa facilité d'utilisation et sa capacité à mettre en place une réponse immunitaire
1360 efficace, nous avons opté pour l'utilisation d'un modèle *in vitro* d'hépatocytes dérivés de
1361 cellules souches pluripotentes (iHeps) fourni par la compagnie Cellular Dynamics
1362 International. Un autre avantage pour ce modèle est la mise à disposition par le fournisseur
1363 d'un protocole permettant la culture des iHeps en 3D. Nous pourrions ainsi comparer les
1364 infections d'une part dans un modèle d'iHeps cultivés en 2D (Etude I) et d'autre part dans un
1365 modèle où les iHeps sont sous formes de sphéroïdes (Etude II).
1366

Matériels et Méthodes

1367 1. Virus et modèles cellulaires

1368 1. Virus

1369 Les virus DENV-1 (souche PUO 359, Thailand), DENV-2 (souche PUO 218, Thailand),
1370 DENV-3 (souche CH53489, Thailand), DENV-3 (souche 16562, Philippines), et DENV-4
1371 (souche 1228, Indonesia) sont cultivés au moins une fois sur la lignée de cellules de
1372 moustiques C6/36 puis amplifiés sur cellules VERO. Les souches chimériques
1373 YFV17D/DENV (ou CYD) sont produites et amplifiées sur cellules VERO.

1374 La souche sauvage YFV (souche Asibi, originalement isolée d'un patient Ghanéen infecté
1375 par YFV en 1927) a été produite et amplifiée sur cellules VERO. Le virus YFV-17D (souche
1376 17D-204) est dérivé d'un stock du vaccin Stamaril de Sanofi Pasteur (Lyon, France) et
1377 propagé sur cellules VERO. Un virus inactivé 17D a été produit par inactivation sous lampes
1378 UV (intensité 1,8mW- 4 min pour 10 mL de volume de suspension virale).

1379

1380 2. Modèles cellulaires :

1381 • iHeps cultivés en 2D

1382 Les iHeps sont reçus sous la forme d'hépatocytes pré-différenciés, fournis par la société
1383 Cellular Dynamics International (Madison, WI, USA). Le procédé de maturation se fait selon
1384 le protocole du fournisseur. Rapidement, les cellules sont décongelées etensemencées sur des
1385 plaques coatées au collagène I de rat dans un milieu d'ensemencement contenant du milieu
1386 RPMI (Roswell Park Memorial Institute), du supplément B27, de l'oncostatine M (20
1387 µg/mL), de la dexaméthasone (0.1 µM), de la gentamicine (25 µg/mL), et du supplément
1388 fourni par le Cellular Dynamics International. Le milieu est changé tous les jours pendant 4
1389 jours. Au jour 5, le milieu est remplacé par le même milieu sans oncostatine M. Le milieu de
1390 maintenance est changé tous les 2 jours. Les fournisseurs recommandent l'utilisation des
1391 cellules entre les jours 7 et 14 post-décongélation.

1392

1393 • iHeps cultivés en 3D

1394 Avant d'être mis sous la forme de sphéroïdes, les iHeps sont préalablement cultivés en 2D
1395 comme précédemment mais en milieu DMEM/F-12. Au 5^{ème} jour, les cellules sont décollées
1396 du support à l'aide d'un traitement rapide d'acutase. Les cellules sont alors mélangées à du
1397 milieu de maintenance des sphéroïdes qui contrairement au milieu d'ensemencement ne
1398 contient pas d'oncostatine M. De plus, on ajoute dans ce milieu de maintenance du Geltrex
1399 (A15696-01, Thermo Fisher Scientific) à hauteur de 10% final. Le volume de milieu ajouté
1400 aux cellules décollées sera ajusté en fonction du nombre de cellules souhaitées par sphéroïdes.
1401 Une fois le mélange milieu et cellules effectué, on transfère 70µl/puit de cette suspension
1402 dans une plaque ULA GravityTRAP (InSphero). La plaque est centrifugée puis incubée à
1403 37°C 5% CO₂. Le milieu est changé tous les 2 jours avec le milieu de maintenance de
1404 sphéroïdes.

1405 **2. Infection**

1406 • Infection iHeps 2D

1407 Les iHeps sont infectés 9 jours après leur décongélation à une multiplicité d'infection (MOI)
1408 de 3 pendant 2 heures dans un volume de 50 µL. Après un lavage en PBS 1X, les cellules sont
1409 incubées pour une demi heure dans le milieu de maintenance. Le milieu est de nouveau
1410 éliminé et les cellules rincées de nouveau avec du PBS 1X. Les cellules sont ensuite incubées
1411 dans du milieu de maintenance à 37°C/5% CO₂. Les surnageants sont récoltés aux temps
1412 indiqués dans les expériences et stockés à -80°C jusqu'à leur analyse.

1413

1414 • Infection iHeps 3D

1415 Les iHeps sont infectés par le virus 17D 2 jours après leur formation en suivant la même
1416 procédure que l'infection des iHeps 2D mais avec un temps de contact de 4 heures et un
1417 volume d'infection de 20 µL.

1418 Pour les expériences réalisées afin d'évaluer l'infection de DENV et YFV, les iHeps sont
1419 infectés à une MOI de 3 dans un volume de 80 µL. L'inoculum n'est pas ôté et aucun rinçage
1420 n'est effectué. Les cellules sont incubées à 37°C/5% CO₂.

1421 Les surnageants sont récoltés aux temps indiqués dans les expériences et stockés à -80°C
1422 jusqu'à leur analyse.

1423

1424 **3. Titrages viraux**

1425 • Titration infectieuse

1426 La quantification des virus infectieux dans les surnageants est réalisée par titration de la dose
1427 infectante 50% des cellules en culture (DICC50) sur cellules VERO comme décrit (327).
1428 Rapidement, des cellules VERO sont ensemencées en plaques 96 puits. Dans un second
1429 temps, elles sont infectées avec des dilutions virales successives en pas de 4 à raison de 10
1430 répliquats. Après 7 jours d'incubation à 37°C 5% CO₂, les tapis cellulaires sont fixés à
1431 l'acétone 85% et les puits infectés sont révélés par immunorévélation. La précision du titre
1432 déterminé est de +/- 0,3 log₁₀.

1433 • Titration génomique

1434 La quantification des virus dans le surnageant nécessite au préalable une extraction des ARN
1435 viraux réalisée à l'aide du kit NucleoSpin® 96 Virus (Macherey Nagel, KG, Düren,
1436 Allemagne). Une fois les ARN viraux extraits, une qRT-PCR est réalisée à l'aide d'amorces
1437 ciblant la NS5 de YFV ou de DENV comme décrit (328). On utilise également pour le titrage
1438 des 17D/DENV, les amorces ciblant la NS5 de YFV. En cas d'absence de détection d'ARN
1439 dans le surnageant, une valeur arbitraire de 2 log₁₀ GEQ/mL est donnée.

1440 **4. Immunofluorescence**

1441 • Marquages iHeps 2D

1442 Les iHeps sont fixés avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 min et rincés ensuite à
1443 3 reprises avec du PBS 1X. L'étape de perméabilisation est ensuite réalisée avec du PBS
1444 contenant 0,2% de Triton X-100 pendant 10 min. Les cellules sont ensuite rincées à 3 reprises
1445 puis saturées pendant 1h avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) 3% diluée en

Protéine ciblée	Référence	Fournisseur	Dilution finale
KRT18	ab133272	Abcam	1 :1000
ALB	A6684	Sigma-Aldrich	1 :500
HNF4a	ab92378	Abcam	1 :250
ds RNA	11010200	Scicons	1 :1500
E - YFV	mab36055	Abcam	1 :1500
E - DENV	5C12-3G9	Biotem	1 :2000

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires utilisés pour des marquages immunofluorescents d'iHeps infectés ou non.

1446 PBS. Les anticorps primaires sont ensuite incubés à différentes dilutions (voir Tab. 5) pendant
1447 1h à température ambiante. Les cellules sont rincées à 3 reprises en PBS puis incubées 1 h
1448 avec un anticorps anti-souris ou anti-lapin couplé à l'Alexa555 (1:2000, Invitrogen, Carlsbad,
1449 CA). Les noyaux des cellules sont marqués à l'aide du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI;
1450 Invitrogen). Les images sont capturées à l'aide du microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss,
1451 Oberkochen, Allemagne).

1452

- 1453 • Marquages iHeps 3D

1454 Les microtissus hépatiques sont fixés au PFA 4% pendant 1 heure à température ambiante
1455 puis rincés 4 fois au PBS 1X avec des temps d'incubation d'une demi-heure au minimum.
1456 Une perméabilisation est effectuée avec du Triton à 0,2%, pendant 1 heure à température
1457 ambiante. Après 4 lavages en PBS 1X, les sites aspécifiques sont saturés en BSA 3% pendant
1458 2 heures. L'anticorps anti-KRT18 (1:500, Abcam), dilué dans le tampon de saturation, est
1459 ajouté pendant 2 heures. Les cellules sont lavées à nouveau 4 fois. L'anticorps secondaire de
1460 chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa555 (1:2000, Invitrogen, Carlsbad, CA), dilué dans le
1461 tampon de saturation, est ajouté et les microtissus incubés à température ambiante pendant 2
1462 heures. Les noyaux des cellules sont marqués à l'aide du 4',6-diamidino-2-phenylindole
1463 (DAPI; Invitrogen). Les images sont capturées à l'aide d'un microscope confocal (Carl Zeiss,
1464 Oberkochen, Allemagne).

1465

1466 5. Extraction ARN cellulaires

- 1467 • iHeps 2D

1468 Le milieu de culture des cellules est retiré puis le tampon de lyse est ajouté. On mélange
1469 par aspiration refoulement. Les lysats sont ensuite stockés à -80°C jusqu'au jour de
1470 l'isolement des ARN.

1471 Les ARN totaux sont isolés et extraits à l'aide du kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep
1472 System en suivant les recommandations du fournisseur (Promega, Madison, WI, USA). La
1473 quantification et la qualification des ARN sont effectuées à l'aide du kit Bioanalyzer 2100
1474 RNA (Agilent technologies, CA, USA).

1475 Pour l'étude de RNA-seq, les ARN totaux sont isolés et extraits à l'aide du kit SV 96
1476 Total RNA Isolation System en suivant les recommandations du fournisseur (Promega,
1477 Madison, WI, USA). La quantification et la qualification des ARN sont effectuées à l'aide du
1478 kit HT RNA Reagent et de l'équipement LabChip GXII (PerkinElmer, MA, USA)

1479

- 1480 • iHeps 3D

1481 Le milieu de culture des cellules est retiré puis du PBS 1X est ajouté. Les sphères sont alors
1482 récupérées par aspiration à l'aide d'une pipette et d'un cône 1 mL. Les sphères sont
1483 mélangées de façon à obtenir 20 000 cellules par tube (par exemple, les sphères de 3 000
1484 cellules sont poolées par 7). Après centrifugation, le PBS est ôté du tube et on ajoute le
1485 tampon de lyse du kit ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System. Les lysats sont ensuite
1486 stockés à -80°C jusqu'au jour de l'isolement des ARN.

Gène ciblé	Symbole	Référence
Albumine	ALB	Hs00609411-m1
Alpha-foetoprotéin	AFP	Hs00173490-m1
Apolipoprotéine-B	ApoB	Hs00181142-m1
Aldolase B	ALDOB	Hs01551887-m1
Récepteur AXL tyrosine kinase	AXL	Hs01064444-m1
Cytochrome P450 3A4	CYP3A4	Hs00604506-m1
Claudine-1	CLDN1	Hs00221623-m1
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs02786624-g1
Glucuronidase Beta	GUSB	Hs00939627-m1
Facteur nucléaire hépatocytaire 4 alpha	HNF4a	Hs0023053-m1
Interferon lambda 1	IFN-L1	Hs00601677-g1
Récepteur 1 de la laminine	LAMR1	Hs00347791-s1
Sodium taurocholate co-transporting polypeptide	NTCP	Hs00161820-m1
Protéine de liaison aux régions TATA	TBP	Hs00427620-m1

Tableau 6 : Liste des couples d'amorces utilisés au sein du projet. Mélange d'amorces et de sonde Taqman fourni par Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

1487 6. Quantification expression de gènes

1488 6.1. RTqPCR

1489 La RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) est réalisée en une seule étape à l'aide du
1490 kit Quantitect Probe RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Allemagne) en utilisant les couples
1491 d'amorces avec la sonde Taqman spécifique du gène ciblé (Tab. 6). Le mélange amorces et
1492 sonde est fourni par Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Les conditions de
1493 quantification sont les suivantes : 95°C pendant 10 min, suivi de 40 cycles de 95°C-15 s et
1494 60°C-60s. Les données de qRT-PCR sont normalisées aux gènes de ménage : glyceraldehyde
1495 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glucuronidase beta (GUSB), and TATA-binding
1496 protein (TBP). Les résultats sont présentées sous la formes de fold changes c'est à dire en
1497 expression relative de celle observée soit au jour 3 ou 5 post-décongélation pour l'expression
1498 des marqueurs hépatiques soit à la condition non infectée pour l'expression d'IFN-L1. Les
1499 variations d'expression (fold-change) sont calculées en utilisant la méthode 2- $\Delta\Delta Ct$ (329), à
1500 l'exception de l'expression des co-récepteurs de DENV où les datas sont analysées en
1501 utilisant une quantification relative ($\Delta\Delta Ct$) et où les valeurs de Ct sont normalisée à la
1502 GAPDH. En cas d'absence de détection par qRT-PCR, une valeur de 40 Ct est donnée de
1503 façon arbitraire.

1504 6.2. Etude RNAseq

1505
1506 Pour cette étude, 4 lots de cellules ont été infectés à une MOI de 3 de façon indépendante par
1507 chacun des virus : YFV, DENV-1 à 4, 17D/DENV-1 à 4 et YFV-17D (voir procédure
1508 d'infection plus haut).

1509 Les ARN totaux des cellules infectées et non infectées sont extraits aux temps 24, 48 et 96
1510 heures post-infection selon la méthode d'extraction décrite précédemment. Le kit Universal
1511 mRNA de NuGEN a été utilisé pour la préparation des librairies en suivant les
1512 recommandations du fournisseur. Brièvement, les ARNm sont purifiés à partir de 10 ng
1513 d'ARN total grâce à l'utilisation de billes magnétiques oligo-dT. Les ARNm sont ensuite
1514 fragmentés puis synthétisés en ADNc. Après une réparation des extrémités des ADNc doubles
1515 brins, des adaptateurs sont ligués de part et d'autres des ADNc. Une amplification des ADNc
1516 est réalisée grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques des adaptateurs générant des amplicons
1517 d'une taille d'environ 200–500 bp. Contrairement au fournisseur qui recommande une seule
1518 purification à l'éthanol 70% des amplicons, deux étapes de purifications successives ont été
1519 réalisées afin d'éliminer toute trace de fragments non spécifiques (ex : dimères d'amorces).

1520 Les librairies amplifiées sont ensuite hybridées sur puce ("flow cell") de séquençage Illumina
1521 à une concentration de 1.6 pM. La lecture de séquençage s'effectue à partir d'une seule
1522 extrémité (Single-end reads) sur une longueur de 75 pb. Une étape de contrôle qualité est
1523 alors effectuée afin d'éliminer les échantillons dont le séquençage est de qualité trop faible ou
1524 le nombre de lectures insuffisant. Dans notre cas, aucun échantillon n'a été éliminé. Chacun
1525 des échantillons est ensuite aligné au génome humain de référence (Homo_sapiens.
1526 GRCh38.77) en utilisant le logiciel STAR. Le nombre de lectures ("count") par gène est
1527 calculé en utilisant le logiciel Salmon. Les données sont ensuite normalisées à l'aide de la

1528 méthode DESeq2. Pour chacun des temps étudiés, les gènes différentiellement exprimés ont été
1529 identifiés en comparant 2 à 2 les gènes associés aux cellules infectées et aux contrôles à l'aide
1530 de DESeq2 (330). Pour chaque virus et point de temps, les 4 réplicats techniques provenant
1531 des cellules infectées ont été comparés aux 4 échantillons contrôles. L'analyse en composante
1532 principale sur les données normalisées a mis en évidence des effets liés aux batch
1533 d'extractions de l'ARN et de préparation des bibliothèques ainsi qu'aux lots de cultures. Afin de
1534 supprimer ces effets confondants, 2 termes associés à ces effets ont été rajoutés dans le
1535 modèle. Une source importante de faux positifs dans les analyses différentielles provient des
1536 gènes faiblement exprimés pour lesquels de larges fold-changes peuvent être observés par
1537 chance, sans signification biologique. Afin d'éviter ce problème, DESeq2 propose 3 méthodes
1538 de correction (« shrinkage ») des fold-changes. L'approche apeglm, récemment publiée et
1539 recommandée par les auteurs de DESeq2, a été choisie dans ce travail (331).

1540 Pour l'analyse biologique, seuls les transcrits différentiellement exprimés avec une p-value
1541 ajustée supérieure à 0.05 et un fold-change (\log_2) supérieur à 1 et inférieur à -1 ont été
1542 analysés.

Résultats et Discussion

1543 **Etude I : Comparaison de l'infection de DENV et YFV dans un**
1544 **modèle d'hépatocytes dérivés de cellules souches pluripotentes**
1545 **cultivés en monocouche.**
1546

1547 **1. Objectifs**
1548

1549 L'objectif de cette première étude est de comparer la permissivité des hépatocytes dérivés de
1550 cellules souches (iHeps) aux virus YFV sauvage et aux 4 sérotypes de DENV ainsi que la
1551 production de particule virale suite aux infections par ces virus.

1552 Une première partie des résultats est présentée sous la forme d'un article scientifique qui sera
1553 prochainement soumis dans le journal Virology de Elsevier. Les points clés de cette étude
1554 sont repris dans la section 3 de cette étude.

1555 Enfin une deuxième partie des résultats ont pour but d'évaluer l'impact des protéines non
1556 structurales et structurales dans l'infection de DENV sur iHeps grâce à l'utilisation des
1557 chimères 17D/DENV.

1558 **2. Résultats et discussion - partie 1**

1559 **Dengue virus infection in hepatocytes derived from**
1560 **induced pluripotent stem cells.**

1561 **Genevois M^{1,2}, Lecine P², Barban V¹**

1562 ¹*Research and Development Department, Sanofi Pasteur, Marcy L'Etoile, France;*

1563 ²*BIOASTER Microbiology Technology Institute, Lyon, 69007, France*

1564

1565 **Running head:** Dengue infection in hepatocyte-like cells

1566

1567 **HIGHLIGHTS**

- 1568 - YFV replication in iHeps (hepatocytes derived from induced pluripotent stem cells) is
1569 higher than those of all DENV serotypes
1570 - Contrary to YFV, DENV internalization in iHeps and PHH (primary human
1571 hepatocytes) is low.
1572 - A combined role of non-structural and structural proteins may be implicated in the
1573 low DENV-3 replication.

1574

1575 **ABSTRACT**

1576 The pathogenesis of dengue virus (DENV)-induced liver injury is unclear. In recent years, hepatocytes
1577 derived from induced pluripotent stem cells (iHeps) have become useful *in vitro* models to study
1578 virus–hepatocyte interactions. In this work, we demonstrate that all DENV serotypes are able to
1579 replicate in iHeps, albeit with different efficiency and with lower rates compared with yellow fever
1580 virus (YFV). This difference between DENV and YFV may be explained in part by viral dissemination.
1581 Interestingly, although DENV-3 was able to enter iHeps with the same efficiency as other serotypes, it
1582 had the lowest replication rate. Using a chimeric YFV17D/DENV3 virus, expressing precursor
1583 membrane and envelope protein genes from DENV-3, we demonstrate that both nonstructural and
1584 structural proteins are responsible for this phenotype.

1585 Introduction

1586 Dengue virus (DENV) is a member of the Flaviviridae family and the genus *Flavivirus*, which includes
1587 yellow fever virus (YFV) and West Nile virus. These are small enveloped viruses with a positive-sense,
1588 single-stranded RNA that codes for three structural (capsid [C], precursor membrane [prM], and
1589 envelope [E]) and seven nonstructural (NS) proteins [1]. DENV can be divided into four different
1590 serotypes (DENV-1 to DENV-4) based on the antigenic difference of E proteins; the serotypes are
1591 genetically diverse with limited shared identity (around 60–75%) at the amino acid level [2]. All four
1592 DENV serotypes are transmitted to humans by mosquitoes of the genera *Aedes* in tropical and
1593 subtropical areas [2].

1594 Although a high proportion of infections are asymptomatic, around 100 million symptomatic dengue
1595 cases are estimated to occur each year. Symptoms range from a very mild illness with flu-like
1596 symptoms to a fatal hemorrhagic fever coupled with multi-organ failure and severe plasma leakage
1597 [3]. The liver is one of several organs targeted by DENV. Although viral antigens and histopathological
1598 alterations have been found in liver samples of fatal dengue cases [4, 5], liver involvement in dengue
1599 pathogenesis is not as obvious as in yellow fever where liver injury seems critical in disease
1600 development [6]. Jaundice and acute liver failure have been observed in dengue cases, but less
1601 frequently than in yellow fever cases. Nevertheless, hepatomegaly and liver enzyme abnormalities,
1602 such as elevated aspartate and alanine transaminases, are listed as warning signs of severe dengue
1603 by the World Health Organization [7].

1604 The four DENV serotypes are able to enter and replicate in a number of different human hepatocyte
1605 cell lines [8, 9]. Although these cell lines are useful readily available models, they have been
1606 genetically modified making their biological relevance to replicate human disease uncertain [10, 11].
1607 To avoid any bias related to cell lines, primary human hepatocytes (PHHs) are preferred as they
1608 closely reflect living tissue. However, their use has been restricted to very specific laboratories due to
1609 their limited and unpredictable availability, the strict culture conditions required, and variable
1610 metabolic/functional activity between donors.

1611 Recently, hepatocytes derived from human induced pluripotent stem cells (iHeps) have been
1612 developed to overcome some of these limitations. These cells are generated by reprogramming
1613 somatic cells followed by a differentiation process characterized by three essential steps: definitive
1614 endoderm, hepatic progenitors and mature hepatocyte-like cells. The expression of different genes is
1615 generally evaluated to ensure that cells pass through different steps of differentiation/maturation,
1616 for example hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4a), cytokeratin 18 (KRT18), and alpha-
1617 fetoprotein (ALFP) mark the initial hepatocyte lineage [12], whereas albumin (ALB) and cytochrome
1618 P450 3A4 (CYP3A4) are mostly evaluated at final differentiation stages [13]. iHeps are a better
1619 physiological *in vitro* model for hepatotoxicity studies than most hepatoma cell lines [14]. They have
1620 also been used for modeling host interactions with hepatotropic viruses such as hepatitis B virus
1621 (HBV) and hepatitis C virus [15, 16]. To the best of our knowledge, only one study has evaluated
1622 iHeps interaction with dengue viruses (DENV-2) [17]. Of note, the differentiation process had an
1623 impact on DENV replication and subsequently, on DENV co-receptor expression.

1624 Here, we characterized iHeps maturation and compared the infectivity of the four DENV serotypes
1625 relative to YFV. We confirm that all DENV serotypes replicate in iHeps, albeit with different efficiency

1626 and with lower rates compared with YFV. We focused on DENV-3 as it enters iHeps with the same
1627 efficiency as the other serotypes, but had the lowest replication rate.

1628 **Materials and Methods**

1629 **Cells**

1630 iHeps were received as pre-differentiated hepatocytes, purchased from Cellular Dynamics
1631 International (Madison, WI, USA). Maturation processes were performed following the
1632 manufacturer's protocol. Briefly, cells were thawed and seeded onto rat tail collagen type I-coated
1633 surfaces using Plating Medium which comprised Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium,
1634 B27 supplement, oncostatin M (20 µg/mL), dexamethasone (0.1 µM), gentamicin (25 µg/mL), and
1635 medium supplement provided by Cellular Dynamics International. Medium was replenished daily for
1636 4 days after seeding. On day 5, plating medium was replaced by maintenance medium, which did not
1637 contain oncostatin M. Maintenance medium was refreshed every 2 days. The provider recommends
1638 initiating assays between 7 and 14 days post-plating.

1639 Cryopreserved PHHs, a kind gift from Evotec Infectious Disease (Lyon, France) Virology Unit, were
1640 thawed and cultured in hepatocyte growth medium (HGM) composed of William's E basal medium
1641 supplemented with 5 mg/L insulin, 27.4 mg/L hydrocortisone, 2% dimethyl sulfoxide, 10% fetal
1642 bovine serum, and 0.1% penicillin-streptomycin. Briefly, hepatocytes were plated in collagen-coated
1643 culture plates at a density of 70,000 cells/96 well in HGM. After 4 h, the medium was changed; 24 h
1644 post-seeding, the medium was changed again to HGM supplemented with matrigel. HGM was
1645 refreshed every 2 days until use. The batch of PHHs used was previously attested to support HBV
1646 infection.

1647 **Viruses**

1648 DENV-1 (strain PUO 359, Thailand), DENV-2 (strain PUO 218, Thailand), DENV-3 (strain CH53489,
1649 Thailand), DENV-3 (strain 16562, Philippines), and DENV-4 (strain 1228, Indonesia) were passaged at
1650 least once in C6/36 mosquito cells and amplified on Vero cells. Chimeric YFV17D/DENV-3 were
1651 produced and amplified on Vero cells. Its construction is reported by Guy et al. [18].

1652 Wild type YFV strain Asibi (originally isolated from a male Ghanaian patient infected by YFV in 1927)
1653 was produced and amplified on Vero cells. YFV-17D (strain 17D-204) was derived from Sthamril
1654 vaccine stocks at Sanofi Pasteur (Lyon, France) and propagated on Vero cells, as reported by Barban
1655 et al. [19].

1656 **Cellular RNA isolation and qRT-PCR**

1657 Total RNA was isolated and purified using ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System in accordance
1658 with the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, USA). RNA quantitation and quality
1659 were assessed using a Bioanalyzer 2100 RNA Kit from Agilent technologies. Real-time quantitative
1660 reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed in one step with
1661 Quantitect Probe RT-PCR (QIAGEN, Hilden, Germany) using the appropriate primer pair mix with
1662 Taqman probe supplied by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Primers are listed in Table
1663 S1. Running conditions were: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s.
1664 Data from qRT-PCR were normalized to multiple internal control genes: Glyceraldehyde 3-phosphate

1665 dehydrogenase (GAPDH), glucuronidase beta (GUSB), and TATA-binding protein (TBP). Results are
1666 presented as fold changes in gene expression relative to day 3 post-seeding calculated with the 2-
1667 $\Delta\Delta C_t$ method [20], except for expression of DENV co-receptor where data were analyzed using
1668 relative quantitation ($\Delta\Delta C_t$), where gene Ct values were normalized to GAPDH.

1669 **Albumin secretion**

1670 Albumin (ALB) secretion was measured using a human ALB enzyme-linked immunosorbent assay
1671 (ELISA) quantitation kit (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA) as per the manufacturer's
1672 protocol.

1673 **Viral infection and quantitation of secreted virus**

1674 iHeps and PHHs were infected at a multiplicity of infection (MOI) of three for 2 h in a total volume of
1675 50 μ L. After one wash with phosphate buffered saline (PBS), cells were incubated with the
1676 maintenance medium for 30 min, to eliminate residual inoculum, and then washed again with PBS.
1677 Cells were then incubated in medium at 37°C/5% CO₂. Supernatants were collected at indicated time
1678 points and stored at -80°C until analysis. Virus quantitation in the supernatant was performed by
1679 standard 50% cell culture infectious doses (CCID₅₀) assay on Vero cells as previously described [21], or
1680 by YFV and DENV NS5-specific qRT-PCR after viral RNA extraction by NucleoSpin® 96 Virus (Macherey
1681 Nagel, KG, Düren, Germany) [22].

1682 **Immunofluorescence**

1683 iHeps and PHHs were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed three times with PBS.
1684 Permeabilization was performed by incubating cells with PBS containing 0.2% Triton X-100 for
1685 10 min. Cells were then washed with PBS three times and blocked for 1 h with 3% bovine serum
1686 albumin diluted in PBS. Primary antibodies were incubated for 1 h at room temperature followed by
1687 a 1 h incubation with anti-mouse or anti-rabbit Alexa Fluor 555 (1:2000, Invitrogen, Carlsbad, CA).
1688 Primary antibodies are listed in Table S2. Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole
1689 (DAPI; Invitrogen). Cells were imaged with an Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen,
1690 Germany). The percentage of positive cells and standard deviation were estimated from at least 500
1691 cells. To quench PHH autofluorescence, cells were incubated with 0.3% Sudan Black diluted in 70%
1692 ethanol before blocking.

1693 **Statistical analysis**

1694 One-way analysis of variance (ANOVA) was performed with GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software,
1695 La Jolla, CA, USA). Data are presented as means \pm standard deviation and P values < 0.05 are
1696 considered significant.

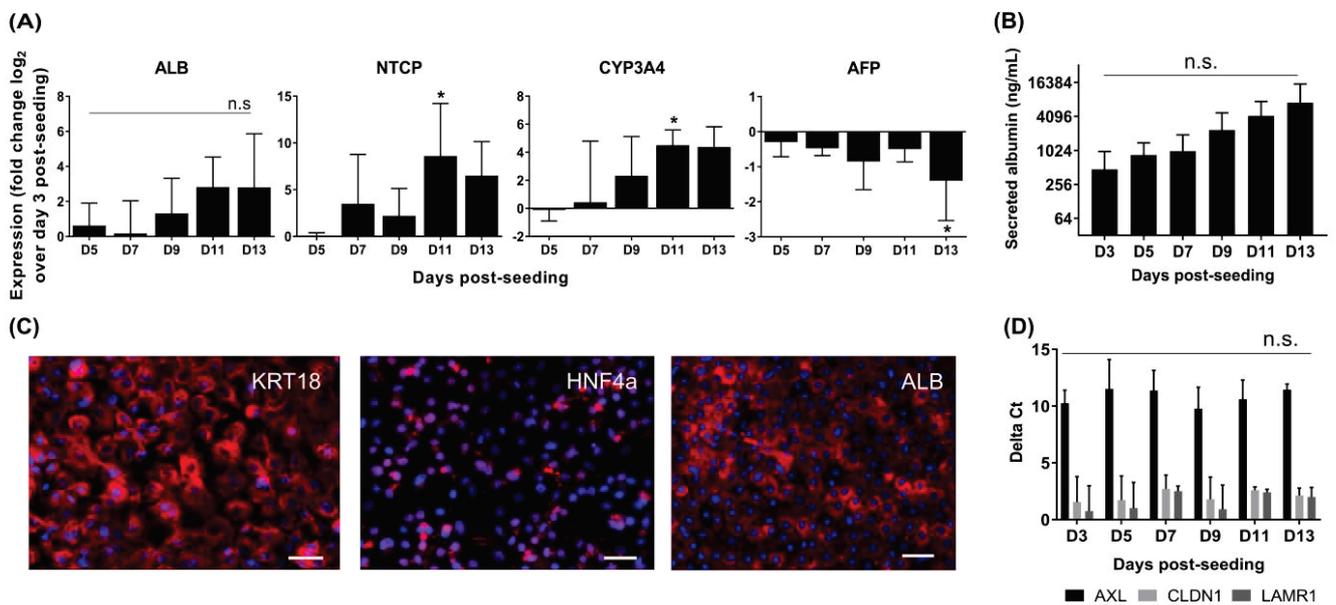


Fig. 1. Maturation of iHeps does not affect DENV entry co-receptors.

- (A) Total RNA was extracted at different days post-seeding and subjected to real-time qRT-PCR to measure cellular expression of albumin (ALB), cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP), and alpha-fetoprotein (AFP). Normalization was performed using housekeeping genes, and values at day 3 post-seeding were used as reference to calculate the fold change.
- (B) ALB protein was measured by ELISA assay in the supernatant collected at the indicated days post-seeding.
- (C) Immunofluorescence staining of iHeps at day 7 post-thawing with hepatocyte-specific antibodies of cytokeratin 18 (KRT18), hepatocyte nuclear factor 4a (HNF4a), and albumin (ALB). Scale bar, 50 μm.
- (D) Total RNA was extracted at different days post-seeding and three DENV co-receptor genes were quantified by real-time qRT-PCR: AXL receptor tyrosine kinase (AXL), claudin-1 (CLDN1), and laminin receptor 1 (LAMR1). All the genes were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase expression to obtain their relative gene-expression ratio.

Four independent experiments were performed. Data are presented as mean ± standard deviation. P values were calculated using one-way ANOVA: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n.s.: not statistically significant.

1697 **Results**

1698 **Evaluation of iHeps maturation and impact on DENV entry co-receptors**

1699 To evaluate the maturation state over the first 14 days of culture, expression of the following
1700 markers was assessed: ALB, cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), alpha-fetoprotein (AFP) and sodium
1701 taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP). The latter plays an essential role in the transport of
1702 bile salt and has also been identified as crucial for HBV infection (Fig. 1A). Cell maturation resulted in
1703 an increase of CYP3A4 and NTCP gene expression with a significant increase at day 11 post-seeding.
1704 The expression of AFP decreased and the decrease was significant at day 13 post-seeding (Fig. 1A).

1705 In agreement with its mRNA expression, ALB production (Fig. 1B) did not statistically differ from day
1706 3 to day 13 post-seeding even though a trend toward an increase was observed.

1707 To evaluate the proportion of mature hepatocytes present within the culture, we carried out
1708 immunofluorescence assays at day 7 post-plating following staining of hepatocyte nuclear factor 4
1709 alpha (HNF4a), cytokeratin 18 (KRT18), and ALB proteins (Fig. 1C). Most of the cells expressed KRT18,
1710 HNF4a, and ALB proteins at day 7 post-seeding, showing that the cell culture was composed of a
1711 highly pure and homogeneous population of hepatocytes (Fig. 1C).

1712 Finally, expression of AXL receptor tyrosine kinase (AXL, called also TAM-3), claudin-1 (CLDN1), and
1713 laminin receptor 1 (LAMR1) was also investigated (Fig. 1D). These proteins play important roles in
1714 DENV binding to cell surfaces and in mediating entry into multiple cell types, including hepatocytes
1715 [23-25]. The expression of these genes was stable during the hepatocyte maturation process. DENV
1716 co-receptors expression is thus not altered by maturation.

1717 In light of these data, maturation occurs in these cells over time without any impact on DENV co-
1718 receptor expression. Given the time constraints for viral replication together with the limited culture
1719 time of iHeps, we decided to infect iHeps with DENV between days 7 and 9 post-plating.

1720

1721 **Replication and entry of the four DENV serotypes and YFV in iHeps**

1722 iHeps were infected with YFV and DENV 1–4 viruses at a MOI of three. Viral production was first
1723 determined by qRT-PCR (Fig. 2A). Viral replication was observed with all serotypes, albeit with some
1724 variations. YFV replicated with a significantly higher titer than all DENV serotypes (multiple
1725 comparisons: $P < 0.05$) (Fig. 2A). Comparison of DENV serotypes highlights some differences: DENV-4
1726 had a significant higher genomic titer than DENV-2 ($P = 0.02$). DENV-1 genomic titer was always
1727 observed to be between DENV-4 and DENV-2, but no significant difference could be established
1728 between the three serotypes (DENV-1 vs DENV-4, $P = 0.94$; DENV-1 vs DENV-2, $P = 0.08$). DENV-3
1729 consistently had the lowest replication rate (multiple comparisons: $P < 0.001$) and reached 4 log
1730 genome equivalent (Geq)/mL, which barely exceeded the threshold of detection.

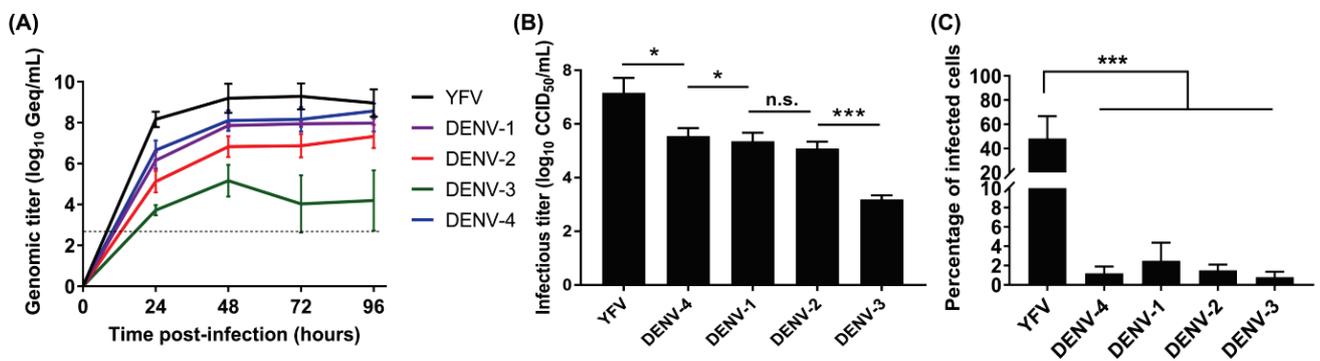


Fig. 2. DENV replication and propagation is less efficient than YFV in iHeps.

(A) iHeps were infected at a multiplicity of infection of three and rinsed 2 h post-infection. Viral RNA was extracted from collected supernatant at the indicated time points and subjected to qRT-PCR specific for YFV or DENV NS5 gene.

(B) Supernatant was collected at 48 h post-infection on iHeps infected as described above. Then, infectious particles produced were quantified by plaque assay on Vero cells.

(C) iHeps infected as described above were fixed at 48 h post-infection. Cells were stained with an anti-dsRNA antibody added to an anti-E antibody to detect viral antigens and with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The percentage of infected cells was estimated by the ratio of the antigen-labeled cells versus nuclei. Scale bar, 50 μ m.

At least three independent experiments were performed. Data are presented as mean \pm standard deviation. P values were calculated using one-way ANOVA: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n.s.: not statistically significant. To compare genomic titer of different viruses, the area under the curve was calculated for each virus beforehand.

1731 *Flavivirus* infection is known to produce non-infectious immature particles [26]. To evaluate the
1732 infectivity of the produced viral particles, infectious titers were determined by plaque assay using
1733 released virus at 48 h post-infection (Fig. 2B). Infectious particles were detected in supernatant from
1734 all viral infections. Accordingly, infectious titer of YFV was higher than those from DENV, reflecting
1735 the genomic titers. As expected, the infectious titer of DENV-3 was significantly lower than for YFV
1736 and the other DENV serotypes (Fig. 2B). This difference may also reflect various percentages of
1737 infected hepatocytes by each virus.

1738 To assess this hypothesis, the percentage of infected cells was therefore determined by
1739 immunofluorescence, using antibodies that recognize dsRNA and viral E proteins from YFV or from
1740 DENV (see Table S2). Primary antibodies recognizing dsRNA and E protein from YFV or DENV were
1741 mixed to enhance the threshold of detection. Viral antigen-containing cells were then evaluated 48 h
1742 post-infection (Fig. 2C). YFV RNA and E protein were detected in approximately 50% of cells and
1743 appeared homogeneously distributed in iHeps cytoplasm, validating the capacity of YFV to enter
1744 iHeps. In contrast, and despite a difference of around 1 log Geq/mL and 2 log CCID₅₀/mL between YFV
1745 and DENV-1, 2, and 4, the percentage of DENV-infected cells was low compared with YFV, but was
1746 consistent across the different serotypes. We observed only 1–2% of infected iHeps by DENVs,
1747 regardless of serotype, suggesting restricted DENV propagation. Fluorescent labeling was observed
1748 throughout the cytoplasm and in the case of DENV-4, labeling was also present in the nucleus (Fig.
1749 S1). Despite the lowest replication rate, DENV-3-specific fluorescent labeling was observed in iHeps
1750 with the same percentage as other serotypes, which may reflect a block on replication after viral
1751 entry.

1752 **Replication assessment of different DENV-3 strains and a chimeric YF17D/DENV3 virus**

1753 To confirm that DENV-3 is able to enter iHeps, cells were infected with a chimeric YF17D/DENV3 virus
1754 at a MOI of three and viral replication was determined by qRT-PCR (Fig. 3A). The envelope of this
1755 chimeric virus shares 99% identity with the envelope of DENV-3. In parallel, the propagation of
1756 another DENV-3 strain, named DENV-3 16562, was assessed to determine if this low replication is
1757 serotype-specific or strain-dependent.

1758 Both the chimeric YF17D/DENV3 and the DENV-3 16562 replicated more efficiently than DENV-3,
1759 suggesting that the low replication of DENV-3 is not serotype-specific but strain-dependent.
1760 Furthermore, since YF17D/DENV3 and DENV-3 harbors common structural proteins, the low
1761 replication of DENV-3 could be attributed to NS proteins and also to the pre-M and E proteins, as
1762 chimeric YF17D/DENV3 does not replicate as efficiently as YF17D.

1763 Finally, to determine if low DENV-3 replication is due to an intrinsic defect of NS proteins of this
1764 strain, replication of DENV-3 and DENV-3 16562 was evaluated in Vero cells (Fig. 3B). DENV-3
1765 replication was close to DENV-3 16562 reaching 8 log Geq/mL, demonstrating that DENV-3
1766 replication machinery was not impaired.

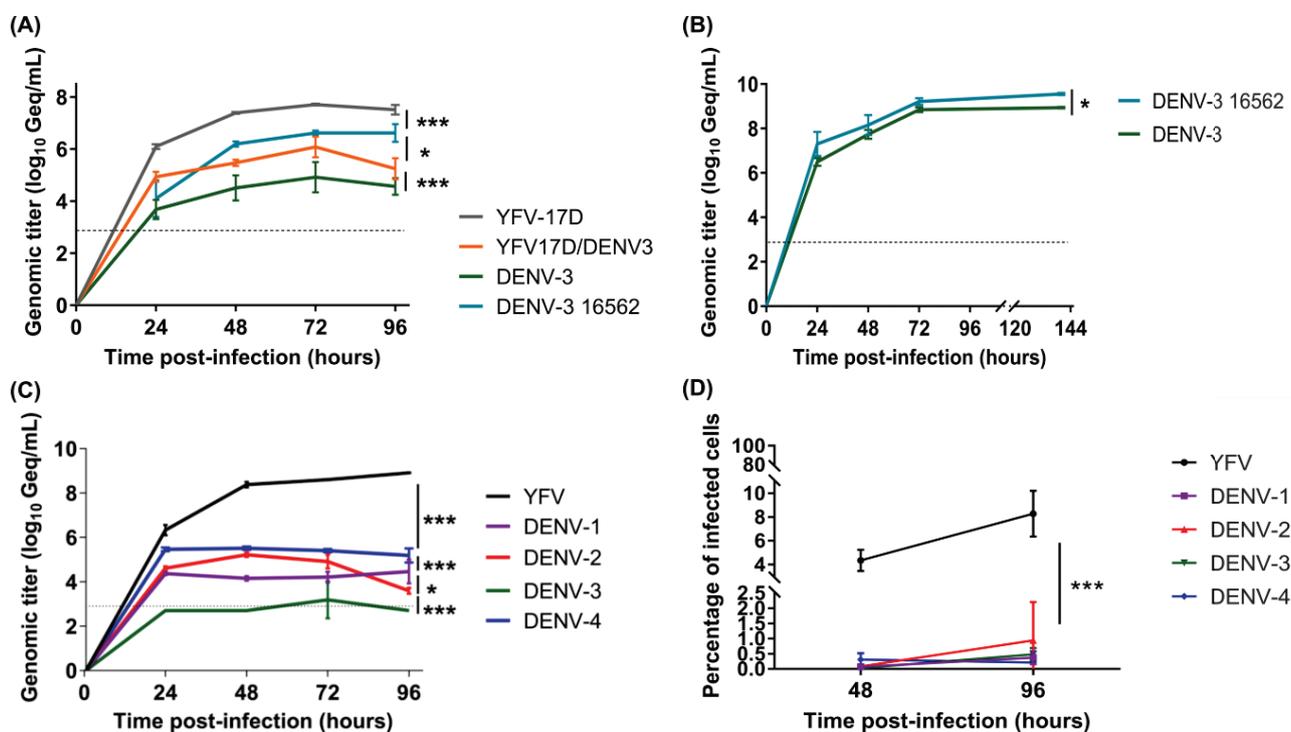


Fig. 3. DENV-3 replication is strain specific and cell type dependent

(A) iHeps were infected at a multiplicity of infection (MOI) of three and rinsed 12 h post-infection. To assess genomic titer, viral RNA was extracted from collected supernatant at the indicated time points and subjected to qRT-PCR specific for YFV or DENV NS5 gene.

(B) Vero cells were infected at a MOI of three and rinsed 2 h post-infection. Viral RNA was extracted from collected supernatant at the indicated time points and subjected to qRT-PCR specific for DENV-3 NS5 gene.

(C) PHH were infected at a MOI of three and rinsed 2 h post-infection. Genomic titers were assessed as described above.

(D) PHH were fixed at 48 and 96 h post-infection. Cells were stained with an anti-dsRNA antibody added to an anti-E antibody to detect viral antigens and with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The percentage of infected cells was estimated by the ratio of the antigen-labeled cells versus nuclei. Three independent experiments were performed. Data are presented as mean \pm standard deviation. P values were calculated using one-way ANOVA: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. To compare genomic titer of different viruses, the area under the curve was calculated for each virus beforehand.

1767 **Replication and entry of the four DENV serotypes and YFV in PHHs**

1768 As viral replication is cell-type specific, we wondered if infection of iHeps reflects flavivirus infection
1769 of PHHs. PHHs were therefore infected with all DENV serotypes and YFV at a MOI of three. Viral
1770 production was determined by qRT-PCR (Fig. 3C). Overall, DENV genomic titers following infection of
1771 PHHs were lower compared with iHeps infection. Nevertheless, viral replication order was the same
1772 as iHeps. In accordance with iHeps infection, YFV resulted in the highest replication (multiple
1773 comparisons: $P < 0.001$) and reached around 8.5 log Geq/mL. DENV-4 replication was significantly
1774 higher than DENV-2 ($P < 0.01$). DENV-1 genomic titer was observed between those of DENV-4 and
1775 DENV-2 but was significantly different from both of them (DENV-1 vs DENV-4, $P < 0.001$; DENV-1 vs
1776 DENV-2, $P = 0.04$). Moreover, DENV-3 replication was the lowest (multiple comparisons: $P < 0.001$) and
1777 was only detected at 72 h post-infection.

1778 We also evaluated the percentage of infected PHHs by immunofluorescence (Fig. 3D). Overall, the
1779 percentage of PHHs infected by DENV and YFV was ten times lower compared with iHeps infection.
1780 However, the ratio of infected cells between YFV and DENV was conserved: YFV infected 20 times
1781 more cells than DENV (Fig. 2D and 3D). Moreover, the number of PHHs infected by YFV significantly
1782 increased between 48 and 96 h post-infection ($P < 0.001$) supporting an active propagation in YFV
1783 infection, which may explain the observed increase in genomic titer (Fig. 3C) In contrast, as for the
1784 genomic titer, the percentage of DENV-infected cells did not change between 48 and 96 h post-
1785 infection, suggesting a restricted propagation of DENV.

1786 **Discussion**

1787 *In vivo*, hepatic lesions in DENV resemble those of the early stage of YFV infection [27]. To date, liver
1788 involvement in DENV pathogenesis progression is not well understood.

1789 Here, we studied DENV–hepatocyte interaction using an iHeps model. We demonstrated for the first
1790 time the internalization and replication of the four DENV serotypes as well as YFV in iHeps. Following
1791 iHeps and PHHs infection, YFV shows the highest replication rate associated with the highest
1792 percentage of infected cells. These observations are consistent with the finding of Marianneau et al.,
1793 who compared YFV and DENV-1 replication following infection of the hepatoma cell line, HepG2 [28].
1794 It is possible that DENV binding to hepatocytes is less efficient than YFV. Interestingly, no entry
1795 receptor has been described for flaviviruses. Numerous molecules called co-receptors have been
1796 demonstrated to facilitate their entry but mutation does not abrogate infectivity. To our knowledge
1797 and in contrast to DENV, very few YFV co-receptors were reported in the literature. Only proteins
1798 belonging to the TIM-TAM family and glycosaminoglycans have been described [24, 29, 30]. These
1799 molecules were also associated with the DENV entry mechanism in different cell types including
1800 hepatocytes [24, 31]. Heat shock, laminin, and claudin proteins were also found to be implicated in
1801 DENV–hepatocyte interactions [23, 25, 32]. In our iHeps model, in contrast to a previous study with
1802 HBV and DENV, we show that DENV co-receptor expression is stable during cell maturation and does
1803 not correlate with progress in the maturation process [16, 17]. The different number of infected cells
1804 observed between DENV and YFV may be due to the differential expression of a distinct unknown
1805 receptor specifically used by each virus. Alternatively, affinity for co-receptors could be slightly
1806 different for each virus.

1807 Different glycan compounds on the *Flavivirus* surface have also been reported to have a direct
1808 impact on viral tropism, in particular on viral assembly [33, 34]. However, the fact that the
1809 production of infectious viral particles per antigen-positive cell was higher for DENV than YFV
1810 suggests that deficiencies in viral assembly and excretion could not explain the difference in
1811 infectivity observed between DENV and YFV.

1812 Furthermore, we observed, in contrast to YFV, a very low percentage of DENV-infected iHeps and
1813 PHHs of around 2% and 0.5%, respectively. We also found that DENV propagation in PHHs is
1814 restricted. To our knowledge, this is the first time that such a low infection rate has been reported.
1815 Usually, 20–90% of hepatoma cells are infected. In the only studies done on iHeps and PHH, DENV
1816 infected 100% of iHeps, and around 70% of PHHs [17, 35-37]. Immunohistochemistry assays on liver
1817 from fatal DENV patients show a variable percentage of infection ranging from no antigen detection
1818 [38] to >90% of hepatocytes infected[4]. Differences or similarities reported in *in vitro* studies could
1819 be influenced by cell type, cell preparation, MOI, and cell-culture passage history of the virus. Virus
1820 strains could also influence *in vivo* and *in vitro* pathogenesis. Finally, host factors such as age and
1821 genetic predisposition are known to influence DENV pathology features [39, 40]. Here, iHeps and
1822 PHHs were each taken from one donor who was potentially less susceptible to high DENV
1823 dissemination. Nevertheless, the fact that we found similar observations in two different cell types
1824 would favor an impact of viral factors. Restricted DENV propagation could be explained by a different
1825 hypothesis. First, as demonstrated in HepG2, cell death is rapidly induced by DENV and later by YFV
1826 [28]. This finding emphasizes that early apoptosis could be a protective mechanism that limits viral
1827 propagation [41]. Second, several flavivirus escape mechanisms have been reported in the literature,
1828 in particular to counteract the type I interferon pathway [42]; thus, YFV may be able to counteract
1829 the innate immune response more efficiently than DENV, which is blocked by paracrine innate
1830 signaling.

1831 To further investigate DENV liver pathogenesis, we compared the replication and the entry efficacy
1832 of the four DENV serotypes. We observed that DENV replication in PHHs and in iHeps was serotype-
1833 specific. DENV-4 actively replicates, similar to DENV-1 followed by DENV-2 and then by DENV-3,
1834 which barely exceeded the detection threshold. DENV-3 infection also produced the lowest number
1835 of infectious particles. The use of different entry receptors on liver cells has been reported, in
1836 particular in the Thepparit and Smith study, where DENV-1 was shown to use high-affinity laminin
1837 receptors to bind to and enter liver cells, in contrast to infection with DENV-2, -3, or -4 [25].
1838 Moreover, DENV-4 internalization and maturation has previously been reported to be faster than
1839 that of DENV-3 in HepG2 cells [8]. However, our study showed that the mechanism of entry could not
1840 by itself recapitulate the replication difference observed between the serotypes. First, the
1841 percentage of infected cells did not differ between serotypes, suggesting a similar entry efficacy.
1842 Second, we investigated the entry mechanism by using a chimeric strain, YFV17D/DENV3, which
1843 shares 99% identity to DENV-3 pre-M and E proteins. As YFV17D/DENV3 replication in iHeps is higher
1844 than its parental DENV-3 strain, we hypothesize that NS proteins are also, in part, responsible for this
1845 low replication rate. As these proteins are implicated in viral replication and in innate immune escape
1846 [42], we further investigated the replication of DENV-3 in Vero cells, African green monkey
1847 fibroblasts that have lost the ability to produce type I interferon [43, 44]. The high DENV-3 replication
1848 rate in these cells suggests that the replication machinery is not impaired and that the lower
1849 replication observed in iHeps could be linked to repression by innate immunity. Finally, the high
1850 replication of another DENV-3 strain in iHeps highlights the complexity of viral replication and

1851 suggests a strain-specific mechanism rather than serotype specificity as previously observed with
1852 other cell types [45-49].

1853 Observation of higher YFV-17D and YFV17D/DENV-3 chimera replication than DENV-3 has previously
1854 been reported by Brandler et al. [50]. Injection of YFV17D/DENV-3 in combination with other
1855 chimeras in human and non-human primates is well tolerated without any sign of liver toxicity. This
1856 demonstrates that high viral replication in hepatocytes is not a sign of virulence, and *vice versa* that
1857 low replication is not a marker of attenuation. This result was also previously observed for YFV and
1858 17D in HepG2 [51].

1859 In conclusion, our study demonstrates that the differences in liver involvement in the pathogenesis
1860 of dengue and yellow fever could be, in part, attributed to a restricted propagation of DENV.
1861 Differences in virus entry and in innate immune response may have an impact on viral spread as
1862 suggested for DENV-3. It may be of interest to compare *in vitro* DENV immune responses in
1863 hepatocytes with those of YFV to better understand DENV liver pathogenesis.

1864 **Abbreviations**

1865 AFP, α -fetoprotein; ALB, albumin; AXL, AXL receptor tyrosine kinase; CCID₅₀, 50% cell culture
1866 infectious doses; CLDN1, Claudin-1; CYP450, cytochrome P450; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole;
1867 DENV, dengue virus; E, envelope protein; Geq, genome equivalent; HBV, hepatitis B virus; HGM,
1868 hepatocyte growth medium; hiPS, human induced pluripotent stem cells; HNF4 α , hepatocyte nuclear
1869 factor 4 α ; iHeps, hepatocytes derived from human pluripotent stem cells; KRT, cytokeratin; LAMR1,
1870 Laminin receptor 1; RNA, ribonucleic acid; mRNA, messenger ribonucleic acid; MOI, multiplicity of
1871 infection; n.s., not statistically significant; NS, nonstructural; NTCP, sodium taurocholate co-
1872 transporting polypeptide; PBS, phosphate buffered saline; PHHs, primary human hepatocyte; prM,
1873 precursor membrane protein; qRT-PCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction;
1874 RPMI, Roswell Park Memorial Institute; YFV, yellow fever virus

1875 **Acknowledgements**

1876 We would like to thank Virology Unit of Evotec Infectious Disease (Lyon, France) for the kind gift of
1877 primary human hepatocytes and Aymeric De Montfort for helpful biostatic advices. This study was
1878 financial supported by Sanofi Pasteur and CIFRE agreement.

References

1. Chambers, T.J., et al., *Flavivirus genome organization, expression, and replication*. Annu Rev Microbiol, 1990. **44**: p. 649-88.
2. Guzman, M.G. and E. Harris, *Dengue*. Lancet, 2015. **385**(9966): p. 453-65.
3. Martina, B.E., P. Koraka, and A.D. Osterhaus, *Dengue virus pathogenesis: an integrated view*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(4): p. 564-81.
4. de Macedo, F.C., et al., *Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry*. Diagn Mol Pathol, 2006. **15**(4): p. 223-8.
5. Povia, T.F., et al., *The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e83386.
6. Monath, T.P. and A.D. Barrett, *Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever*. Adv Virus Res, 2003. **60**: p. 343-95.
7. Morra, M.E., et al., *Definitions for warning signs and signs of severe dengue according to the WHO 2009 classification: Systematic review of literature*. Rev Med Virol, 2018. **28**(4): p. e1979.
8. Thepparit, C., et al., *Internalization and propagation of the dengue virus in human hepatoma (HepG2) cells*. Intervirology, 2004. **47**(2): p. 78-86.
9. Lin, Y.L., et al., *Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus*. J Med Virol, 2000. **60**(4): p. 425-31.
10. Donato, M.T., et al., *Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies*. Curr Drug Metab, 2008. **9**(1): p. 1-11.
11. Bartenschlager, R. and T. Pietschmann, *Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(28): p. 9739-40.
12. Gordillo, M., T. Evans, and V. Gouon-Evans, *Orchestrating liver development*. Development, 2015. **142**(12): p. 2094-108.
13. Hengstler, J.G., et al., *Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2005. **1**(1): p. 61-74.
14. Gao, X. and Y. Liu, *A transcriptomic study suggesting human iPSC-derived hepatocytes potentially offer a better in vitro model of hepatotoxicity than most hepatoma cell lines*. Cell Biol Toxicol, 2017. **33**(4): p. 407-421.
15. Cheng, L., et al., *Induced pluripotent stem cells (iPSCs) in the modeling of hepatitis C virus infection*. Curr Stem Cell Res Ther, 2015. **10**(3): p. 216-9.
16. Shlomai, A., et al., *Modeling host interactions with hepatitis B virus using primary and induced pluripotent stem cell-derived hepatocellular systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(33): p. 12193-8.
17. Lang, J., et al., *Modeling Dengue Virus-Hepatic Cell Interactions Using Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocyte-like Cells*. Stem Cell Reports, 2016. **7**(3): p. 341-354.
18. Guy, B., M. Saville, and J. Lang, *Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine*. Hum Vaccin, 2010. **6**(9).
19. Barban, V., et al., *High stability of yellow fever 17D-204 vaccine: a 12-year retrospective analysis of large-scale production*. Vaccine, 2007. **25**(15): p. 2941-50.

20. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
21. Charretier, C., et al., *Robust real-time cell analysis method for determining viral infectious titers during development of a viral vaccine production process*. *J Virol Methods*, 2018. **252**: p. 57-64.
22. Mantel, N., et al., *Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines*. *J Virol Methods*, 2008. **151**(1): p. 40-6.
23. Che, P., H. Tang, and Q. Li, *The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry*. *Virology*, 2013. **446**(1-2): p. 303-13.
24. Meertens, L., et al., *The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry*. *Cell Host Microbe*, 2012. **12**(4): p. 544-57.
25. Thepparit, C. and D.R. Smith, *Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor*. *J Virol*, 2004. **78**(22): p. 12647-56.
26. Zhang, Y., et al., *Structures of immature flavivirus particles*. *EMBO J*, 2003. **22**(11): p. 2604-13.
27. Rosen, L., M.M. Khin, and T. U, *Recovery of virus from the liver of children with fatal dengue: reflections on the pathogenesis of the disease and its possible analogy with that of yellow fever*. *Res Virol*, 1989. **140**(4): p. 351-60.
28. Marianneau, P., et al., *Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line*. *J Infect Dis*, 1998. **178**(5): p. 1270-8.
29. Germi, R., et al., *Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus*. *Virology*, 2002. **292**(1): p. 162-8.
30. Jemielity, S., et al., *TIM-family proteins promote infection of multiple enveloped viruses through virion-associated phosphatidylserine*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(3): p. e1003232.
31. Hilgard, P. and R. Stockert, *Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes*. *Hepatology*, 2000. **32**(5): p. 1069-77.
32. Cabrera-Hernandez, A., et al., *Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70*. *J Med Virol*, 2007. **79**(4): p. 386-92.
33. Hanna, S.L., et al., *N-linked glycosylation of west nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity*. *J Virol*, 2005. **79**(21): p. 13262-74.
34. Fontes-Garfias, C.R., et al., *Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein*. *Cell Rep*, 2017. **21**(5): p. 1180-1190.
35. Conceicao, T.M., et al., *Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of innate immune response*. *J Infect*, 2010. **60**(1): p. 65-75.
36. Pattanakitsakul, S.N., et al., *Proteomic analysis of host responses in HepG2 cells during dengue virus infection*. *J Proteome Res*, 2007. **6**(12): p. 4592-600.
37. Suksanpaisan, L., A. Cabrera-Hernandez, and D.R. Smith, *Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2*. *J Med Virol*, 2007. **79**(3): p. 300-7.
38. Jessie, K., et al., *Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization*. *J Infect Dis*, 2004. **189**(8): p. 1411-8.
39. Egger, J.R. and P.G. Coleman, *Age and clinical dengue illness*. *Emerg Infect Dis*, 2007. **13**(6): p. 924-5.
40. Gupta, S., A. Agarwal, and D. Biswas, *Host Genetic Polymorphisms Influencing Susceptibility to Dengue*. *DNA Cell Biol*, 2018. **37**(10): p. 805-807.
41. Barber, G.N., *Host defense, viruses and apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(2): p. 113-26.

42. Lindenbach, B., H.J. Thiel, and C.M. Rice.
43. Desmyter, J., J.L. Melnick, and W.E. Rawls, *Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero)*. J Virol, 1968. **2**(10): p. 955-61.
44. Mosca, J.D. and P.M. Pitha, *Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(6): p. 2279-83.
45. Lin, Y.L., et al., *Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines*. Antiviral Res, 2002. **56**(1): p. 93-6.
46. Marianneau, P., et al., *Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs*. J Gen Virol, 1996. **77** (Pt 10): p. 2547-54.
47. Piccini, L.E., V. Castilla, and E.B. Damonte, *Dengue-3 Virus Entry into Vero Cells: Role of Clathrin-Mediated Endocytosis in the Outcome of Infection*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140824.
48. Bielefeldt-Ohmann, H., et al., *Dengue virus binding to human leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains*. Virus Res, 2001. **73**(1): p. 81-9.
49. Warke, R.V., et al., *Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11822-32.
50. Brandler, S., et al., *Replication of chimeric yellow fever virus-dengue serotype 1-4 virus vaccine strains in dendritic and hepatic cells*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **72**(1): p. 74-81.
51. Lefeuvre, A., et al., *Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection*. Microbes Infect, 2006. **8**(6): p. 1530-8.

Supplementary data

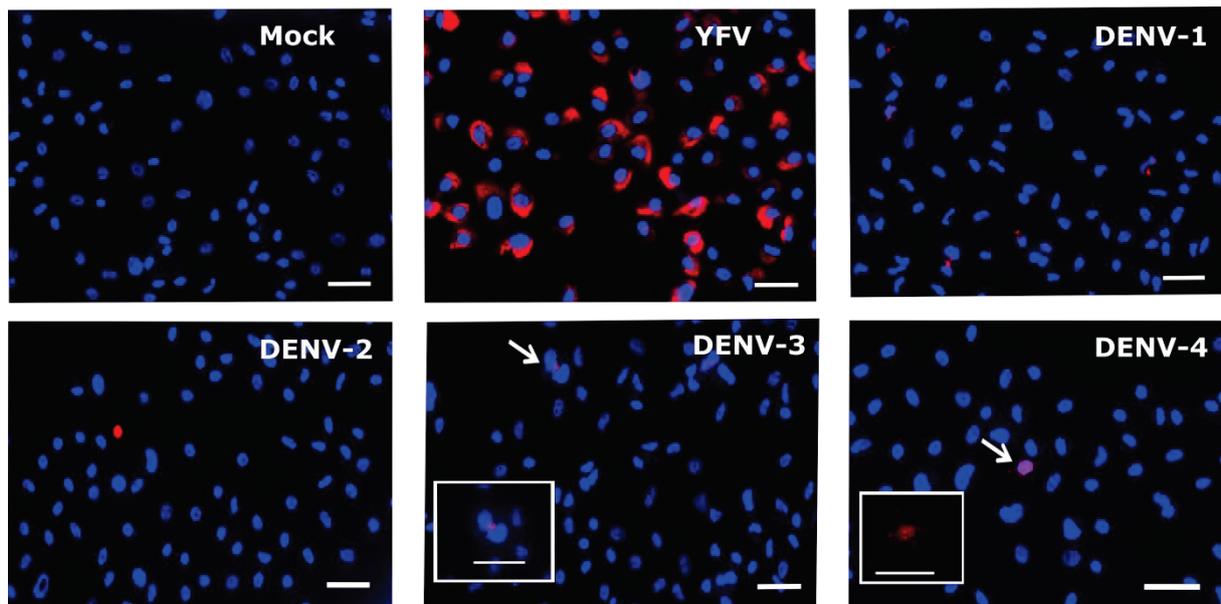
Table S1. Mix of primers and probes used for qRT-PCR.

Target gene	Symbol	Reference
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs02786624-g1
Glucuronidase Beta	GUSB	Hs00939627-m1
TATA binding protein	TBP	Hs00427620-m1
Albumin	ALB	Hs00609411-m1
Sodium taurocholate co-transporting polypeptide	NTCP	Hs00161820-m1
Alpha-fetoprotein	AFP	Hs00173490-m1
Cytochrome P450 3A4	CYP3A4	Hs00604506-m1
Laminin receptor 1	LAMR1	Hs00347791-s1
AXL receptor tyrosine kinase	AXL	Hs01064444-m1
Claudin-1	CLDN1	Hs00221623-m1

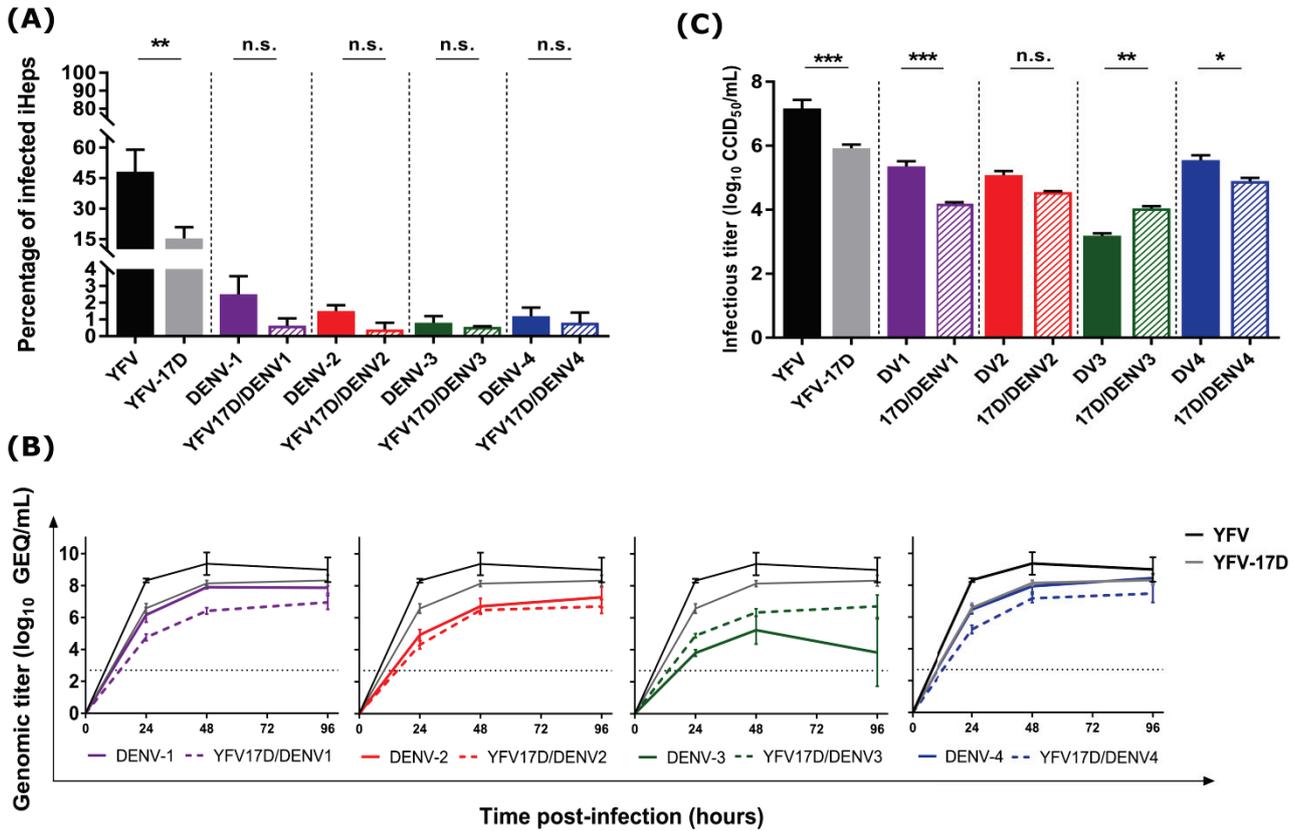
Table S2. Antibodies used for immunofluorescence assays.

Target protein	Reference	Supplier
KRT18	ab133272	Abcam
ALB	A6684	Sigma-Aldrich
HNF4a	ab92378	Abcam
ds RNA	11010200	Scicons
E - YFV	mab36055	Abcam
E - DENV	5C12-3G9	Biotem

Fig. S1. Infected iHeps revealed by immunofluorescence assays.



iHeps infected at a multiplicity of infection of three were fixed at 48 h post-infection. Cells were stained with an anti-dsRNA antibody added to an anti-E antibody to detect viral antigens and with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Scale bar, 50 μ m.



1879

1880 **Figure 17: Réplication et internalisation de YFV, 17D, DENV et YFV17D/DENV dans**
 1881 **les iHeps.**

1882 (A) Les iHeps sont infectés à une MOI de 3 puis rincés après 2 heures de temps de contact
 1883 virus-cellules. A 48 h post-infection, les iHeps sont fixés. Les cellules sont alors
 1884 marquées avec un anticorps anti-ARNdb additionné d'un anticorps anti-enveloppe
 1885 permettant tous deux de détecter les antigènes viraux. La coloration au DAPI est
 1886 utilisée pour marquer les noyaux. Le pourcentage de cellules infectées est alors estimé
 1887 par le ratio de cellules positives pour la détection d'antigènes versus le nombre de
 1888 noyaux.

1889 (B) Les iHeps sont infectés comme décrits ci-dessus. Les ARN viraux sont extraits des
 1890 surnageants collectés aux temps indiqués et soumis à une RT-qPCR avec des amorces
 1891 spécifiques de NS5 de DENV ou YFV.

1892 (C) Les surnageants de iHeps infectés comme décrits ci-dessus sont collectés à 48 h post-
 1893 infection. Les particules infectieuses sont alors quantifiées par titrage DIC50 sur
 1894 cellules VERO.

1895 Nous avons réalisé 4 expériences indépendantes. Les données sont présentées sous la forme
 1896 de la moyenne des valeurs avec leur déviation standard. Les p-values (p) sont calculées en
 1897 utilisant un test ANOVA-1 : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s. : non significatif. Pour comparer
 1898 les titres génomiques des différents virus, les aires sous courbe ont été au préalable calculées
 1899 pour chacun des virus.

1900 **3. Points clés de la partie 1**

1901

1902 Une différence de réplication entre les 4 sérotypes de DENV a été observée: DENV-4 se
1903 répliquant le plus fortement et DENV-3 le plus faiblement. La comparaison des cinétiques de
1904 réplication des virus DENV-3, 17D et 17D/DENV3 a permis de mettre en évidence que les
1905 protéines non structurales et structurales sont impliquées dans la faible réplication de DENV-
1906 3. Finalement, l'utilisation d'une autre souche DENV-3 a permis de conclure que la
1907 réplication est propre à chacune des souches plutôt qu'à un sérotype.

1908 D'autre part, cette étude a permis de mettre en évidence que les titres génomiques et
1909 infectieux de YFV sur iHeps sont plus élevés que l'ensemble des 4 sérotypes de DENV. De
1910 plus, contrairement à YFV, la propagation des 4 sérotypes de DENV est faible aussi bien dans
1911 les iHeps que dans les hépatocytes primaires. Cette observation est faite sur la base de
1912 l'évaluation du pourcentage de cellules infectées par technique d'immunofluorescence.

1913

1914

1915 **4. Résultats – discussion partie 2 : Evaluation de l'impact des** 1916 **protéines non structurales et structurales dans l'infection** 1917 **de DENV sur iHeps.**

1918

1919 Les iHeps sont infectés avec YFV, DENV 1-4, YFV-17D, 17D/DENV1-4 à une MOI de 3. Le
1920 pourcentage de cellules infectées, les courbes de réplication et le titre infectieux de YFV et de
1921 DENV1-4 présentés dans cette section sont les mêmes que ceux de l'article. L'intérêt de la
1922 figure 17 réside dans la comparaison des infections de YFV-17D, DENV et 17D/DENV afin
1923 d'évaluer l'impact des protéines structurales et non structurales dans l'infection de DENV sur
1924 iHeps.

1925 Pour toutes les souches 17D/DENV, le pourcentage de iHeps infectés est similaire à celui des
1926 DENV (environ 1%) et différent de celui observé pour YFV-17D (Fig. 1A). Ceci démontre
1927 que le pourcentage de cellules infectées est le reflet du rôle de l'enveloppe et/ou de la
1928 membrane dans l'infection de DENV. La faible propagation de DENV est donc très
1929 certainement liée à un problème d'entrée des 4 sérotypes de DENV dans les iHeps.

1930

1931 Les titres génomiques et infectieux sont quantifiés dans les surnageants de iHeps infectés
1932 (Fig. 1B et 1C respectivement). Les titres de 17D/DENV2 et DENV-2 sont similaires
1933 (comparaison multiple, p-value > 0.88) suggérant que pour ce sérotype, le phénotype
1934 d'infection est grandement influencée par les protéines d'enveloppe et de membrane.

1935 A l'inverse, 17D/DENV3 et 17D/DENV1 ont des titres différents de leurs souches parentales
1936 DENV respective (comparaison multiple, p-value <0.001) suggérant un impact des protéines
1937 non structurales sur la réplication observée pour DENV-1 et DENV-3. Pour 17D/DENV4
1938 aussi le titre infectieux est différent de celui de sa souche parentale suggérant un rôle des
1939 protéines non structurales. On remarque que leur titre génomique semble aussi différent mais
1940 cet écart n'est pas significatif (p-value > 0.06).

1941

1942 5. Conclusion étude I

1943

1944 Nous avons démontré dans cette étude que la propagation de YFV dans les iHeps est plus
1945 efficace par rapport aux 4 sérotypes de DENV. L'utilisation des souches chimériques
1946 17D/DENV démontre que la faible efficacité de propagation de DENV dans les hépatocytes
1947 est liée aux protéines prM et E de DENV et donc certainement liée à une faible efficacité
1948 d'entrée du virus dans ces cellules. Dans la littérature, de nombreux co-récepteurs ont été mis
1949 en évidence pour DENV alors qu'aucun n'a été décrit pour YFV sauvage (43–45).
1950 L'expression différentielle de récepteurs d'entrée spécifiques de chacun des deux virus et/ou
1951 une affinité différente pour de mêmes co-récepteurs pourraient expliquer la différence
1952 d'entrée entre DENV et YFV. Afin d'éliminer un biais lié au modèle cellulaire, nous avons
1953 également démontré que la propagation de DENV est plus faible que YFV dans des
1954 hépatocytes primaires. Enfin, comme Ananthanarayanan A. *et al.* le remarquent pour HCV, il
1955 est également possible que la différence de propagation soit liée à un biais des méthodes de
1956 cultures des hépatocytes et que les co-récepteurs d'entrée utilisés par DENV ne soient pas
1957 exprimés à la surface de l'hépatocyte ou bien exprimés sur un pôle de la cellule inaccessible
1958 au virus (332). Les systèmes de culture 3D étant décrits comme plus représentatifs des
1959 conditions *in vivo* notamment en termes de polarisation, nous allons dans l'étude II évaluer
1960 l'infection de DENV et YFV dans des iHeps cultivés en 3D.

1961

1962 D'autres explications à la faible propagation de DENV pourrait également s'ajouter au
1963 problème d'entrée comme :

- 1964 - L'induction précoce de la mort des hépatocytes suite à l'infection de DENV tandis que
1965 dans le cas de YFV, elle pourrait être plus tardive.
- 1966 - La réponse immunitaire innée mise en place inhibe rapidement la propagation de
1967 DENV alors que la réponse immunitaire innée contre YFV est mise en place de façon
1968 plus tardive et/ou ce virus est capable de contourner plus efficacement la réponse
1969 immunitaire innée.

1970 **Etude II : Evaluation de l'infection des virus dengue et fièvre**
1971 **jaune dans un modèle d'hépatocytes dérivés de cellules souches**
1972 **humaines cultivés en trois dimensions**
1973

1974 **1. Introduction**
1975

1976 Ces dernières années, les modèles de culture cellulaire en trois dimensions (3D) ont
1977 montré une amélioration des modèles *in vitro* quand ils sont comparés aux cultures 2D
1978 conventionnelles. Les modèles 3D d'hépatocytes présentent une augmentation des fonctions
1979 hépatiques, une augmentation de la viabilité cellulaire ainsi qu'un rétablissement de la polarité
1980 cellulaire (309,333,334). De plus, dans le cas de sphéroïdes d'hépatocytes dérivés de cellules
1981 souches pluripotentes (iHeps), la maturation des sphéroïdes hépatiques est favorisée par
1982 rapport aux cultures 2D (335).

1983 Le choix de la taille des sphéroïdes, variant en fonction du nombre de cellules qu'il
1984 contient, est une étape importante pour les études. Si le tissu formé est trop petit, il peut
1985 manquer de relevance physiologique en ne mimant pas la complexité de l'architecture de
1986 l'organe. A l'inverse si le tissu est trop gros, la diffusion de l'oxygène est plus difficile
1987 conduisant à la nécrose des cellules au centre du sphéroïde. Afin de contraindre la
1988 morphologie des tissus, des matrices extracellulaires synthétiques ou naturelles peuvent
1989 parfois être utilisées formant un maillage dont la taille des pores varie en fonction de la
1990 composition (336). Même s'il est décrit que les sphéroïdes hépatiques présentent une
1991 augmentation de la sensibilité aux substances hépatotoxiques par rapport aux cultures
1992 conventionnelles, la taille des sphéroïdes peut avoir un impact sur la vitesse de dégradation
1993 des drogues (308).

1994 Outre une application pour les études de toxicité, les sphéroïdes hépatiques ont aussi été
1995 évalués pour leur capacité à mimer des infections virales (332,337,338). De façon
1996 intéressante, l'étude Ananthanarayanan A. *et al.* démontre une localisation des co-récepteurs
1997 d'entrée d'HCV différente entre hépatocytes cultivés en 3D et en 2D, celle des sphéroïdes
1998 étant plus proche de celle observée *in vivo*. Cette polarisation des sphéroïdes hépatiques
1999 favorise l'infection d'HCV (337).

2000 Dans notre étude I, contrairement à l'infection de YFV, nous avons observé une faible
2001 internalisation et propagation des 4 sérotypes de DENV dans des iHeps cultivés en 2D. Afin
2002 d'évaluer si dans un modèle plus physiologique, l'internalisation de DENV peut être
2003 favorisée, nous avons comparé dans cette étude l'infection de DENV et YFV dans un modèle
2004 d'iHeps cultivés en 3D. Nous avons, au préalable, caractérisé la stabilité et le niveau
2005 d'expression de gènes hépatiques dans des iHeps 3D de différentes tailles ainsi que leur
2006 capacité à maintenir l'infection du virus 17D.

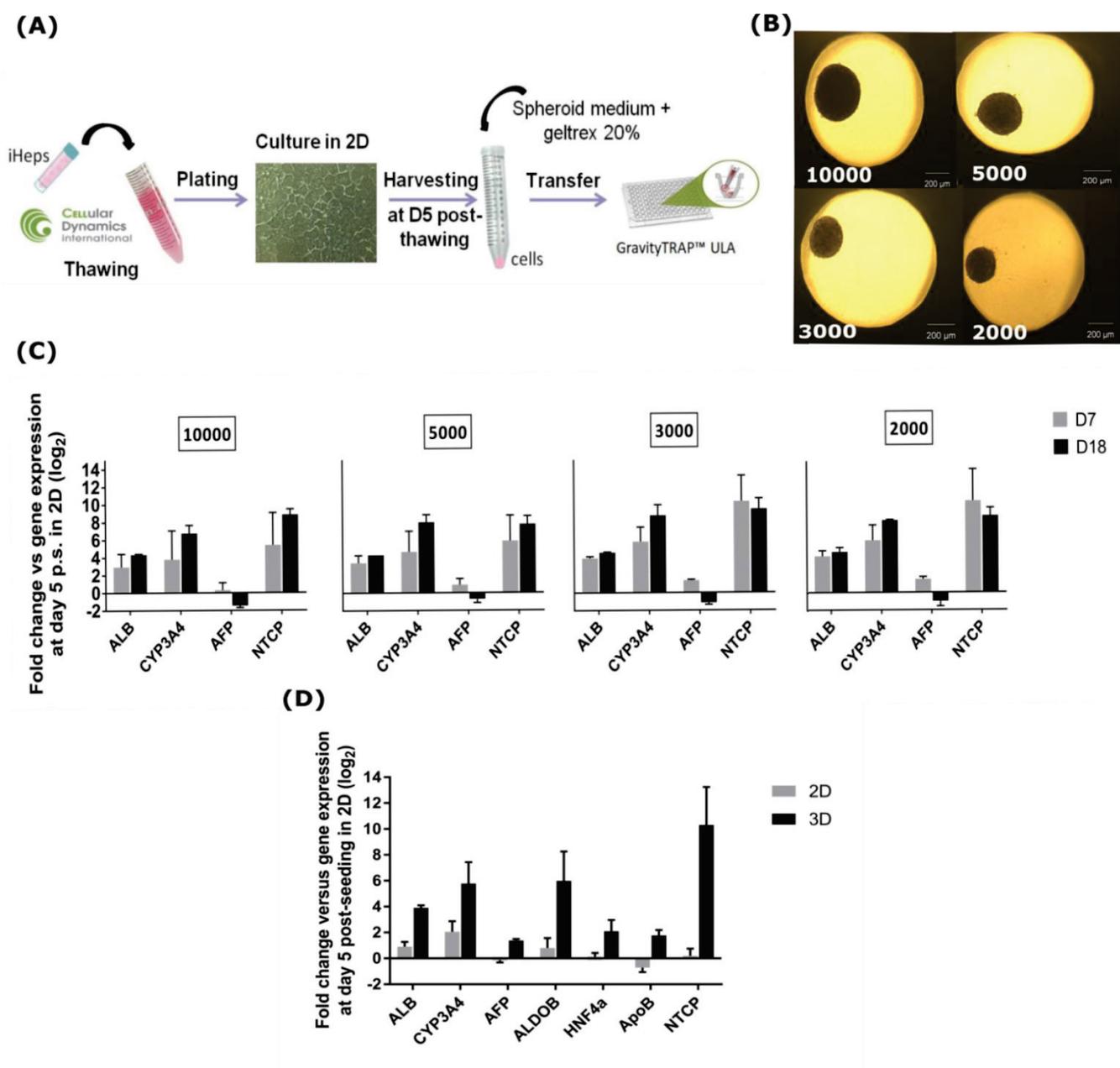


Figure 18 : Evaluation de la maturation de sphéroïdes hépatiques de différentes tailles (2000- 10000 cellules) (A) Protocole de formation des sphéroïdes hépatiques. (B) Sphéroïdes de différentes tailles obtenus après 2 jours d'incubation. (C) Les ARN totaux des sphéroïdes hépatiques sont extraits 7 et 18 jours après décongélation (a.p.) ainsi que ceux des iHeps 2D au jour 5 a.p. Une RT-qPCR est ensuite réalisée afin de quantifier l'expression des gènes : albumine (ALB), cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), alfa-foetoprotéine (AFP), transporteur d'acides biliaires dépendant du sodium (NTCP) (D) Les ARN totaux des sphéroïdes de 3000 cellules et des iHeps 2D sont extraits au jour 7 a.d. et soumis à un qRT-PCR ciblant les mêmes gènes que ci-dessus ainsi que ceux de l'aldolase B (ALDOB), de l'apolipoprotéine B (ApoB) et du facteur nucléaire hépatocytaire 4 alpha (HNF4a). (C)(D) La normalisation est effectuée sur la moyenne d'expression de 3 gènes de ménage (GAPDH, GUSB, TBP) et les valeurs des iHeps 2D au jour 5 sont utilisées comme référence pour calculer les fold-changes.

Sont représentées, la moyenne et la déviation standard de deux expériences indépendantes.

2007

2. Résultats

2008

2009 **Evaluation de la maturation de sphéroïdes hépatiques de différentes tailles (2000- 10000** 2010 **cellules)**

2011 Après 5 jours de culture en 2D, les iHeps sont décollés et mélangés à un milieu de culture
2012 contenant 10% de GeltrexTM final. Ce mélange est ensuite transféré dans des plaques à faible
2013 adhérence (Fig. 18A). Des suspensions de différentes concentrations cellulaires sont préparées de
2014 façon à obtenir des sphéroïdes hépatiques contenant un nombre différent de cellules. Ici des
2015 sphéroïdes de 2 000, 3 000, 5 000 et 10 000 cellules sont préparés. Deux jours après leur
2016 ensemencement dans les plaques à faible adhérences, des sphéroïdes hépatiques au contour bien
2017 définies sont observés (Fig. 18B). Leur taille varie en fonction du nombre de cellules qui les
2018 constitue. Les sphéroïdes de 10 000 et 2 000 cellules mesurent respectivement 400 et 200 µm, la
2019 taille des sphéroïdes de 5 000 et 3 000 cellules se situant entre ces deux valeurs.

2020

2021 L'expression de gènes spécifiques du foie, à savoir de l'albumine (ALB), du cytochrome P450
2022 3A4 (CYP3A4) et du transporteur d'acides biliaires dépendant du sodium (NTCP), est quantifiée
2023 au jour 7 et 18 post-décongélation soit 2 et 13 jours après la formation des sphéroïdes. On
2024 quantifie aussi l'expression du gène alfa-foetoprotéine (AFP) qui code pour une glycoprotéine
2025 produite par les hépatocytes immatures (Fig. 18C). De manière générale, on ne note pas de
2026 différence de profil d'expression entre les différentes tailles de sphéroïdes aussi bien au jour 7
2027 qu'au jour 18 post-décongélation. Les niveaux d'expression des différents marqueurs hépatiques
2028 sont proches entre les différentes tailles de sphéroïdes. Dès le deuxième jour de leur formation,
2029 l'expression des gènes est plus élevée que celle des iHeps 2D au jour 5 (J5). A l'exception de
2030 celle de AFP, l'expression des marqueurs à J18 a tendance à être plus élevée que celle à J7 mais
2031 ces différences ne semblent pas significatives. Toutefois, l'expression au J18 semble moins
2032 variable que celle observée à J7. On observe une diminution de l'expression de AFP. L'ensemble
2033 de ces données suggère que le phénotype de maturation des iHeps est maintenu jusqu'au moins
2034 18 jours après la décongélation, voire même qu'une légère maturation a pu avoir lieu entre J7 et
2035 J18.

2036

2037 Afin d'évaluer l'impact de la culture 3D sur la maturation des iHeps, l'expression de plusieurs
2038 marqueurs hépatiques est comparée entre des iHeps cultivés en 2D et en 3D, 7 jours après la
2039 décongélation des cellules (Fig. 18D). Il apparaît clairement que l'expression de l'ensemble des
2040 marqueurs est plus élevée dans les hépatocytes cultivés en 3D qu'en 2D suggérant une
2041 maturation plus rapide des cellules sous forme de sphéroïdes.

2042

2043 **Evaluation de l'infection de sphéroïdes hépatiques de différentes tailles par la souche** 2044 **vaccinale 17D.**

2045 La permissivité des sphéroïdes de différentes tailles au virus 17D est évaluée.

2046 La réplication virale est mesurée par quantification de l'ARN viral dans les surnageants
2047 d'infection (Fig. 19A) et dans les cellules (Fig. 19B) par qRT-PCR.

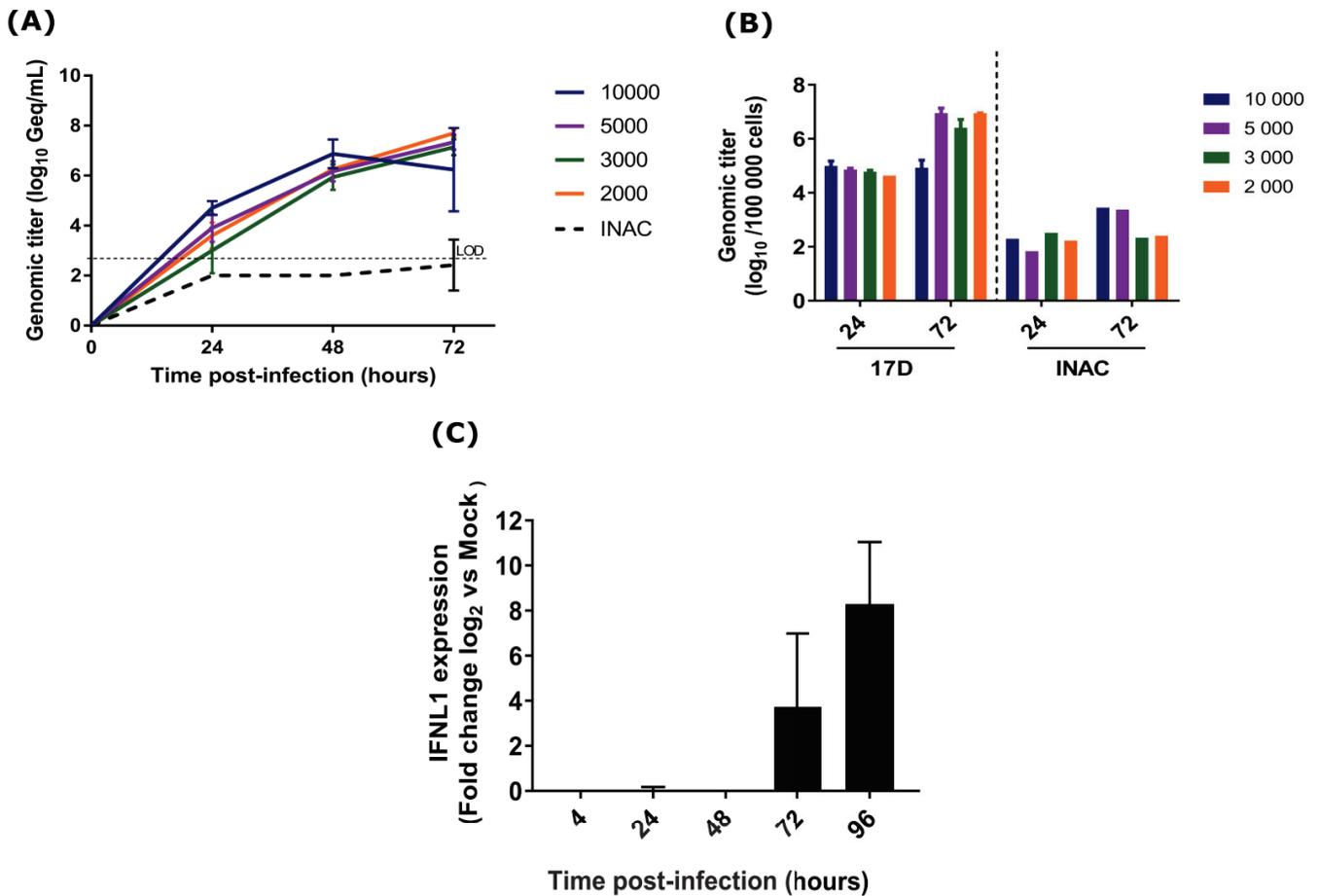


Figure 19 : Infection de sphéroïdes hépatiques de différentes tailles par la souche vaccinale 17D . Les sphéroïdes de différentes tailles (2000 à 10000 cellules) sont infectés par le virus 17D et le virus 17D inactivé aux UV (INAC) à une MOI de 3 puis rincées 4 heures après leur infection. Après extraction (A) des ARN viraux des surnageants collectés aux temps post-infection indiqués (B) et des ARN totaux cellulaires, les ARN sont soumis à une qRT-PCR dirigée contre la NS5 de YFV. Le titre génomique du virus INAC observé sur surnageant correspond au titre moyen observé sur les sphères de différentes tailles. (C) Après extraction des ARN totaux de sphéroïdes de 3000 cellules infectées par 17D, une qRT-PCR est réalisée afin de quantifier l'expression de l'interféron de type III (IFN-L1). L'expression est normalisée à celle du gène de ménage GUSB et le fold-change calculé par rapport à l'expression de IFNL1 dans les sphères non infectées (Mock).

Les données représentent la moyenne et la déviation standard de deux expériences indépendantes.

2048 Que ce soit en intra- ou en extracellulaire, le titre génomique de l'infection 17D est supérieur
2049 à celui du virus 17D inactivé aux UV. L'inactivation aux UV permet aux virus d'entrer dans
2050 les cellules mais pas de s'y répliquer. Ces données suggèrent que quelle que soit la taille, les
2051 sphéroïdes hépatiques sont permissifs à l'infection du virus 17D. De plus, le titre génomique
2052 extra- et intracellulaire augmente de façon constante et similaire entre 24 et 72 heures post-
2053 infection pour les sphéroïdes de 2000 à 5 000 cellules. Ce n'est pas le cas pour les sphéroïdes
2054 de 10 000 cellules où le titre entre 24 et 72 h.p.i n'est pas différent. La taille des sphères
2055 semble donc pouvoir influencer l'infection.

2056 Afin de valider l'internalisation du virus 17D dans les sphéroïdes, l'expression de l'interféron
2057 de type III (IFN-L1) est quantifiée dans les sphéroïdes de 3 000 cellules (Fig. 19C)
2058 L'induction de l'expression de cette cytokine fait suite à l'activation d'une cascade de
2059 signalisation résultant de la reconnaissance de motifs viraux par les PRRs, récepteurs clés de
2060 l'immunité innée. Dans le cas des flavivirus, les PRRs décrits sont des PRRs intracellulaires
2061 (RLRs, TLRs endosomaux). L'expression de IFN-L1 est induite à partir de 72 heures post-
2062 infection validant une détection et donc une internalisation du virus dans les sphéroïdes.

2063 **Evaluation de l'infection des iHeps 3D de 3000 cellules par YFV, DENV et les chimères** 2064 **17D/DENV**

2065 Après avoir évalué la permissivité au virus 17D, les sphéroïdes sont infectés par le virus YFV
2066 sauvage, les souches chimériques 17D/DENV-2 et 17D/DENV-4 et leur souche DENV
2067 parentale respective. L'inoculum d'infection n'est pas retiré de façon à éliminer un biais
2068 potentiel de temps d'internalisation différents entre les virus. De façon similaire à l'infection
2069 de 17D, le titre génomique de chacune des infections est déterminé dans le surnageant de
2070 culture (Fig. 20A). Contrairement aux titres génomiques de DENV et YFV/DENV, le titre
2071 génomique de YFV observé à 96 heures post-infection est supérieur à celui observé à 4 heures
2072 avec une augmentation d'environ 1 log₁₀ GEQ/mL. Ceci suggère une réplication de YFV dans
2073 les sphéroïdes hépatiques. La diminution du titre de DENV et 17D/DENV varie entre -0,2
2074 log₁₀ GEQ/mL à -2 log₁₀ GEQ/mL suggérant une absence de réplication et une stabilité
2075 différentes des virus dans le milieu de culture.

2076 Afin de confirmer l'absence de réplication de DENV, l'expression de l'interféron de type III
2077 (IFN-L1) est quantifiée (Fig. 20B). Dans le cas de YFV, l'expression de IFN-L1 est induite
2078 dès 24 heures post-infection suggérant une détection du virus par le système immunitaire et
2079 donc une internalisation du virus. A l'inverse, l'expression de IFN-L1 n'est pas différente de
2080 0 dans le cas d'une infection par DENV ou 17D/DENV, renforçant l'idée d'un problème
2081 d'internalisation des virus dans les cellules.

2082 Dans le but d'évaluer si ce problème d'internalisation peut-être lié à l'interaction des virus
2083 avec des composants de la matrice extracellulaire utilisée lors de la formation de sphéroïdes,
2084 des sphéroïdes de 3 000 cellules sont formés en absence de matrice (Fig. 20C). Leur
2085 morphologie est comparable à celle des sphères avec matrice et le temps de formation du
2086 sphéroïde est le même. Les iHeps 3D sont alors infectés avec DENV-4 et DENV-2 à une MOI
2087 de 3. Aussi bien pour l'infection par DENV-4 que celle par DENV-2, le titre génomique avec
2088 ou sans geltrex est similaire suggérant que la présence de geltrex n'explique pas l'absence

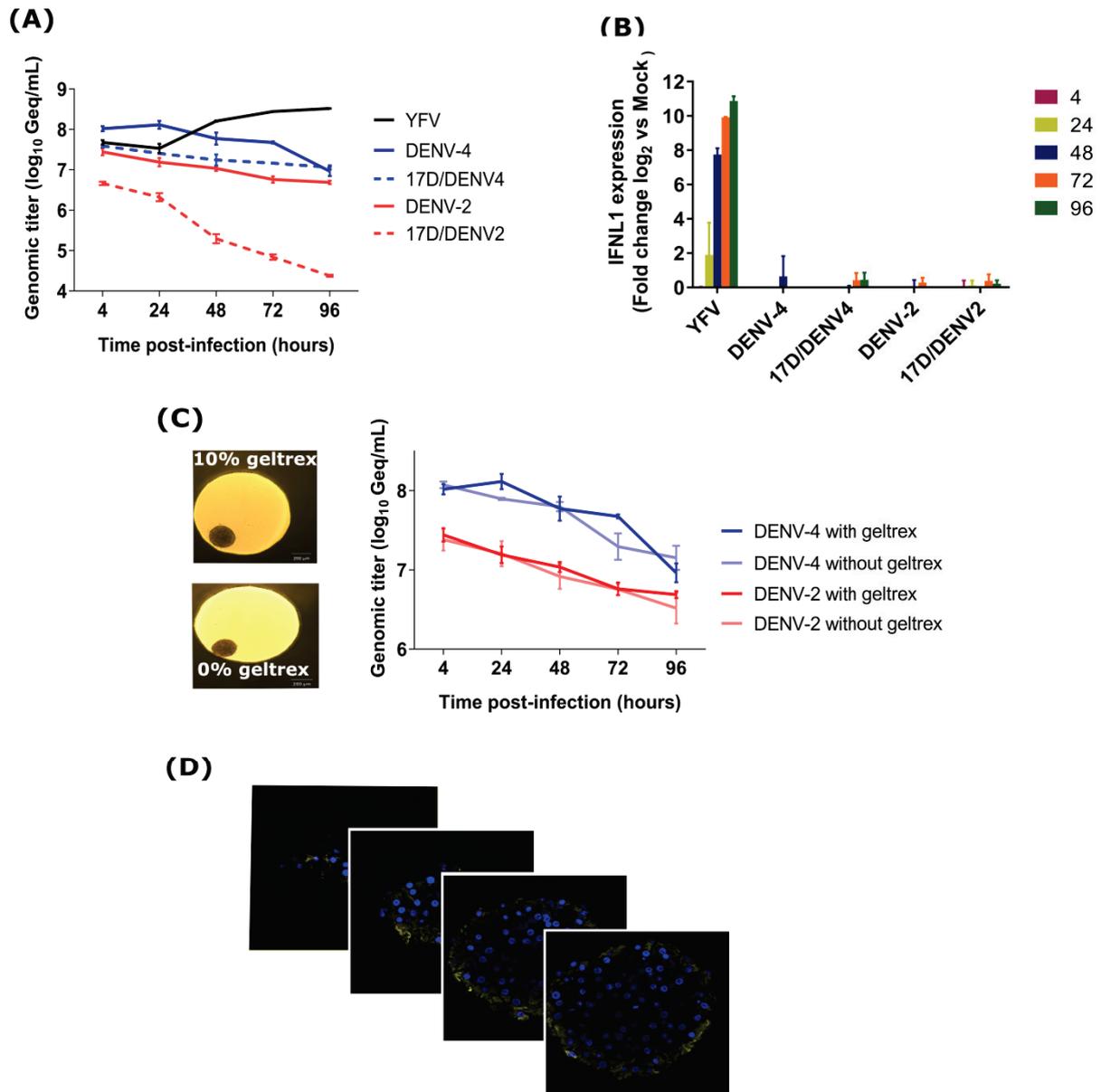


Figure 20: Evaluation de l'infection de sphéroïdes de iHeps de 3000 cellules par YFV, DENV et les chimères 17D/DENV. (A) (B) Des sphères de 3000 cellules sont infectées à une MOI de 3. Aucun rinçage n'est effectué laissant l'inoculum en contact avec les sphères tout au long de la cinétique. (A) Après extraction des ARN viraux des surnageants, une qRT-PCR est réalisée avec des amorces spécifiques du gène NS5 de YFV ou DENV. (B) Les ARN cellulaires sont extraits et soumis à une qRT-PCR ciblant l'interféron de type III (IFN-L1). L'expression est normalisée à celle du gène de ménage GUSB et le fold-change calculé par rapport à l'expression dans des sphères non infectées (Mock). (C) Infection de sphéroïdes de 3000 cellules contenant ou non 10% de Geltrex™. L'infection et le titrage sont réalisés de la même façon que ci-dessus. (D) Images confocales en z-stack d'un sphéroïde hépatique de 3000 cellules marqué avec un anticorps anti-cytokératine-18, ciblant le cytosquelette des hépatocytes (jaune), et du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) marquant le noyau des cellules.

Les données représentent la moyenne et la déviation standard de deux expériences indépendantes.

2089 d'internalisation de DENV.

2090 Afin de s'assurer que les cellules à l'intérieur des sphéroïdes ne soient pas nécrosées et sont
2091 accessibles au virus, un marquage du cytosquelette KRT18 et des noyaux est réalisé (Fig.
2092 20D) puis les sphéroïdes visualisés au microscope confocal. Les noyaux sont répartis de façon
2093 homogène sur chacune des images de sphéroïde et leur contour est net, non dégénéré ne
2094 suggérant pas la présence d'une nécrose cellulaire au centre du sphéroïde. De façon
2095 surprenante, seule le cytosquelette des cellules en périphérie du sphéroïdes est marqué laissant
2096 suggérer soit une incapacité des anticorps à pénétrer dans le sphéroïde soit que les cellules au
2097 centre n'ont plus le phénotype d'hépatocytes. Néanmoins le fait qu'une exposition prolongée
2098 à des concentrations élevée de Triton X100 (50%) n'altère pas la morphologie des sphéroïdes
2099 (données non montrées), suggèrent plutôt une structure compacte des sphéroïdes.

2100 3. Discussion

2101 De par leur facilitation d'utilisation et le besoin en matériel limité, la formation des sphéroïdes
2102 par l'utilisation de plaques à faible attachement est une méthode souvent employée. Ici, cette
2103 technique a été utilisée pour former des sphéroïdes de iHeps de différentes tailles (2000 à
2104 10000 cellules). Comme observé dans l'étude de Subramanian K *et al.*, nous démontrons ici
2105 que la culture 3D favorise la maturation des iHeps visible par une augmentation plus
2106 importante de l'expression des gènes spécifiques du foie (335). De plus, ce phénotype de
2107 maturation est stable au moins 2 semaines. La stabilité du métabolisme cellulaire sous forme
2108 de sphéroïde est une des caractéristiques et avantages de ces méthodes de culture permettant
2109 d'utiliser les cellules sur des périodes plus longues qu'avec les systèmes 2D conventionnels
2110 (309,333,334).

2111 Dans cette expérience, nous n'observons pas de différence d'expression des marqueurs
2112 hépatiques entre les différentes tailles de sphéroïdes. Cependant, il apparaît que les sphéroïdes
2113 de 10 000 cellules (400 μm) parviennent plus difficilement à maintenir l'infection du virus
2114 17D. Il est généralement préférable de ne pas maintenir une taille d'agrégat au-delà de 250
2115 μm afin de prévenir l'hypoxie (336). La variabilité d'infection de 17D observée pour les
2116 sphéroïdes de 10 000 cellules est peut-être liée à l'utilisation de sphéroïdes aux cellules
2117 nécrotiques.

2118 Les sphéroïdes de 3000 cellules sont permissifs à l'infection par les souches YFV sauvage et
2119 atténuée (17D). La réplication du virus est détectable dans le surnageant des sphéroïdes
2120 infectés et l'infection conduit à l'induction des réponses immunitaires innées. Dans une étude
2121 précédemment menée au laboratoire (Sanofi Pasteur), l'évaluation de l'infection des souches
2122 YFV et 17D avait été réalisée sur sphéroïde d'hépatocytes primaires (PHHs) co-cultivés avec
2123 des cellules de Kupffer et des cellules endothéliales mettant en évidence d'une part la
2124 permissivité de ce modèle aux virus et d'autre part une dynamique de réponse immunitaire
2125 différente entre 17D et YFV. L'interféron de type III détecté ici avait été aussi trouvé induit
2126 dans ce modèle (311).

2127 Contrairement à YFV, aucun signe d'infection n'a pu être détecté pour les souches
2128 17D/DENV et leur homologue parental DENV. Cette absence d'infection ne semble pas liée à
2129 la mise en place d'une réponse immunitaire intense puisque la réponse interféron n'est pas
2130 détectée dans les 96 premières heures suivant l'infection. De plus, le fait que les souches
2131 chimériques et DENV du même sérotype partagent la même enveloppe suggère plutôt un
2132 problème d'internalisation des virus qu'un problème de réplication ou d'excrétion.

2133 Les flavivirus sont capables d'interagir avec des composants de la matrice extracellulaire
2134 comme les glycosaminoglycans ou les héparanes sulfates (44,45). Décrits comme co-
2135 récepteurs d'entrée, certains analogues des héparanes sulfates, comme l'héparine, ont été
2136 démontrés comme pouvant inhiber l'infection de DENV dans des lignées cellulaires
2137 hépatiques (339). La matrice extracellulaire ajoutée lors de la formation des sphéroïdes
2138 contenant de l'héparine, nous avons donc supposé que DENV et 17D/DENV pouvaient
2139 interagir fortement avec ce composant limitant alors l'entrée du virus dans les cellules.
2140 Cependant, nous avons démontré ici que cette hypothèse peut être réfutée puisque la cinétique
2141 d'infection de DENV-2 et DENV-4 est la même avec des sphéroïdes formés avec ou sans
2142 matrice.

2143 Finalement, il apparaît que l'explication de l'absence d'infection peut être reliée à
2144 l'organisation structurale des sphéroïdes. En effet, alors que la diffusion du DAPI est possible
2145 au centre du sphéroïde, l'anticorps anti-KRT18 marque seulement les hépatocytes en
2146 périphérie. La taille moyenne d'un anticorps étant de 15 nm, il paraît difficile d'envisager
2147 qu'une particule virale de 50-60 nm puisse alors pénétrer au sein du sphéroïde. Bien que
2148 l'étude de Bell *et al.* montre que les PHHs cultivés en 3D pourraient être utilisés pour des
2149 études toxicologiques, elle montre aussi que l'infection des sphéroïdes par un adénovirus
2150 recombinant n'est possible qu'avant l'agrégation des cellules et non après suggérant aussi
2151 que la compaction des sphéroïdes empêche la pénétration du virus (309). De plus, dans le cas
2152 de HBV, l'infection de PHH 3D est favorisée dans un système microfluidique plutôt que dans
2153 un modèle statique (312). Le fait de créer un mouvement dans la culture favorise peut-être la
2154 diffusion du virus au sein de microvascularisation de la sphère.

2155 Dans notre étude, le parallèle est à faire avec le pourcentage d'infection visualisé en 2D dans
2156 l'étude I. Il était de 50%, 25% et 1% pour YFV, 17D et DENV respectivement. Ainsi, si
2157 seules les cellules en périphérie d'un sphéroïde sont accessibles au virus et que le pourcentage
2158 d'infection est le même que celui observé en 2D, notre capacité à détecter la réplication de
2159 DENV dans ce modèle d'iHeps 3D est limitée alors que plus probable dans le cas de YFV et
2160 17D.

2161 En conclusion, contrairement à ce qui avait été observé pour HCV (337), l'infection de
2162 DENV n'est pas favorisée dans ce modèle d'iHeps 3D. Nous avons donc pour la suite de notre
2163 étude utilisé les iHeps cultivés en 2D afin d'évaluer les réponses cellulaires induites suite aux
2164 infections de DENV et YFV.

2165 **Etude III : Etude des réponses cellulaires induites suite aux**
2166 **infections de DENV et de YFV dans un modèle d'hépatocytes dérivés de**
2167 **cellules souches pluripotentes**
2168

2169 **1. Objectifs**

2170 A notre connaissance aucune étude *in vitro* ou *in vivo* n'a à ce jour comparé les profils
2171 transcriptomiques de DENV et YFV. De plus, seule une étude réalisée au laboratoire de
2172 Sanofi Pasteur a révélé le transcriptome de YFV et YFV-17D sur modèle d'hépatocytes
2173 primaires cultivés en trois dimensions (311). La comparaison des deux profils
2174 transcriptomiques avait permis de mettre en évidence une dynamique de réponse différente
2175 entre ces deux virus : notamment la mise en place d'une réponse immunitaire innée plus
2176 précoce dans le cas de YFV-17D que dans le cas de YFV. Dans le cas de la DENV, deux
2177 études de RNAseq ont été menées sur des hépatocytes cultivés *in vitro*. L'une d'elles a été
2178 effectuée sur modèle d'hépatocytes dérivés de cellules souches mettant en évidence une
2179 induction de la réponse interféron, de la voie NFkB et une dérégulation de certains gènes
2180 hépatiques suite à l'infection de DENV-2 (313). Une autre étude RNAseq a été menée sur
2181 lignée hépatique Huh7 dans le but d'observer les variations post-transcriptionnelles de l'ARN
2182 suite à l'infection des souches DENV-1 sauvage et atténuée (326).

2183 Notre objectif ici est de comparer les profils transcriptomiques des 4 sérotypes de DENV et
2184 YFV dans le modèle iHeps aux temps 24, 48 et 96 heures post-infection à une MOI de 3. De
2185 plus, afin de mieux comprendre l'infection de DENV, les profils transcriptomiques de DENV
2186 seront comparés à ceux de YFV-17D et 17D/DENV. Pour rappel, les souches 17D/DENV
2187 possèdent les protéines non structurales et de la capsid de la souche YFV-17D et les
2188 protéines d'enveloppe et de membrane du sérotype de DENV homologue. Ainsi, selon notre
2189 hypothèse, les réponses cellulaires communes entre DENV et 17D/DENV et différentes de
2190 YFV-17D pourront être liées aux protéines de membrane et d'enveloppe de DENV. Et à
2191 l'inverse, les réponses cellulaires induites par DENV qui sont différentes de celles induites
2192 par 17D/DENV et 17D pourront être attribuées aux protéines non structurales de DENV.

2193 Les différences de pourcentage de cellules infectées entre YFV sauvage, YFV-17D et les
2194 souches DENV et 17D/DENV que nous avons observés dans l'étude I sont à garder en tête
2195 pour la suite des analyses : les réponses observées de DENV seront le reflet que d'un
2196 pourcentage de iHeps infectés de 1% tandis que celle de YFV seront le reflet de près de 50%
2197 de cellules infectées.

2198 L'expression de chaque condition a été comparée à la condition non infectée au même temps
2199 puis les listes de gènes dérégulés (DEGs) ainsi obtenus ont été filtrées sur un fold-change
2200 supérieur à 2 et une p-value ajustée inférieure à 0.05.

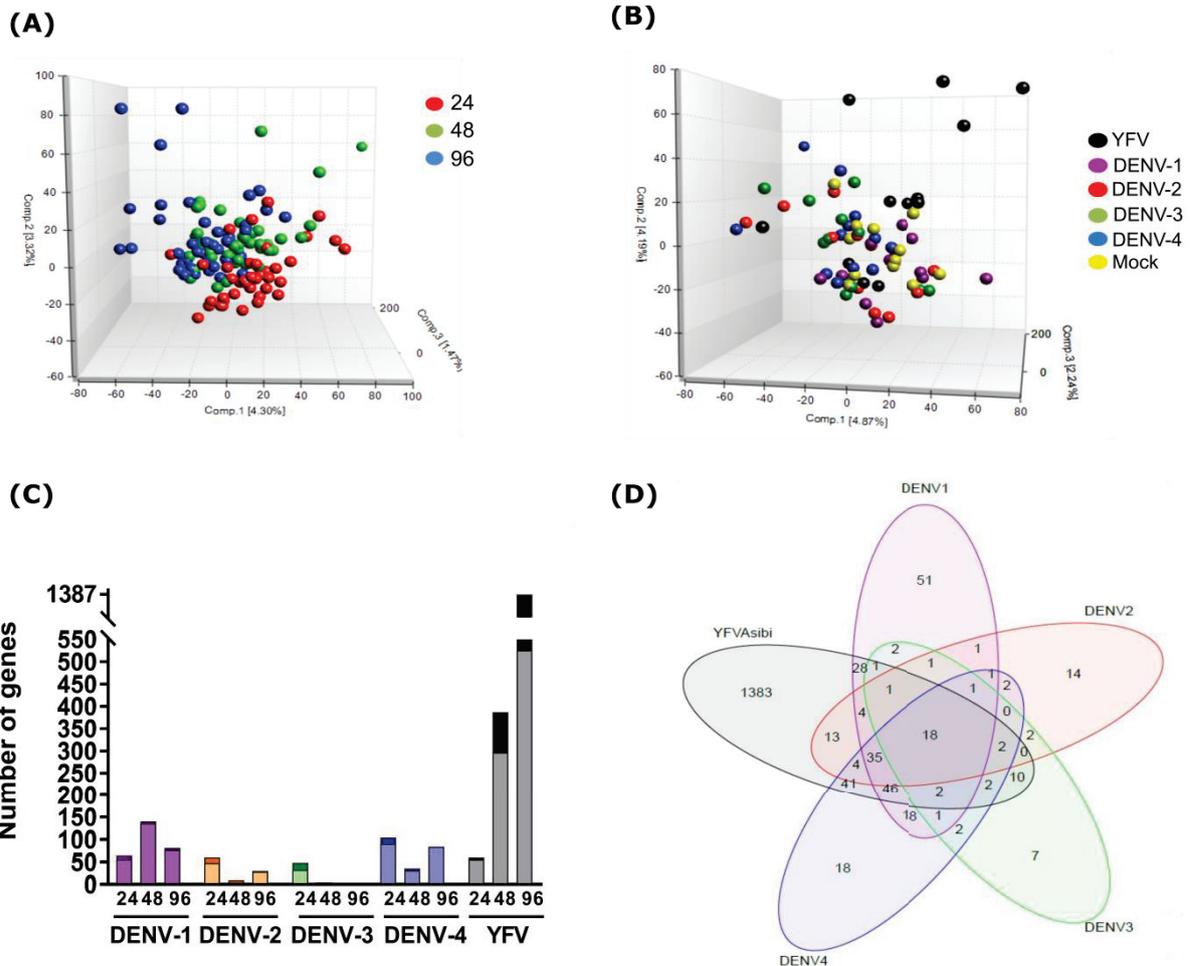


Figure 21: Analyse globale des profils transcriptomiques.

Les analyses des composantes principales démontrent un regroupement des échantillons par temps (A) plutôt que par virus (B). (C) Nombre de transcrits différentiellement exprimés (DEGs). Les couleurs claires représentent le nombre de DEGs dont l'expression est augmentée et les couleurs foncées, le nombre de DEGs dont l'expression est diminuée. A l'exception de l'infection par YFV à 96hpi, la majorité des conditions ont leur DEGs augmentée. (D) Diagramme de Venn représentant le nombre de transcrits différentiellement exprimés communs entre les iHeps infectés par YFV, DENV1 - 4. Afin de soustraire l'effet temps, les listes de DEGs des trois temps ont été réunies pour chacun des virus.

Les listes de DEGs sont obtenues en comparant la condition infectée à la condition non infectée au même temps. De plus, un filtre avec une p-value ajustée < 0.05 et un fold-change supérieur à 2 et inférieur à -2 a été appliqué.

2. Résultats et Discussion

2201

2202

2203 **Analyse globale des profils transcriptomiques induit par DENV et YFV**

2204 Le séquençage des 132 échantillons en utilisant l'équipement Illumina-NextSeq500 a généré
2205 entre 27 et 210 millions de séquences par échantillon. En moyenne 86 % des séquences ont
2206 été alignées avec le génome humain de référence. L'analyse des principales composantes sur
2207 l'ensemble des échantillons révèle un regroupement des échantillons par temps (Fig. 21A)
2208 plutôt qu'un regroupement par virus (Fig. 21B) suggérant que l'effet cinétique a une forte
2209 influence sur l'expression des gènes.

2210 A l'exception de la condition DENV-3 96h, un certain nombre de gènes différentiellement
2211 exprimés est observé pour chacune des conditions (Fig. 21C). Dans le cas des infections par
2212 DENV, le nombre de DEGs varie entre 4 DEGs pour la condition DENV-3 48h et 140 pour la
2213 condition DENV-1 48h. Alors que son nombre de DEGs à 24h est proche de celui des DENV,
2214 le nombre de DEGs dans les conditions infectées par YFV est considérablement plus
2215 important à 48 et 96h atteignant 1387 DEGs pour la condition YFV 96h. Ainsi le nombre de
2216 DEGs est fortement associé au niveau de répllication des virus : YFV qui se réplique le plus a
2217 le plus grand nombre de DEGs cumulés, suivi de DENV-1 et DENV-4 qui ont une répllication
2218 similaire et ont aussi un nombre de DEGs cumulé proches, puis DENV-2 et enfin DENV-3
2219 dont la répllication est la plus basse. L'association entre répllication virale et nombre de DEGs
2220 a déjà été observée dans le cas d'infection d'autres virus comme Influenza ou HCV(340,341).
2221 Cependant, le pourcentage de cellules infectées a certainement lui aussi une influence sur le
2222 nombre de DEGs détectés puisque le nombre de DEGs de YFV est 4 à 10 fois plus élevé que
2223 celui des conditions de DENV.

2224 Majoritairement, dans toutes les conditions, la plupart des transcrits différentiellement
2225 exprimés présentent une expression augmentée, seule la condition YFV 96h compte plus de
2226 DEGs réprimés (861 DEGs réprimés vs 526 surexprimés).

2227 De façon à éliminer l'effet temps et ne regarder que l'impact de chaque virus sur la réponse
2228 cellulaire, les DEGs de chaque point temps sont regroupés pour chacun des virus. Au total, 18
2229 gènes sont communs entre les 4 sérotypes de DENV et YFV (Fig. 21D). Il s'agit de DEGs
2230 impliqués dans la voie de signalisation PXR/RXR et dans la voie de dégradation de la
2231 mélatonine. On note que le plus grand nombre de DEGs communs est celui partagé par les
2232 iHeps infectés par YFV, DENV-4 et DENV-1. On compte 46 DEGs communs entre ces trois
2233 conditions représentant près de 20% des DEGs induits par DENV-1 et DENV-4 et 3% de
2234 ceux induits par YFV. Finalement, lorsque l'on compare les réponses induites par les 4
2235 sérotypes de DENV, un certain nombre de gènes sont spécifiques pour chacun des sérotypes
2236 avec la condition DENV-1 qui possède le plus de DEGs qui lui sont spécifiques.

2237 Les DEGs de chacune des conditions sont réorganisés en clustering hiérarchique (Fig. 22). En
2238 fonction des profils d'expression, 7 classes de transcrits peuvent être faites. De façon

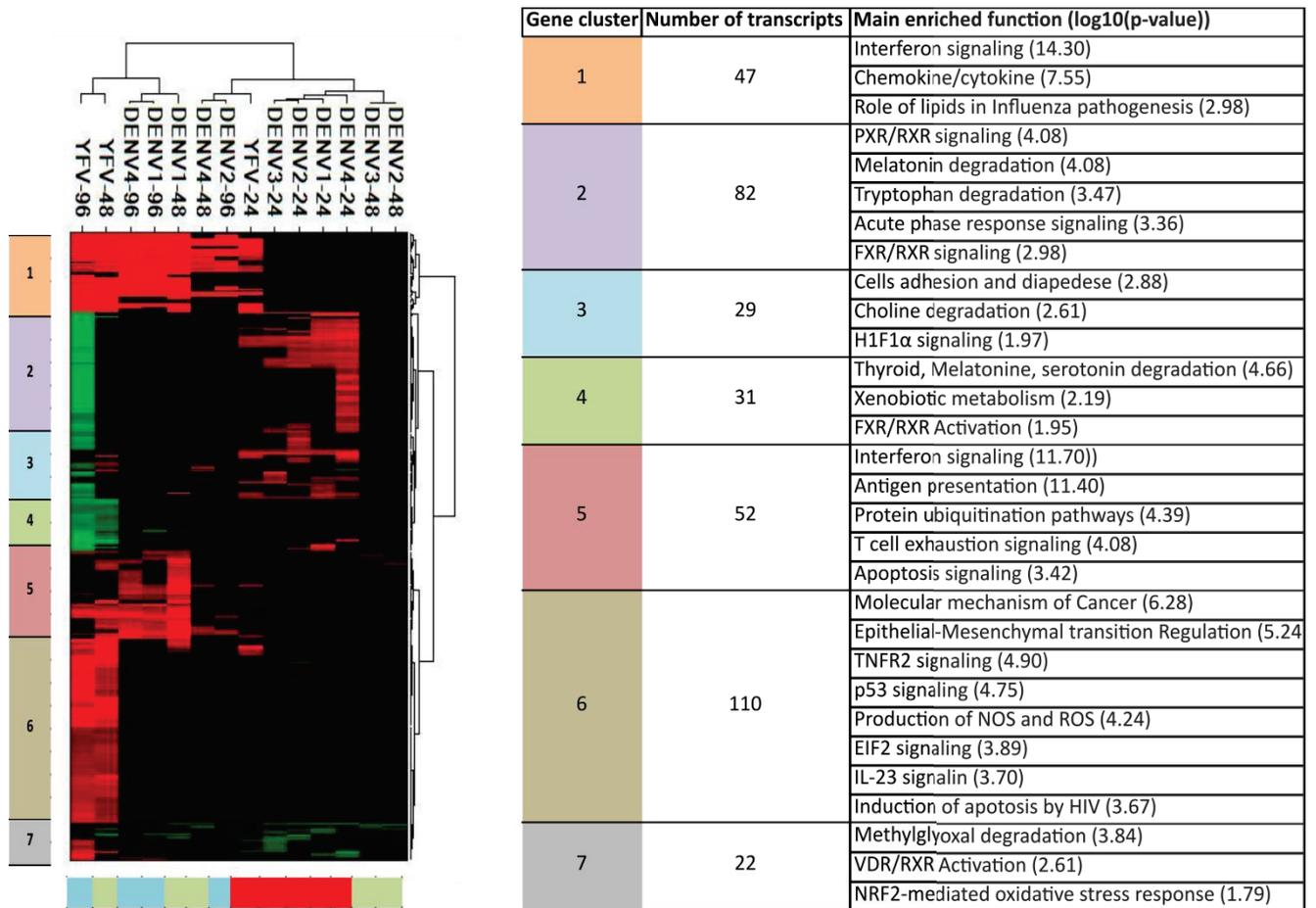


Figure 22 : Organisation sous forme de cluster hiérarchique des profils d'expression des réponses cellulaires induites par l'infection de YFV et DENV1-4. En fonction des profils d'expression, 7 groupes de DEGs ont été définis . Pour chacun des groupes, les principales voies significativement enrichies ont été reportées dans la table à droite (utilisation du logiciel Ingenuity Pathways Analysis). En dessous du cluster hiérarchique, le code couleur représente chacun des points temps : en rouge : 24h, en vert : 48h et en bleu : 96h. On remarque ainsi que les profils transcriptomiques induits à 24h par les différents virus se regroupent suggérant des profils proches.

2239 consistante avec ce que nous avons observé précédemment (Fig. 21A), les profils
2240 transcriptomiques de YFV, DENV1 à 4 se regroupent par temps plutôt que par virus.

2241 Les sérotypes de DENV à 24h ont ainsi un profil d'expression proche. Leurs DEGs se
2242 retrouvent majoritairement au niveau des groupes 2 et 3 impliquant majoritairement des voies
2243 de signalisation du métabolisme mais aussi de l'immunité avec les voies de l'adhésion et de la
2244 diapédèse. Les voies les plus significativement enrichies sont la voie de signalisation
2245 PXR/RXR, la voie de dégradation de la mélatonine et du tryptophane. YFV 24h aussi a un
2246 profil de réponse proche des DENV 24 h mais présente en plus des DEGs au niveau du
2247 groupe 1 impliqués dans la réponse immunitaire innée.

2248 Au temps 48h, les profils transcriptomiques de DENV sont différents selon les
2249 sérotypes. D'un côté, DENV-2 et DENV-3 se regroupent ce qui paraît cohérent au vue de leur
2250 faible nombre de DEGs (9 et 4 respectivement). De l'autre, DENV-1 et DENV-4 ont la quasi-
2251 totalité de leurs DEGs regroupés au niveau des catégories 1 et 5 correspondant à des transcrits
2252 impliqués dans les voies de signalisation des réponses immunitaires tels que la voie de
2253 l'interféron et les voies de signalisation des chimiokines et la présentation d'antigènes.

2254 Au temps 96h, DENV-1 et DENV-4 ont un profil transcriptomique encore plus proche
2255 avec des gènes impliqués dans les mêmes voies de signalisation qu'à 48 hpi. Le profil de
2256 DENV-2 se rapproche alors du celui observé pour DENV-4 48h. N'ayant aucun DEG DENV-
2257 3 n'est donc pas représenté.

2258 YFV-48 et 96 ont des profils de réponse très proches. De manière intéressante, on
2259 retrouve les gènes de l'immunité innée du groupe 1 et les gènes du groupe 5 mais ces derniers
2260 sont moins représentés pour YFV que pour DENV au même temps. De plus, contrairement
2261 aux profils de DENV, de nombreux gènes surexprimés impliqués dans des voies de
2262 signalisation du cancer et de la différenciation cellulaire sont retrouvés. Enfin, un grand
2263 nombre de DEGs, dont l'expression est diminuée, enrichissent les voies de dégradation
2264 d'hormones (thyroïde, mélatonine, sérotonine), de détoxification (métabolisme xénobiotique)
2265 au temps 48 et 96 h et les voies PXR/RXR, réponse de la phase aiguë et celles de l'adhésion
2266 et de la diapédèse à 96 h.

2267 **Evaluation des dérégulations des réponses immunitaires innées induites par DENV et** 2268 **YFV**

2269 La majorité des DEGs induits par DENV enrichissant les voies de l'immunité, nous avons
2270 choisi d'observer plus en détails les gènes de ces voies de signalisation (Fig. 23).

2271 Dans le cas d'une infection virale, l'induction de la voie interféron est la première ligne de
2272 défense mise en place par les cellules infectées. De par l'effet autocrine et paracrine des
2273 interférons, les cellules infectées ainsi que les cellules avoisinantes expriment des gènes
2274 antiviraux appelés ISGs (pour Interferon Stimulated Genes) impliqués par exemple dans la
2275 cascade de signalisation IFN-I et IFN-III amplifiant la production des ISGs.

2276 A l'exception de DENV-3, les autres sérotypes de DENV ainsi que YFV induisent tous une
2277 augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie de l'interféron (Fig. 23A et

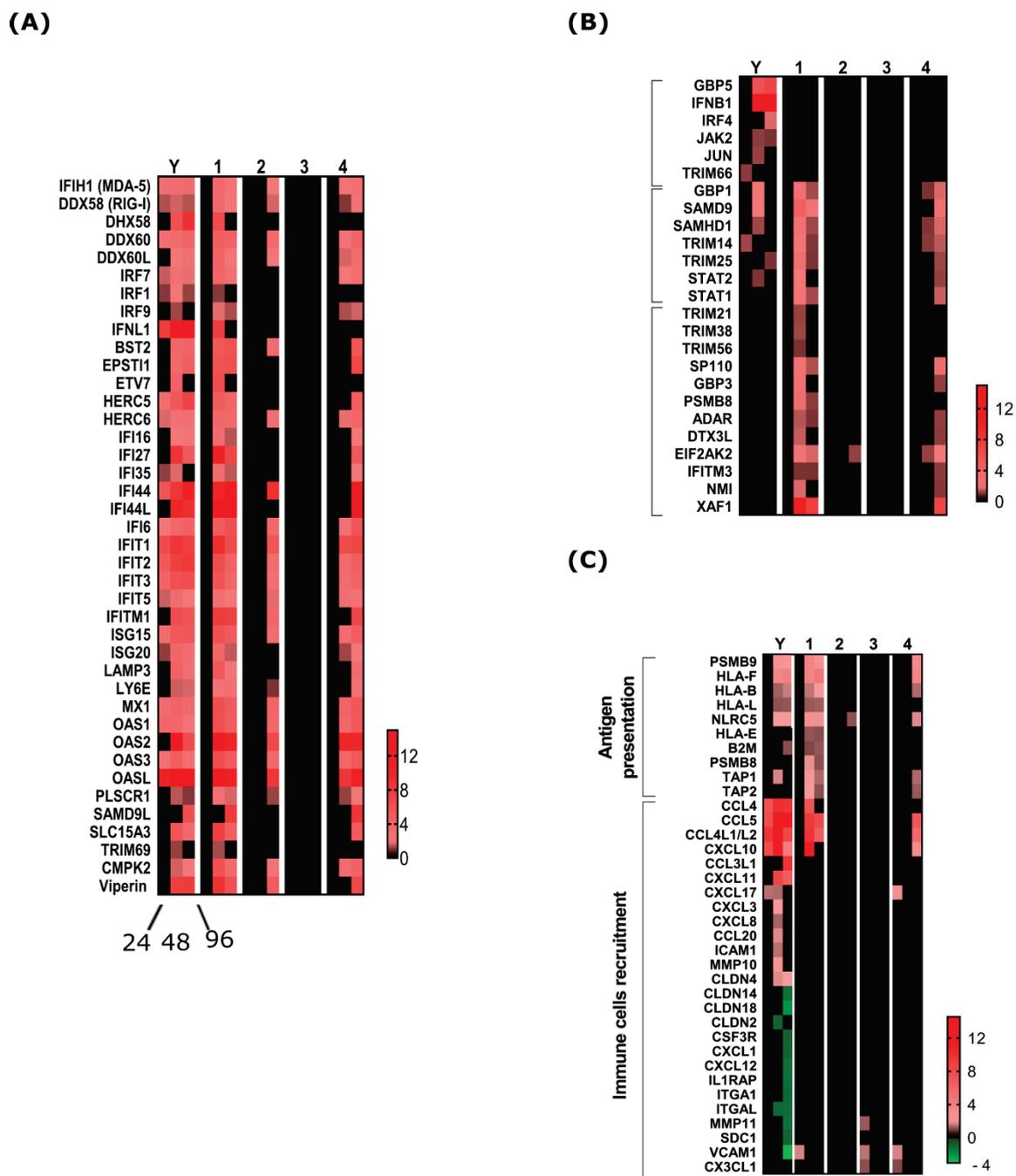


Figure 23 : Dérégulation des réponses immunitaires induites suite aux infections des 4 sérotypes de DENV et de YFV dans les iHeps. Les gènes différentiellement exprimés (DEGs, condition infectée versus non infectée) sont regroupés par voie cellulaire (A) (B) la voie de l'interféron (C) voie de communication intercellulaire. Les échelles à droite de chaque heatmap représentent le code couleur des fold changes en \log_2 . Y : yellow fever ; 1 : DENV-1 ; 2 : DENV-2 ; 3 : DENV-3 ; 4 : DENV-4. Pour chaque virus, chacune des colonnes représente un point temps : dans l'ordre 24, 48 et 96 heures post-infection comme illustré pour YFV dans la heatmap 23A.

2278 23B). Cependant, l'induction de cette voie est détectée avec une temporalité différente selon
2279 les virus. Dans le cas des infections par DENV, des DEGs appartenant à la voie de
2280 l'interféron sont détectés à partir de 48 h pour DENV-1 et DENV-4 et à partir de 96 h pour
2281 DENV-2. Pour l'infection de YFV, la détection est faite dès 24hpi suggérant une induction
2282 plus précoce de la voie interféron par YFV par rapport à DENV.

2283 On note 4 catégories de gènes :

2284 (1) Ceux induits aussi bien par DENV que YFV. Pour ces gènes, les profils d'expression sont
2285 très proches entre les conditions YFV-48, YFV-96, DENV1-48, DENV1-96 et DENV4-96.
2286 On retrouve parmi ces transcrits, les senseurs RIG-I et MDA-5, récepteurs communément
2287 décrits pour la reconnaissance des virus à ARN, suggérant alors un rôle de ces deux senseurs
2288 dans la reconnaissance de DENV et YFV. L'induction de RIG-I et MDA5 suite à l'infection
2289 de DENV a déjà été démontrée *in vitro* dans les lignées hépatiques HepG2 et Huh7
2290 (318,342,343) ainsi que dans d'autres types cellulaires comme les cellules dendritiques (DCs)
2291 (344). L'interaction de l'ARN génomique de DENV avec RIG-I a été démontré *in vitro* (345).
2292 Dans le cas de YFV, le rôle des RLR dans le contrôle du virus n'a pas été encore examiné,
2293 seule une induction de l'expression de RIG-I et MDA-5 dans les PBMCs de sujets vaccinés
2294 par YFV-17D (123) ou une induction *in vitro* de RIG-I dans les DCs plasmacytoïdes (346) ont
2295 été démontrées. Dans l'étude menée au laboratoire, l'induction de l'expression des deux
2296 senseurs par YFV a été montrée (311).

2297 (2) Les gènes uniquement détectés dans le cas d'une infection par YFV comme par exemple
2298 le gène IFN-B. Ce résultat est suprenant puisque IFN-B est communément décrit comme
2299 induit lors des infections virales. Dans le cas de la DENV et YFV, leur infection est létale
2300 dans des souris IFN-I *-/-*. suggérant un rôle clé de cet interféron dans la protection (166,167).
2301 De plus, des études *in vitro* sur cellules HepG2 et hépatocytes dérivés de cellules souches
2302 démontrent que IFN-B est induit par DENV-2 ou DENV3 (313,318,342). Il est possible que
2303 cet interféron soit induit à un point temps que nous n'avons pas étudié (ex autour de 72hpi). Il
2304 est également possible qu'il ne soit pas induit. Une étude suggère que l'induction de IFN-I par
2305 des virus est dépendante du type cellulaire. Bien que étant immunocompétente, l'infection de
2306 virus respiratoires induit uniquement IFN-III dans cellules épithéliales nasales humaines
2307 primaires alors que IFN-B et IFN-III sont induits par ces même virus dans la lignée A549
2308 (347).

2309
2310 (3) Des ISGs uniquement induits par DENV. De façon intéressante, il représente un grand
2311 nombre d'ISGs. On retrouve par exemple XAF1 qui a un fold-change particulièrement élevé
2312 ($10 \log_2$ pour DENV1-48 et $7 \log_2$ pour DENV4-96). XAF1 a déjà été identifié comme induit
2313 *in vitro* par DENV-2 dans les cellules endothéliales jouant un rôle majeur dans l'induction de
2314 l'apoptose de ces cellules, l'expression des gènes caspase 3, 8, 9 et PARP étant corrélée à
2315 celle de XAF1 (348).

2316
2317 (4) Enfin un certain nombre de gènes sont exprimés par DENV et YFV mais avec une
2318 expression transitoirement induite dans le cas de YFV. C'est le cas par exemple de GBP1.
2319 Dans le cas de YFV, l'expression de ce gène a aussi été détectée dans l'expérience menée

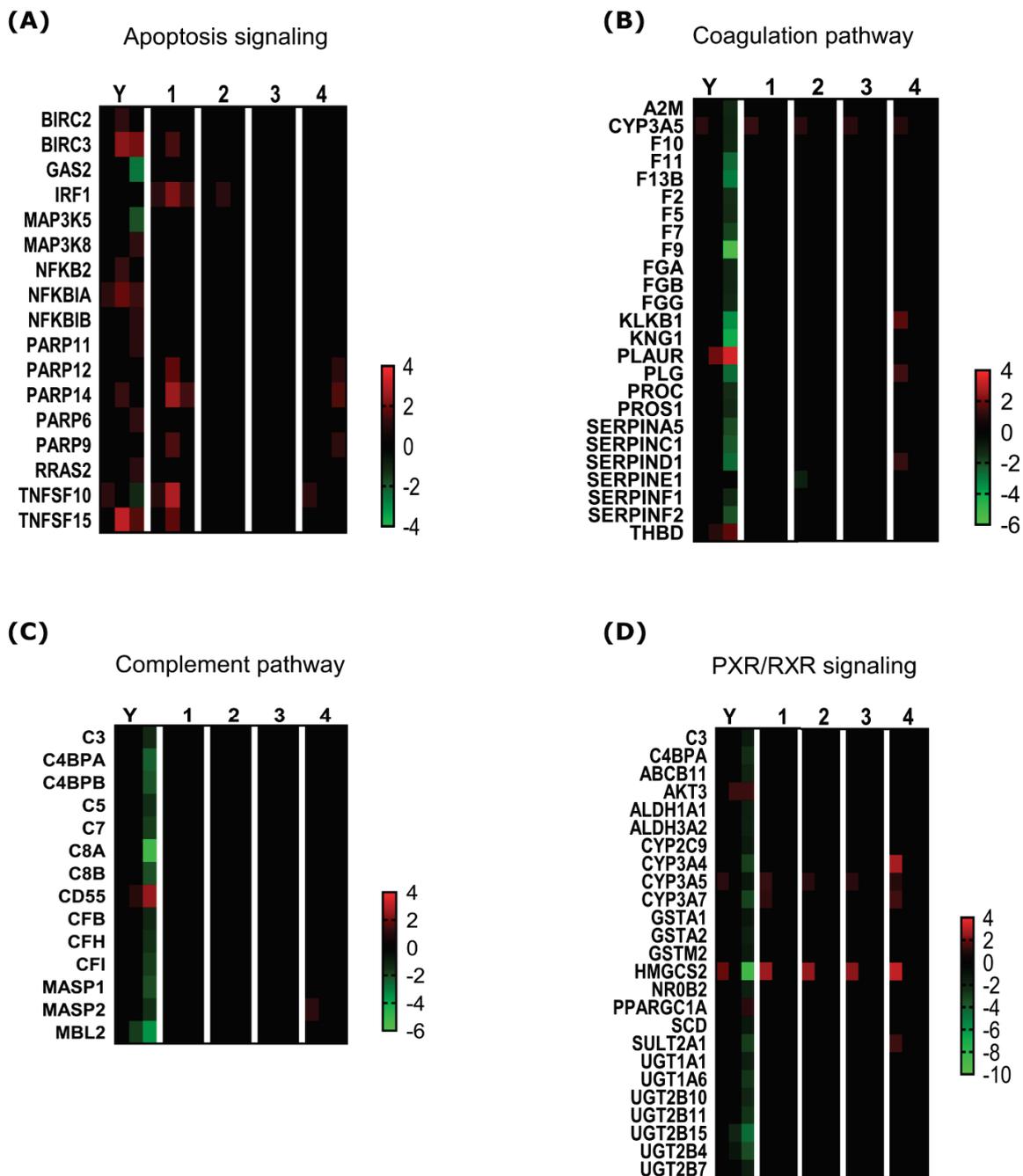


Figure 24 : Profils d'expression de gènes suspectés comme ayant un rôle dans les pathologies de DENV et YFV. Les gènes différentiellement exprimés (DEGs, condition infectée versus non infectée) sont regroupés par voie cellulaire (A) voie de l'apoptose (B) voie de la coagulation (C) voie du complément (D) voie de signalisation PXR/RXR. Les échelles à droite de chaque heatmap représentent le code couleur des fold-changes en \log_2 . Y : yellow fever ; 1 : DENV-1 ; 2 : DENV-2 ; 3 : DENV-3 ; 4 : DENV-4. Pour chaque virus, chacune des colonnes représente un point temps : dans l'ordre 24, 48 et 96 heures post-infection comme illustré pour YFV dans la heatmap de la figure 23 A.

2320 précédemment au laboratoire (349). Dans le cas de DENV, GBP1 est l'un des gènes les plus
2321 fortement induits dans les cellules sanguines des patients au début de l'infection , ce qui est
2322 conforme à des études *in vitro* menée sur lignée de macrophages démontrant le rôle majeur de
2323 cette protéine dans l'inhibition de la réplication du virus (350,351) .

2324

2325 Le fait que certains ISGs soit spécifiquement induits par DENV ou YFV suggère une réponse
2326 immunitaire innée spécifique pour chacun des flavivirus. On note également qu'un plus grand
2327 nombre d'ISGs est induit par DENV et que certains sont exprimés plus durablement dans les
2328 iHeps infectés par DENV-1 que par ceux infectés par YFV. Ceci pourrait suggérer une
2329 réponse interféron plus robuste dans le cas de DENV et un possible détournement de la voie
2330 interféron par YFV. Il est connu que les protéines non structurales sont capables de détourner
2331 l'activité de certaines protéines de cette voie impactant possiblement l'expression des ISGs.

2332

2333 En plus de la voie interféron, certains DEGs sont impliqués dans la communication avec les
2334 cellules immunitaires (Fig. 23C) codant pour certains pour des protéines impliquées dans la
2335 présentation des antigènes. C'est le cas des HLA de classe I qui sont retrouvés induits par
2336 YFV et DENV. Les gènes HLA-E (CMH-Ib non classique), PSMB8 et TAP2 ont leur
2337 expression augmentée seulement dans le cas d'une infection par DENV-1. De nombreux virus
2338 ont développé la capacité de diminuer l'expression du CMH-I des cellules infectées de façon
2339 à échapper aux LTs. Ce n'est pas le cas DENV et WNV qui à l'inverse induisent une
2340 augmentation de l'expression des CMH-I (196,352). Certains auteurs voient ce paradoxe
2341 comme un moyen de favoriser une auto-immunité et donc la destruction de tissu du soi (197).
2342 Une étude sur lignée endothéliale a démontré que la molécule HLA-E n'est pas induite par
2343 l'infection de tous les flavivirus et que seul DENV au contraire de ZIKA pouvait l'induire.
2344 Son rôle sur l'activité des NKs est controversé, certaines études rapportant une possible
2345 inhibition de l'activité des cellules NK (336) et d'autres une incapacité de HLA-E à moduler
2346 leur activité (337)

2347 Enfin, des gènes codant pour des chimiokines comme CCL4, CCL5 et CXCL10 sont
2348 retrouvés très fortement induits suite à l'infection de DENV et YFV et d'autres comme
2349 CXCL17, CXCL8 (ou IL-8) et CXCL3 ne sont induits que par l'infection de YFV. De façon
2350 intéressante, certaines chimiokines comme CXCL1 et des gènes codant pour des protéines
2351 claudines ainsi que VCAM1 sont réprimés à 96hpi.

2352 L'ensemble des données de la figure 4C suggère que des protéines de surface différentes
2353 peuvent être induites par YFV et DENV pouvant entraîner des interactions différentes des
2354 hépatocytes infectés avec les cellules immunitaires. Alors que DENV pourrait favoriser
2355 l'interaction des iHeps avec les cellules immunitaires via l'expression de certaines classes de
2356 HLA, YFV pourrait au contraire potentiellement l'inhiber en diminuant notamment l'expression
2357 de molécules d'adhésion.

2358

2359 **Evaluation des profils d'expression de gènes suspectés comme ayant un rôle dans les**
2360 **pathologies induites par DENV et YFV**

2361

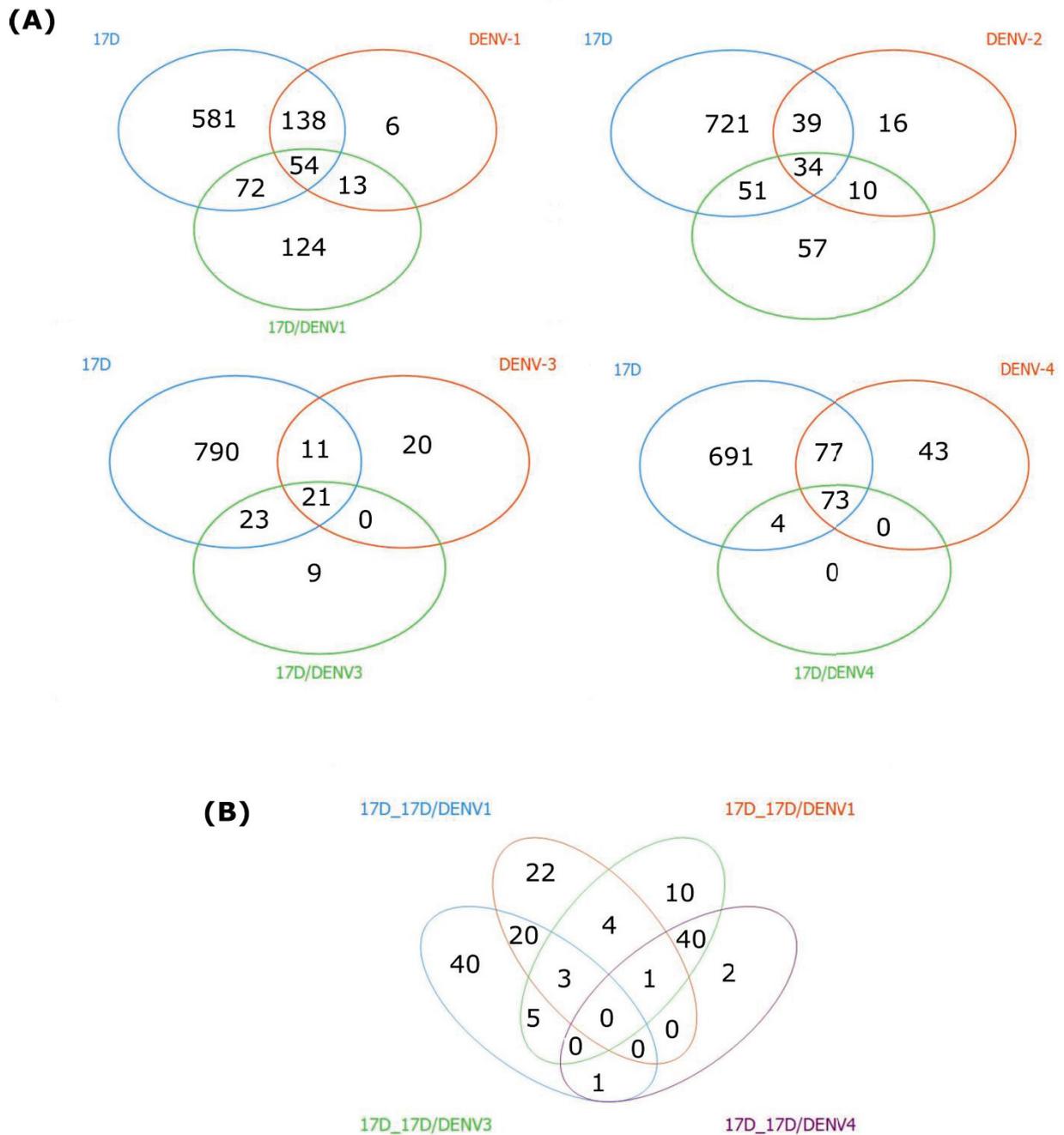


Figure 25 : Comparaison des DEGs induits par 17D/DENV et ceux induits par ses souches parentales (A) Diagrammes de Venn représentant le nombre de transcrits différentiellement exprimés communs entre les iHeps infectés par 17D, 17D/DENV1 à 4 et DENV1 à 4. De façon à se soustraire de l'effet temps, les listes de DEGs des trois temps ont été réunies pour chacun des virus. **(B)** Les listes des transcrits communs entre 17D et chacune des souches 17/DENV sont récupérées puis comparées entre elles sous la forme d'un diagramme de Venn afin de définir si des transcrits sont communs entre ces listes.

2362 *In vivo*, l'infection de YFV et DENV conduisent à la mort d'hépatocytes caractérisée par la
2363 présence de corps de Councilman (88,236,261). Ici un certain nombre de DEGs impliqués
2364 dans la voie de signalisation de l'apoptose sont induits par l'infection de DENV et YFV (Fig.
2365 24A).

2366 Enfin, de manière générale, les gènes impliqués dans les voies de la coagulation, du
2367 complément et de la signalisation PXR/RXR (Fig. 24 B,C,D) sont majoritairement réprimés à
2368 96hpi par l'infection de YFV. C'est le cas par exemple du facteur de coagulation F9 et du
2369 gène du complément C8A. La plupart de ces gènes ne sont pas retrouvés différenciellement
2370 exprimés dans les conditions infectées par DENV.

2371 Le système du complément est une cascade biochimique de plus de 35 protéines qui jouent un
2372 rôle important dans la réponse immunitaire innée contre différents pathogènes à travers leur lyse,
2373 la chimioattraction, l'opsonisation et l'activation des mastocytes. Cependant, les flavivirus
2374 semblent avoir développé des techniques de détournement du système de complément
2375 notamment par le biais de la protéine NS1 (161–163). Dans le cas de DENV, un taux élevé de
2376 certaines protéines du complément a été retrouvé chez les patients atteints de dengue sévère
2377 (164,165). Cependant dans le cas de YFV, aucune donnée n'est reportée dans la littérature
2378 concernant une quantification chez les patients ou un modèle animal. Néanmoins, il est connu
2379 que certains virus hépatotropes comme HCV peuvent conduire à une inhibition de synthèse de
2380 certaines molécules du complément (353,354).

2381 La diminution de synthèse des facteurs de coagulation est quant à elle mieux documentée.
2382 Dans le cas de YFV, une réduction des facteurs de coagulation II, V, VII, IX, et X a été
2383 démontré, pouvant être à l'origine des hémorragies visualisées chez l'homme. Chez les
2384 patients atteints de dengue sévère, la fonction hépatique et la synthèse des facteurs de
2385 coagulation semble relativement bien maintenues, les hémorragies semblant plutôt associées à
2386 une réduction des taux de fibrinogène et des plaquettes (253,254) (88)

2387
2388 Il est important de noter que l'absence d'inhibition des voies de métabolisme par DENV
2389 puisse être liée à notre incapacité à détecter ces dérégulations en raison du faible pourcentage
2390 de cellules infectées. Contrairement à la réponse immunitaire qui est facilement détectable
2391 due à l'effet autocrine et paracrine des interférons, une amplification aussi importante des
2392 réponses par des métabolites n'a pas été reportée.

2393

2394 **Comparaison des DEGs communs entre 17D, DENV et 17D/DENV**

2395 Lorsque l'on compare, pour chacun des sérotypes, les transcrits différenciellement exprimés
2396 suite aux infections par YFV-17D, 17D/DENV et sa souche DENV parentale, un plus grand
2397 nombre de transcrits est partagé entre YFV-17D et 17D/DENV qu'entre 17D/DENV et
2398 DENV (Fig. 25A).

2399 Toutes les protéines non structurales étant identiques entre les différentes souches
2400 chimériques, les DEGs communs entre YFV-17D et chacune des souches 17D/DENV doivent
2401 donc être les mêmes quelle que soit la souche YFV17D/DENV. Or, ceci n'est pas le cas (Fig.
2402 25B). Ceci suggère que le raisonnement de comparer YFV17D/DENV à leurs souches

2403 parentales pour décortiquer le rôle des protéines structurales et non structurales ne peut
2404 s'appliquer aux réponses cellulaires.

2405

2406 **3. Conclusion**

2407

2408 Le nombre cumulé de DEGs induit par chacun des virus semble associé au taux de réplication
2409 des virus. De plus, le taux de réplication semble aussi influencer l'induction de la réponse
2410 interféron. En effet, l'expression de nombreux ISGs est induite précocement par YFV puis par
2411 DENV-1 et DENV-4 suivi de DENV-2. DENV-3 dont le titre génomique est le plus faible
2412 n'induit pas de gènes impliqués dans cette voie de signalisation. Hormis cette dynamique
2413 différente de réponse, la majorité des ISGs induits sont communs entre YFV et DENV.
2414 Néanmoins quelques ISGs sont tout de même spécifiquement induits par chacun des virus et
2415 d'autres avec une durée d'expression différente entre les conditions d'infection.

2416 De manière intéressante, cette analyse préliminaire indique que les infections de YFV et
2417 DENV induisent l'expression de gènes codant pour des protéines de surface différents comme
2418 HLA-E ou TAP-2. Ceci pourrait potentiellement influencer *in vivo* l'interaction des
2419 hépatocytes avec les cellules immunitaires recrutées au site de l'infection. Contrairement à
2420 DENV, YFV aurait tendance à inhiber cette interaction en diminuant l'expression de certaines
2421 chimiokines et molécules d'adhésion. Ce mécanisme est peut-être un mécanisme
2422 d'échappement du virus au système immunitaire.

2423

2424 De plus, à l'inverse de DENV, nous avons détecté un impact fort de YFV sur le métabolisme
2425 notamment sur la voie de la coagulation, celle du complément et celle de la détoxification.
2426 Ces dérégulations métaboliques pourraient potentiellement avoir des conséquences directes
2427 sur la sévérité de la pathologie.

2428 Enfin, nous avons établi que l'expression de certains gènes de l'apoptose étaient induits suite
2429 aux infections des flavivirus. Cependant, afin de déterminer si cette expression est suffisante
2430 pour induire des dommages cellulaires, des tests fonctionnels devraient être réalisés comme
2431 par exemple en utilisant un test de détection du clivage de la caspase 3.

2432

Conclusion et Perspectives

1. Conclusion et Discussion

2433

2434

2435 L'objectif de cette thèse est de comparer les infections de YFV et DENV dans un modèle
2436 d'hépatocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes (iHeps) afin d'identifier les
2437 facteurs qui pourraient expliquer que DENV induit une pathogenèse hépatique moins sévère
2438 que YFV.

2439 Pour cela, deux approches ont été réalisées

2440 (1) La comparaison de la permissivité des cellules aux virus YFV et DENV et de la
2441 production virale par les virus.

2442 (2) La comparaison des réponses cellulaires induites suite aux infections par technique de
2443 RNA-seq.

2444

2445 Le premier facteur identifié dans cette étude est une différence d'infectivité entre
2446 DENV et YFV pour les hépatocytes. Nous avons en effet démontré dans cette étude que la
2447 propagation de YFV dans les iHeps est plus efficace par rapport aux 4 sérotypes de DENV.
2448 L'utilisation des souches chimériques 17D/DENV démontre que la faible efficacité de
2449 propagation de DENV dans les hépatocytes serait liée à une faible efficacité d'entrée du virus
2450 dans ces cellules. Dans la littérature, de nombreux co-récepteurs ont été mis en évidence pour
2451 DENV alors qu'aucun n'a été décrit pour YFV sauvage (43–45). L'expression différentielle
2452 de récepteurs d'entrée spécifiques de chacun des deux virus et/ou une affinité différente pour
2453 de mêmes co-récepteurs pourraient expliquer la différence d'entrée entre DENV et YFV. Afin
2454 d'éliminer un biais lié au modèle cellulaire, nous avons également démontré que la
2455 propagation de DENV est plus faible que YFV dans des hépatocytes primaires. Enfin, comme
2456 Ananthanarayanan A. *et al.* le remarquent pour HCV, il est également possible que la
2457 différence de propagation soit liée à un biais des méthodes de cultures des hépatocytes et que
2458 les co-récepteurs d'entrée utilisés par DENV ne soient pas exprimés à la surface de
2459 l'hépatocyte ou bien exprimés sur un pôle de la cellule inaccessible au virus. Les systèmes de
2460 culture 3D étant décrits comme plus représentatifs des conditions *in vivo* notamment en
2461 termes de polarisation, nous avons évalué l'infection de YFV et DENV dans un modèle
2462 d'iHeps cultivés en 3D. Cependant, la propagation de DENV n'a pas été favorisée par ce
2463 modèle.

2464 L'ensemble de ces données suggère un tropisme hépatique de DENV plus faible que celui de
2465 YFV.

2466

2467 Un autre facteur pouvant expliquer la différence de pathogenèse entre YFV et DENV
2468 pourrait être lié aux réponses cellulaires induites par les deux virus. Nous avons démontré que
2469 le taux de réplication des virus semble associé à l'induction de la réponse interféron. Etant
2470 plus important pour YFV, l'expression de nombreux ISGs est induite plus précocement par
2471 YFV que par DENV. La majorité des ISGs induits par DENV et YFV sont communs.
2472 Néanmoins certains ISGs sont spécifiquement induits par chacune des virus. De manière
2473 intéressante l'infection par DENV génère un plus grand nombre de ISGs spécifiques et pour
2474 certains une expression plus stable. On retrouve dans la littérature de nombreux mécanismes
2475 de détournement des réponses immunitaires mis en place par les flavivirus pouvant suggérer

2476 que dans nos conditions les mécanismes d'évasion de la voie interféron seraient plus efficaces
2477 ou plus nombreux dans le cas de YFV que ceux mis en place par DENV.
2478 De plus, nous avons démontré que les infections de YFV et DENV induisent l'expression de
2479 gènes codant pour des protéines de surface différentes pouvant influencer l'interaction des
2480 hépatocytes avec les cellules immunitaires. Contrairement à DENV, YFV aurait tendance à
2481 inhiber cette interaction. Ces observations pourraient être clés pour la compréhension des
2482 différences de pathogenèse entre YFV et DENV. D'un côté YFV pourrait diminuer le
2483 recrutement de certaines cellules immunitaires au foyer d'infection par la diminution
2484 d'expression de certaines chimiokines et d'un autre empêcher l'interaction efficace des
2485 cellules infectées avec les cellules immunitaires recrutées. Ceci pourrait expliquer que *in vivo*,
2486 chez l'homme et dans tous les modèles animaux, un nombre très faible de cellules
2487 immunitaires est détecté dans les coupes histologiques de foie (88,265,266,270)).
2488 Pour DENV, l'infection tendrait au contraire à favoriser l'interaction des hépatocytes avec les
2489 cellules immunitaires. Ceci nous rappelle que dans le modèle murins d'infection de DENV, la
2490 plupart des dommages hépatiques sont réalisés non pas par le virus mais par les cellules
2491 immunitaires : d'abord les cellules NK puis les cellules LT CD8+ (273)
2492 Pour finir, l'infection de YFV dans le modèle iHeps conduit à des dérégulations métaboliques
2493 sévères (ex : diminution de l'expression de facteurs de coagulation) modélisant la pathologie
2494 retrouvée *in vivo* chez l'homme et démontrant que le virus en lui-même peut être à l'origine
2495 de profil pathologique.
2496
2497 Enfin une différence de répllication entre les 4 sérotypes de DENV a été observée : DENV-4
2498 et DENV-1 se répliquant le plus fortement et DENV-3 le plus faiblement. Le suivi de la
2499 répllication d'une autre souche de sérotype 3, la souche DENV-3 16562, a permis de conclure
2500 que la répllication est propre à chacune des souches plutôt qu'à un effet sérotype. De plus, la
2501 souche DENV-3 utilisée au sein de cette étude a également un comportement particulier
2502 puisqu'aucun gène de la voie de l'interferon n'a été détecté suite à l'infection. Il est possible
2503 que l'induction de la réponse interféron soit induite à un point temps plus précoce que ceux
2504 testés ou que l'induction soit trop faible pour être détectée. Une fois encore la non induction
2505 de la réponse interféron est spécifique à la souche utilisée plutôt qu'au sérotype. En effet, des
2506 études reportées dans la littérature utilisant la souche DENV-3 16562 démontrent une
2507 induction des réponses immunes suite aux infections dans les lignées cellulaires HepG2. De
2508 plus, l'effet souche a déjà été démontré *in vitro* dans différents types cellulaires (339,355–
2509 357). *In vivo*, il pourrait expliquer que certaines études ne s'accordent pas sur le sérotype
2510 favorisant une dengue sévère.

2511 2. Perspectives

2512

- 2513 • Confirmation des données de RNA-seq au niveau protéique

2514 Les études préliminaires de l'analyse transcriptomique seront complétées par la confirmation
2515 de l'expression au niveau protéique. Le système Luminex, permettant l'analyse simultanée
2516 d'un grand nombre de cytokines pourra être utilisé. Pour les facteurs intra-cellulaires ou les
2517 facteurs de surface (ex : RLR) leur détection pourra être étudiée par immunofluorescence.
2518 Cette approche permettra également de mettre en évidence un éventuel effet paracrine, par
2519 double marquage avec l'antigène viral.

2520 Concernant l'impact sur le métabolisme hépatique, l'expression de certaines protéines
2521 retrouvées dérégulées dans les pathologies chez l'homme pourrait être quantifiée par ELISA.
2522 Nous avons tenté de les mesurer avec le PentraC400, équipement utilisé en laboratoire
2523 clinique pour la quantification des paramètres biochimiques en laboratoire mais la production
2524 dans le milieu n'était pas suffisante pour être détectée. D'autres approches pourraient être
2525 envisagées comme la métabolomique, nécessitant tout de même des équipements adaptés et
2526 des analyses plus complexes.

2527

- 2528 • Effet souche

2529 Le choix des souches DENV dans cette étude a été basé sur le fait qu'elles sont les souches
2530 parentales des 17D/DENV permettant de décortiquer le rôle des régions structurales et non
2531 structurales dans l'infection de DENV. Cependant, ces souches ont subi de nombreuses
2532 amplifications successives sur cellules d'insectes puis sur cellules VERO avant d'être
2533 utilisées. On dirait communément qu'il s'agit de souches de « laboratoire ». Il serait
2534 intéressant d'observer la propagation sur iHeps de souches cliniques à plus faible passage
2535 issues de patients atteints de dengue sévère et non sévère. Nous pourrions ainsi estimer le
2536 pourcentage de cellules infectées par ces souches cliniques à un temps précoce 24h et un
2537 temps tardif 96h par exemple. Cette approche permettrait de déterminer si il y'a un effet
2538 souche dans la propagation des DENV dans le foie et d'autre part si cette propagation peut
2539 être associée à la sévérité de la pathologie.

2540 D'autre part, il serait également intéressant de quantifier par qRT-PCR l'expression des
2541 molécules de présentations d'antigènes (ex : HLA-E) et d'ISGs spécifiques de DENV (ex :
2542 XAF1) afin d'évaluer si les profils transcriptomiques induits par les souches cliniques sont
2543 similaires à ceux induits par les souches de laboratoire.

- 2544 • Influence du pourcentage de cellules infectées sur l'expression de gènes

2545

2546 Un autre point qui pourrait être discuté est l'utilisation au sein de ce projet de la technique
2547 RNA-seq au vu du faible nombre de cellules infectées par DENV. Il est difficile d'évaluer
2548 dans quelle mesure ceci a pu créer un biais dans la comparaison des réponses induites par
2549 YFV et DENV. Ceci a pu avoir un impact d'une part sur la temporalité des réponses

2550 cellulaires et d'autre part sur notre capacité à détecter de possibles dérégulations
2551 métaboliques.

2552 De plus, il faut savoir que l'analyse de données RNA-seq est une analyse complexe avec
2553 différents choix de modèles statistiques impactant plus ou moins fortement la liste de DEGs
2554 final. Il existe par exemple différentes méthodes de normalisation, différentes méthodes de
2555 correction des fold changes et différents effets biologiques ou techniques à corriger. Au sein
2556 de la communauté des bioinformaticiens, le choix des méthodes n'est pas vraiment défini,
2557 chaque bioinformaticien ayant sa propre procédure. Dans notre cas, le fait d'avoir au sein du
2558 projet la confrontation de points de vue de 3 bioinformaticiens différents a été un réel atout
2559 (T. Tran et J. Becker pour BIOASTER et E. Chautard pour Sanofi Pasteur). Il paraît
2560 également indispensable que certaines représentations graphiques soient réalisées afin
2561 d'assurer un contrôle qualité des listes de gènes. C'est le cas des analyses des composantes
2562 principales qui doivent permettre d'identifier des effets dominants sur notre jeu de données
2563 comme des effets techniques (ex : si préparation des bibliothèques de l'ensemble des échantillons
2564 non réalisée en même temps) ou des effets biologiques (lots de cellules, donneurs différents,
2565 effet temps, effet du virus)). Ces effets seront à corriger selon la question biologique posée au
2566 départ du projet.

2567

2568 Il aurait pu être intéressant d'utiliser une technique de séquençage de cellule unique afin
2569 d'analyser uniquement le transcriptome des cellules infectées éliminant ainsi le biais lié à un
2570 pourcentage de cellules infectées différent. La difficulté de cette technique réside en partie
2571 dans l'étape de tri des cellules infectées tout en maintenant les cellules vivantes. Une
2572 technique appelée viscRNA-Seq a été récemment développée pour séquencer et quantifier le
2573 transcriptome d'un petit nombre de cellules et d'autre part l'ARN viral. De manière
2574 intéressante la preuve de concept de cette technique a été réalisée sur cellules Huh7 infectées
2575 par DENV et ZIKA (358). Après infection, les cellules sont récoltées après trypsination et
2576 triées au FACS afin d'éliminer les cellules mortes. Les cellules sont alorsensemencées en
2577 plaque 384 puits lysées dans un tampon auquel sont ajoutées des amorces qui permettront la
2578 rétrotranscription des ARN viraux. La quantité d'ARN viral est alors quantifiée dans chaque
2579 puits, permettant de sélectionner les cellules où le taux de réplication est le plus élevé et donc
2580 supposant le puits contenant le plus de cellules infectées.

2581 Une autre expérience pourrait être réalisée plus facilement à la suite de notre projet afin de
2582 déterminer si DENV est aussi capable d'induire des dérégulations métaboliques. Nous
2583 pourrions augmenter la MOI de façon à obtenir un pourcentage de cellules infectées par
2584 DENV proche de celui de YFV. Si cela est le cas, nous pourrions alors regarder l'expression
2585 de gènes du métabolisme (un gène codant pour un facteur de coagulation, un codant pour une
2586 protéine du complément et un codant pour la voie PXR/RXR) à 24, 48 et 96 h post-infection
2587 par qRT-PCR.

2588 • Etude de l'entrée

2589 Pour aller plus loin dans cette étude, il serait intéressant de comprendre ces différences
2590 d'entrée de YFV et DENV. Tout d'abord, il serait intéressant de regarder l'expression

2591 protéique et la localisation des différents co-récepteurs décrits pour DENV (Claudine-1,
2592 Récepteur de la laminine, AXL). Pour cela un marquage par immunofluorescence des
2593 récepteurs semblerait le plus pertinent puisque nous aurions d'une part une idée de
2594 l'expression protéique et de l'autre une notion de localisation de ces co-récepteurs. De plus,
2595 un co-marquage des cellules infectées et de ces co-récepteurs pourrait être réalisé afin de
2596 déterminer si une expression par exemple plus forte des co-récepteurs coïncide avec les
2597 infections de DENV ou coïncide avec une certaine localisation de ces protéines.

2598 Enfin, comme aucun co-récepteur n'a été décrit pour YFV sauvage, il serait intéressant de
2599 déterminer si les co-récepteurs décrits pour DENV (Claudine-1, Récepteur de la laminine,
2600 AXL) sont aussi impliqués dans l'entrée de YFV. Pour cela, nous pourrions par exemple
2601 réaliser des expériences de « Knock down », diminution d'expression de ces gènes par
2602 technique de si-RNA ciblés. Il serait peut-être également possible de générer des iHeps
2603 délétés pour ces gènes en utilisant par exemple la technique de Crisper Cas9. Ceci pourrait
2604 être réalisée en collaboration avec les fournisseurs des iHeps puisque cette extinction de gènes
2605 pourrait être réalisé au niveau des fibroblastes à l'origine des iHeps (avant toutes les étapes de
2606 reprogrammation, différenciation). Cette dernière idée est plus complexe à mettre en œuvre
2607 que la première mais présente l'avantage d'éteindre totalement l'expression des gènes dans
2608 100% des cellules. Nous évaluerons ensuite l'impact de ces diminutions d'expression de co-
2609 récepteurs sur la réplication de YFV, avec en parallèle DENV-1 ou DENV-4 comme contrôle
2610 positif. L'évaluation du pourcentage de iHeps infectés devra être lui aussi évaluée.

2611 Si la diminution d'expression des gènes a un impact sur l'infection de YFV, des expériences
2612 de « pull down » pourraient être ensuite réalisées en utilisant par exemple des co-récepteurs
2613 modifiés comme l'utilisation du récepteur TIM-Fc (359). YFV est incubé avec TIM-1-Fc ou
2614 TIM-4-Fc avec des billes de sépharose couplées à la protéine G. Le virus précipité est ensuite
2615 analysé par Western blot en utilisant l'anticorps OG5 anti- E de YFV. Si la protéine E est
2616 détectée alors TIM et TAM pourrait être des co-récepteurs potentiels de YFV.

2617 Il serait également possible de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation pour
2618 DENV et YFV. Les iHeps infectés par DENV et YFV sont lysés. Les lysats cellulaires sont
2619 alors purifiés en utilisant des colonnes anti-Fc compléxées à l'anticorps 4G2 qui cible les
2620 protéines E des flavivirus. On fait ensuite migrer sur gel de polyacrylamide les protéines
2621 retenues sur colonne. On obtient d'une part un profil de protéines liant la protéine E de DENV
2622 et d'autres part celui liant la E de YFV. Ceci permettrait d'évaluer dans un premier temps si
2623 des protéines différentes interagissent avec chacun des virus. Si c'est le cas, les protéines
2624 d'intérêt pourront être identifiées ensuite par spectrométrie de masse.

2625 • Complexification du modèle iHeps 2D:

2626 L'utilisation d'un modèle d'iHeps cultivés en 3D n'a pas favorisé l'infection de DENV.
2627 Cependant, il aurait été intéressant de vérifier que ce modèle est plus physiologique que le
2628 modèle 2D notamment en termes de polarisation des cellules. Un marquage
2629 immunofluorescent sur coupe de sphéroïdes pourrait être réalisé afin d'identifier si un réseau
2630 de canalicules biliaires est bien mis en place dans ce modèle. Le transporteur canaliculaire,

2631 MRP2, est une des protéines classiquement révéle pour mettre en évidence la polarisation
2632 (360,361).

2633 De plus, l'infection aurait peut être pu être favorisée par une agitation des sphéroïdes de façon
2634 à favoriser la circulation des virus au sein de la sphère comme illustré par le système
2635 microfluidique dans l'étude d'HBV.

2636 Cependant, il faut savoir que les systèmes 3D restent encore aujourd'hui difficile d'utilisation
2637 nécessitant des techniques d'analyses qui leur sont spécifiques ou du moins d'adapter les
2638 techniques utilisées en 2D. Par exemple, l'extraction des ARN cellulaires nécessitent
2639 l'utilisation de kits d'extraction tissulaire et les rendements ne sont pas aussi élevés que ceux
2640 obtenus avec les cellules cultivés en 2D. Autre exemple, les techniques d'imagerie sont aussi
2641 à adapter nécessitant par exemple de couper au préalable les sphéroïdes pour visualiser
2642 l'organisation cellulaire à l'intérieur. Au vu de la petite taille des sphéroïdes, cette tâche n'est
2643 pas aisée.

2644 La complexification du modèle iHeps 2D peut aussi être réalisée par des systèmes de co-
2645 culture des iHeps avec d'autres types cellulaires. Il pourrait par exemple être intéressant de
2646 co-cultiver les iHeps avec les cellules de Kupffer. Ceci permettrait de mimer les réponses
2647 immunitaires innées précoces du foie induites suite aux infections.

2648 Les cellules NKs jouant un rôle important dans les dommages hépatiques observés dans les
2649 modèles murins, nous pourrions également envisager une co-culture des iHeps avec des
2650 cellules NKs. Ceci permettrait d'évaluer si l'augmentation d'expression de molécules de
2651 classe I dans les hépatocytes infectés par DENV favorise ou non l'interaction avec ces
2652 cellules L'impact sur l'activité des cellules NKs pourra également être évalué en quantifiant
2653 par exemple la production d'IFN- γ par technique d'ELISA .

2654 Néanmoins, la complexité des systèmes de co-culture réside dans l'établissement de milieux
2655 de culture assurant une viabilité et un maintien de phénotype des différents types cellulaires.
2656 D'autres méthodes pourraient permettre d'évaluer l'impact des dérégulations hépatocytaires
2657 sur d'autres types cellulaires. Certaines molécules de classe I comme HLA-E peuvent être
2658 sécrétées par les cellules. Après s'être assuré que les iHeps infectés en sont capables (par
2659 exemple par Western Blot ou ELISA sur les surnageants), nous pourrions mettre en contact
2660 les surnageants de iHeps infectés avec les cellules NKs et évaluer l'impact sur leur activité.

Références bibliographiques

- 2661 1. Holbrook MR. Historical Perspectives on Flavivirus Research. *Viruses*. 30 2017;9(5).
- 2662 2. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J*
2663 *Virol.* janv 1998;72(1):73-83.
- 2664 3. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic
2665 relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal
2666 antisera. *J Gen Virol.* janv 1989;70 (Pt 1):37-43.
- 2667 4. Huang Y-JS, Higgs S, Horne KM, Vanlandingham DL. Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses*. 24
2668 nov 2014;6(11):4703-30.
- 2669 5. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet Lond Engl.* 31 janv 2015;385(9966):453-65.
- 2670 6. Yves Gererd-Chambaz, données personnelles
- 2671 7. Li W, Li Y, Kedersha N, Anderson P, Emara M, Swiderek KM, et al. Cell proteins TIA-1 and TIAR
2672 interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and
2673 facilitate virus replication. *J Virol.* déc 2002;76(23):11989-2000.
- 2674 8. García-Montalvo BM, Medina F, del Angel RM. La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and
2675 3' ends of Dengue 4 virus RNA. *Virus Res.* 15 juin 2004;102(2):141-50.
- 2676 9. Chen CJ, Kuo MD, Chien LJ, Hsu SL, Wang YM, Lin JH. RNA-protein interactions: involvement of
2677 NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *J Virol.* mai
2678 1997;71(5):3466-73.
- 2679 10. De Nova-Ocampo M, Villegas-Sepúlveda N, del Angel RM. Translation elongation factor-1alpha,
2680 La, and PTB interact with the 3' untranslated region of dengue 4 virus RNA. *Virology.* 10 avr
2681 2002;295(2):337-47.
- 2682 11. Falgout B, Markoff L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-
2683 bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* nov 1995;69(11):7232-43.
- 2684 12. Oliveira ERA, Mohana-Borges R, de Alencastro RB, Horta BAC. The flavivirus capsid protein:
2685 Structure, function and perspectives towards drug design. *Virus Res.* 02 2017;227:115-23.
- 2686 13. Netsawang J, Noisakran S, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Wongwiwat W, Malasit P, et al. Nuclear
2687 localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus*
2688 *Res.* févr 2010;147(2):275-83.
- 2689 14. Yang M-R, Lee SR, Oh W, Lee E-W, Yeh J-Y, Nah J-J, et al. West Nile virus capsid protein induces
2690 p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus. *Cell Microbiol.* janv
2691 2008;10(1):165-76.
- 2692 15. Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, et al. Nuclear localization of
2693 Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J Virol.* mars
2694 2005;79(6):3448-58.
- 2695 16. Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis
2696 virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* juin
2697 2002;76(11):5480-91.

- 2698 17. Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, et al. The flavivirus precursor membrane-
2699 envelope protein complex: structure and maturation. *Science*. 28 mars 2008;319(5871):1830-4.
- 2700 18. Pastorino B, Nougairède A, Wurtz N, Gould E, de Lamballerie X. Role of host cell factors in
2701 flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral*
2702 *Res.* sept 2010;87(3):281-94.
- 2703 19. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*. 19 juin 2012;30(29):4301-6.
- 2704 20. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology*. 29
2705 2016;13:131.
- 2706 21. Lopez-Denman AJ, Mackenzie JM. The IMPORTance of the Nucleus during Flavivirus Replication.
2707 *Viruses* [Internet]. 19 janv 2017 [cité 15 avr 2019];9(1). Disponible sur:
2708 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5294983/>
- 2709 22. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene
2710 silencing in plants. *Science*. 29 oct 1999;286(5441):950-2.
- 2711 23. Li W, Brinton MA. The 3' stem loop of the West Nile virus genomic RNA can suppress translation
2712 of chimeric mRNAs. *Virology*. 15 août 2001;287(1):49-61.
- 2713 24. Juárez-Martínez AB, Vega-Almeida TO, Salas-Benito M, García-Espitia M, De Nova-Ocampo M,
2714 Del Ángel RM, et al. Detection and sequencing of defective viral genomes in C6/36 cells
2715 persistently infected with dengue virus 2. *Arch Virol*. mars 2013;158(3):583-99.
- 2716 25. Fernandez-Garcia M-D, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections:
2717 using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 23 avr 2009;5(4):318-28.
- 2718 26. Pijlman GP, Funk A, Kondratieva N, Leung J, Torres S, van der Aa L, et al. A highly structured,
2719 nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell*
2720 *Host Microbe*. 11 déc 2008;4(6):579-91.
- 2721 27. Funk A, Truong K, Nagasaki T, Torres S, Floden N, Balmori Melian E, et al. RNA structures
2722 required for production of subgenomic flavivirus RNA. *J Virol*. nov 2010;84(21):11407-17.
- 2723 28. Schuessler A, Funk A, Lazear HM, Cooper DA, Torres S, Daffis S, et al. West Nile virus noncoding
2724 subgenomic RNA contributes to viral evasion of the type I interferon-mediated antiviral
2725 response. *J Virol*. mai 2012;86(10):5708-18.
- 2726 29. Szretter KJ, Daniels BP, Cho H, Gainey MD, Yokoyama WM, Gale M, et al. 2'-O methylation of the
2727 viral mRNA cap by West Nile virus evades ifit1-dependent and -independent mechanisms of host
2728 restriction in vivo. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002698.
- 2729 30. Mazeaud C, Freppel W, Chatel-Chaix L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During
2730 Pathogenesis. *Front Genet*. 2018;9:595.
- 2731 31. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus
2732 Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. sept 2015;89(17):8880-96.
- 2733 32. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN
2734 (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 7 avr
2735 2003;197(7):823-9.

- 2736 33. Davis CW, Nguyen H-Y, Hanna SL, Sánchez MD, Doms RW, Pierson TC. West Nile virus
2737 discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol.* févr
2738 2006;80(3):1290-301.
- 2739 34. Barkhash AV, Perelygin AA, Babenko VN, Brinton MA, Voevoda MI. Single nucleotide
2740 polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human
2741 predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* janv 2012;93(1):64-8.
- 2742 35. Wang L, Chen R-F, Liu J-W, Lee I-K, Lee C-P, Kuo H-C, et al. DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G
2743 polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN
2744 expression and immune augmentation. *PLoS Negl Trop Dis.* 4 janv 2011;5(1):e934.
- 2745 36. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, et al.
2746 Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS*
2747 *Pathog.* déc 2008;4(12):e1000244.
- 2748 37. Nawa M, Takasaki T, Yamada K-I, Kurane I, Akatsuka T. Interference in Japanese encephalitis
2749 virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine. *J Gen Virol.* juill
2750 2003;84(Pt 7):1737-41.
- 2751 38. Ishak R, Tovey DG, Howard CR. Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures.
2752 *J Gen Virol.* févr 1988;69 (Pt 2):325-35.
- 2753 39. Chu JJH, Ng ML. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic
2754 pathway. *J Virol.* oct 2004;78(19):10543-55.
- 2755 40. Nour AM, Li Y, Wolenski J, Modis Y. Viral Membrane Fusion and Nucleocapsid Delivery into the
2756 Cytoplasm are Distinct Events in Some Flaviviruses. *PLOS Pathog.* 5 sept 2013;9(9):e1003585.
- 2757 41. Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Chazal M, Hafirassou ML, Dejarnac O, Zamborlini A, et al.
2758 Vaccine and Wild-Type Strains of Yellow Fever Virus Engage Distinct Entry Mechanisms and
2759 Differentially Stimulate Antiviral Immune Responses. *mBio.* 9 févr 2016;7(1):e01956-01915.
- 2760 42. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Alternative infectious entry pathways for dengue virus
2761 serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol.* oct 2009;11(10):1533-49.
- 2762 43. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. Receptors and
2763 routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* mars 2015;39(2):155-70.
- 2764 44. Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors:
2765 Diversity, Identity, and Cell Entry. *Front Immunol* [Internet]. 26 sept 2018 [cité 15 avr 2019];9.
2766 Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6168832/>
- 2767 45. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus Entry Receptors: An Update. *Viruses.*
2768 30 déc 2013;6(1):69-88.
- 2769 46. Peiris JS, Porterfield JS. Antibody-mediated enhancement of Flavivirus replication in
2770 macrophage-like cell lines. *Nature.* 29 nov 1979;282(5738):509-11.
- 2771 47. Westaway EG. Flavivirus Replication Strategy. In: Maramorosch K, Murphy FA, Shatkin AJ,
2772 éditeurs. *Advances in Virus Research* [Internet]. Academic Press; 1987 [cité 8 mai 2019]. p.
2773 45-90. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352708603164>

- 2774 48. Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. 2006;52.
- 2775 49. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and three-
2776 dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*.
2777 23 avr 2009;5(4):365-75.
- 2778 50. Miorin L, Romero-Brey I, Maiuri P, Hoppe S, Locker J, Bartenschlager R, et al. Three-Dimensional
2779 Architecture of Tick-Borne Encephalitis Virus Replication Sites and Trafficking of the Replicated
2780 RNA. *J Virol*. 3 avr 2013;87.
- 2781 51. den Boon JA, Ahlquist P. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA
2782 virus replication factories. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:241-56.
- 2783 52. Morrison J, Aguirre S, Fernandez-Sesma A. Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. *Viruses*. 15
2784 mars 2012;4(3):397-413.
- 2785 53. Pierson TC, Diamond MS. Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses.
2786 *Curr Opin Virol*. avr 2012;2(2):168-75.
- 2787 54. Junjhon J, Lausumpao M, Supasa S, Noisakran S, Songjaeng A, Saraithong P, et al. Differential
2788 modulation of prM cleavage, extracellular particle distribution, and virus infectivity by conserved
2789 residues at nonfurin consensus positions of the dengue virus pr-M junction. *J Virol*. nov
2790 2008;82(21):10776-91.
- 2791 55. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue
2792 virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 8 mars
2793 2002;108(5):717-25.
- 2794 56. Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, et al. Conformational changes of
2795 the flavivirus E glycoprotein. *Struct Lond Engl* 1993. sept 2004;12(9):1607-18.
- 2796 57. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, et al. Structures of immature
2797 flavivirus particles. *EMBO J*. 2 juin 2003;22(11):2604-13.
- 2798 58. Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the
2799 continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol*.
2800 13 juin 2011;9(7):532-41.
- 2801 59. Vasilakis N, Weaver SC. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol*. 2017;22:30-5.
- 2802 60. Richter MKS, da Silva Voorham JM, Torres Pedraza S, Hoornweg TE, van de Pol DPI, Rodenhuis-
2803 Zybert IA, et al. Immature Dengue Virus Is Infectious in Human Immature Dendritic Cells via
2804 Interaction with the Receptor Molecule DC-SIGN. *PLoS ONE* [Internet]. 2 juin 2014 [cité 8 avr
2805 2019];9(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4041791/>
- 2806 61. Rodenhuis-Zybert IA, van der Schaar HM, da Silva Voorham JM, van der Ende-Metselaar H, Lei H-
2807 Y, Wilschut J, et al. Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathog*. janv
2808 2010;6(1):e1000718.
- 2809 62. Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. New insights into the immunopathology and
2810 control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol*. déc 2015;15(12):745-59.

- 2811 63. Schalich J, Allison SL, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Recombinant subviral particles from
2812 tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus
2813 envelope glycoprotein functions. *J Virol.* juill 1996;70(7):4549-57.
- 2814 64. Corver J, Ortiz A, Allison SL, Schalich J, Heinz FX, Wilschut J. Membrane fusion activity of tick-
2815 borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system.
2816 *Virology.* 30 mars 2000;269(1):37-46.
- 2817 65. Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, et al. The revised global
2818 yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal
2819 WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis.* août
2820 2011;11(8):622-32.
- 2821 66. Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, et al. Transmission
2822 of West Nile Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 29 mai
2823 2003;348(22):2196-203.
- 2824 67. Chaturvedi UC, Mathur A, Chandra A, Das SK, Tandon HO, Singh UK. Transplacental infection with
2825 Japanese encephalitis virus. *J Infect Dis.* juin 1980;141(6):712-5.
- 2826 68. Li C-X, Guo X-X, Deng Y-Q, Xing D, Sun A-J, Liu Q-M, et al. Vector competence and transovarial
2827 transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerg Microbes Infect.* 26 avr
2828 2017;6(4):e23.
- 2829 69. Diallo M, Thonnon J, Fontenille D. Vertical transmission of the yellow fever virus by *Aedes*
2830 *aegypti* (Diptera, Culicidae): dynamics of infection in F1 adult progeny of orally infected females.
2831 *Am J Trop Med Hyg.* janv 2000;62(1):151-6.
- 2832 70. Khin MM, Than KA. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am J*
2833 *Trop Med Hyg.* mai 1983;32(3):590-4.
- 2834 71. Flavivirus - Creative Diagnostics [Internet]. [cité 7 avr 2019]. Disponible sur:
2835 <https://www.creative-diagnostics.com/Flavivirus.htm>
- 2836 72. Yellow Fever - Chapter 3 - 2018 Yellow Book | Travelers' Health | CDC [Internet]. [cité 16 mai
2837 2019]. Disponible sur: [https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-](https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever)
2838 [related-to-travel/yellow-fever](https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever)
- 2839 73. Dengue - Chapter 3 - 2018 Yellow Book | Travelers' Health | CDC [Internet]. [cité 16 mai 2019].
2840 Disponible sur: [https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-](https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/dengue)
2841 [travel/dengue](https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/dengue)
- 2842 74. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus
2843 types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 1 mars 2014;22(3):138-46.
- 2844 75. Jiang T, Yu X-D, Hong W-X, Zhou W-Z, Yu M, Deng Y-Q, et al. Co-circulation of two genotypes of
2845 dengue virus serotype 3 in Guangzhou, China, 2009. *Virology.* 22 juin 2012;9:125.
- 2846 76. Racherla RG, Pamireddy ML, Mohan A, Mudhigeti N, Mahalakshmi PA, Nallapireddy U, et al. Co-
2847 circulation of four dengue serotypes at South Eastern Andhra Pradesh, India: A prospective
2848 study. *Indian J Med Microbiol.* juin 2018;36(2):236-40.

- 2849 77. Rahman M, Rahim R, Hasan A, Sobhan Murad A, Biswas M. Co-circulation of Three Dengue Virus
2850 Serotypes in 2017 in Dhaka city: First report from Bangladesh. 1 janv 2019;5:637.
- 2851 78. Vaddadi K, Gandikota C, Jain PK, Prasad VSV, Venkataramana M. Co-circulation and co-infections
2852 of all dengue virus serotypes in Hyderabad, India 2014. *Epidemiol Infect.* sept
2853 2017;145(12):2563-74.
- 2854 79. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global
2855 spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.*
2856 2012;6(8):e1760.
- 2857 80. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution
2858 and burden of dengue. *Nature.* 25 avr 2013;496(7446):504-7.
- 2859 81. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic
2860 problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* févr 2002;10(2):100-3.
- 2861 82. DICOM_Anne.G, DICOM_Jocelyne.M, DICOM_Anne.G, DICOM_Jocelyne.M. Moustiques vecteurs
2862 de maladies [Internet]. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2019 [cité 15 avr 2019].
2863 Disponible sur: [https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-](https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/moustiques)
2864 [microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/moustiques](https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/moustiques)
- 2865 83. Epidémie de dengue sans précédent à La Réunion, dit l’OMS. Reuters [Internet]. 2 mai 2018 [cité
2866 15 avr 2019]; Disponible sur: <https://fr.reuters.com/article/frEuroRpt/idFRL8N1S93QX>
- 2867 84. OMS | Stratégies de lutte antivectorielle [Internet]. WHO. [cité 15 avr 2019]. Disponible sur:
2868 http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/fr/
- 2869 85. Monaghan AJ, Schmidt CA, Hayden MH, Smith KA, Reiskind MH, Cabell R, et al. A Simple Model
2870 to Predict the Potential Abundance of *Aedes aegypti* Mosquitoes One Month in Advance. *Am J*
2871 *Trop Med Hyg.* févr 2019;100(2):434-7.
- 2872 86. de Almeida MAB, Dos Santos E, Cardoso J da C, da Silva LG, Rabelo RM, Bicca-Marques JC.
2873 Predicting Yellow Fever Through Species Distribution Modeling of Virus, Vector, and Monkeys.
2874 *EcoHealth.* mars 2019;16(1):95-108.
- 2875 87. Medical Microbiology 6th edition (9780323054706) - Textbooks.com [Internet]. [cité 7 avr 2019].
2876 Disponible sur: [https://www.textbooks.com/Medical-Microbiology-6th-](https://www.textbooks.com/Medical-Microbiology-6th-Edition/9780323054706/Patrick-R-Murray.php)
2877 [Edition/9780323054706/Patrick-R-Murray.php](https://www.textbooks.com/Medical-Microbiology-6th-Edition/9780323054706/Patrick-R-Murray.php)
- 2878 88. Monath TP, Barrett AD. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv Virus Res.*
2879 2003;60:343-95.
- 2880 89. Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe.
2881 *Trends Microbiol.* nov 2018;26(11):913-28.
- 2882 90. Principaux repères sur la fièvre jaune [Internet]. [cité 15 avr 2019]. Disponible sur:
2883 <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>
- 2884 91. Dengue and severe dengue [Internet]. [cité 6 avr 2019]. Disponible sur:
2885 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

- 2886 92. Maladie à virus Zika [Internet]. [cité 15 avr 2019]. Disponible sur: [https://www.who.int/fr/news-](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus)
2887 room/fact-sheets/detail/zika-virus
- 2888 93. Encéphalite japonaise [Internet]. [cité 15 avr 2019]. Disponible sur:
2889 <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis>
- 2890 94. West Nile virus [Internet]. [cité 15 avr 2019]. Disponible sur: [https://www.who.int/fr/news-](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus)
2891 room/fact-sheets/detail/west-nile-virus
- 2892 95. WHO | Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition
2893 [Internet]. WHO. [cité 15 avr 2019]. Disponible sur:
2894 <https://www.who.int/rpc/guidelines/9789241547871/en/>
- 2895 96. Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat*
2896 *Rev Immunol.* déc 2013;13(12):875-87.
- 2897 97. Jones EM, Wilson DC. Clinical features of yellow fever cases at Vom Christian Hospital during the
2898 1969 epidemic on the Jos Plateau, Nigeria. *Bull World Health Organ.* 1972;46(5):653-7.
- 2899 98. Connor B, Bunn WB. The changing epidemiology of Japanese encephalitis and New data: the
2900 implications for New recommendations for Japanese encephalitis vaccine. *Trop Dis Travel Med*
2901 *Vaccines* [Internet]. 1 août 2017 [cité 5 avr 2019];3. Disponible sur:
2902 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5537987/>
- 2903 99. Jain A, Chaturvedi UC. Dengue in infants: an overview. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1 juill
2904 2010;59(2):119-30.
- 2905 100. Toledo J, George L, Martinez E, Lazaro A, Han WW, Coelho GE, et al. Relevance of Non-
2906 communicable Comorbidities for the Development of the Severe Forms of Dengue: A Systematic
2907 Literature Review. *PLoS Negl Trop Dis.* janv 2016;10(1):e0004284.
- 2908 101. Badawi A, Velummailum R, Ryou SG, Senthinathan A, Yaghoubi S, Vasileva D, et al.
2909 Prevalence of chronic comorbidities in dengue fever and West Nile virus: A systematic review
2910 and meta-analysis. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200200.
- 2911 102. Beck MA, Handy J, Levander OA. Host nutritional status: the neglected virulence factor.
2912 *Trends Microbiol.* sept 2004;12(9):417-23.
- 2913 103. Guabiraba R, Ryffel B. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and
2914 lessons from murine models. *Immunology.* févr 2014;141(2):143-56.
- 2915 104. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, et al. Antibody-
2916 dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science.* 17
2917 2017;358(6365):929-32.
- 2918 105. Vicente CR, Herbinger K-H, Fröschl G, Malta Romano C, de Souza Areias Cabidelle A, Cerutti
2919 Junior C. Serotype influences on dengue severity: a cross-sectional study on 485 confirmed
2920 dengue cases in Vitória, Brazil. *BMC Infect Dis.* 08 2016;16:320.
- 2921 106. Mehta TK, Shah PD. Identification of prevalent dengue serotypes by reverse transcriptase
2922 polymerase chain reaction and correlation with severity of dengue as per the recent World
2923 Health Organization classification (2009). *Indian J Med Microbiol.* juin 2018;36(2):273-8.

- 2924 107. Anantapreecha S, Chanama S, A-nuegoonpipat A, Naemkhunthot S, Sa-NGasang A,
2925 Sawanpanyalert P, et al. Serological and virological features of dengue fever and dengue
2926 haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiol Infect.* juin 2005;133(3):503-7.
- 2927 108. Andriani S, Aryati A, Hadi U. CORRELATION OF DENGUE VIRUS SEROTYPE AND DVI SEVERITY
2928 IN ADULT PATIENTS. *Indones J Clin Pathol Med Lab.* 30 sept 2018;24:185.
- 2929 109. Rocha BAM, Guilarde AO, Argolo AFLT, Tassara MP, da Silveira LA, Junqueira IC, et al.
2930 Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of
2931 Brazil. *Infect Dis Poverty.* 2 août 2017;6(1):116.
- 2932 110. Daep CA, Muñoz-Jordán JL, Eugenin EA. Flaviviruses, an expanding threat in public health:
2933 focus on Dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. *J Neurovirol.* déc
2934 2014;20(6):539-60.
- 2935 111. Fischer L, Hay DC, O'Farrelly C. Innate immunity in stem cell-derived hepatocytes. *Philos
2936 Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 5 juill 2018;373(1750).
- 2937 112. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 24 févr
2938 2006;124(4):783-801.
- 2939 113. Plataniotis LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev
2940 Immunol.* mai 2005;5(5):375-86.
- 2941 114. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions.
2942 *Curr Opin Virol.* déc 2011;1(6):519-25.
- 2943 115. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host
2944 defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:513-45.
- 2945 116. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll
2946 protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 24 juill 1997;388(6640):394-7.
- 2947 117. Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, et al. Hemagglutinin
2948 protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol.* sept
2949 2002;76(17):8729-36.
- 2950 118. Ge Y, Mansell A, Ussher JE, Brooks AES, Manning K, Wang CJH, et al. Rotavirus NSP4 Triggers
2951 Secretion of Proinflammatory Cytokines from Macrophages via Toll-Like Receptor 2. *J Virol.* oct
2952 2013;87(20):11160-7.
- 2953 119. Liang Z, Wu S, Li Y, He L, Wu M, Jiang L, et al. Activation of Toll-like receptor 3 impairs the
2954 dengue virus serotype 2 replication through induction of IFN- β in cultured hepatoma cells. *PLoS
2955 One.* 2011;6(8):e23346.
- 2956 120. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3
2957 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* déc
2958 2004;10(12):1366-73.
- 2959 121. Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SRNI, Torrentes-Carvalho A, Zagne S-MO, et
2960 al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte
2961 antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology.*
2962 juin 2010;130(2):202-16.

- 2963 122. Neves PC da C, Matos DC de S, Marcovistz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation
2964 after human yellow fever vaccination. *Vaccine*. 18 sept 2009;27(41):5543-9.
- 2965 123. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach
2966 predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol*. janv
2967 2009;10(1):116-25.
- 2968 124. Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-
2969 17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent
2970 immunity. *J Exp Med*. 20 févr 2006;203(2):413-24.
- 2971 125. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. Shared and
2972 unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate
2973 immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 sept 2005;175(5):2851-8.
- 2974 126. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, et al. The RNA
2975 helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible
2976 gene-I. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 oct 2005;175(8):5260-8.
- 2977 127. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, et al. LGP2 is a positive
2978 regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 janv
2979 2010;107(4):1512-7.
- 2980 128. Nazmi A, Dutta K, Hazra B, Basu A. Role of pattern recognition receptors in flavivirus
2981 infections. *Virus Res*. 24 juin 2014;185:32-40.
- 2982 129. Olagnier D, Scholte FEM, Chiang C, Albulescu IC, Nichols C, He Z, et al. Inhibition of dengue
2983 and chikungunya virus infections by RIG-I-mediated type I interferon-independent stimulation of
2984 the innate antiviral response. *J Virol*. avr 2014;88(8):4180-94.
- 2985 130. Jacobs SR, Damania B. NLRs, inflammasomes, and viral infection. *J Leukoc Biol*. sept
2986 2012;92(3):469-77.
- 2987 131. Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA, Lei Y, Morrison TE, Zimmermann AG, et al. NLRX1 is a
2988 regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature*. 31 janv 2008;451(7178):573-7.
- 2989 132. Cui J, Zhu L, Xia X, Wang HY, Legras X, Hong J, et al. NLRC5 negatively regulates the NF-
2990 kappaB and type I interferon signaling pathways. *Cell*. 30 avr 2010;141(3):483-96.
- 2991 133. Ramos HJ, Lanteri MC, Blahnik G, Negash A, Suthar MS, Brassil MM, et al. IL-1 β signaling
2992 promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection. *PLoS Pathog*.
2993 2012;8(11):e1003039.
- 2994 134. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SMO, Azeredo EL, Nogueira RMR, Assis EF, et al. Multiplex cytokine
2995 profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC*
2996 *Infect Dis*. 25 juin 2008;8:86.
- 2997 135. Wu M-F, Chen S-T, Yang A-H, Lin W-W, Lin Y-L, Chen N-J, et al. CLEC5A is critical for dengue
2998 virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood*. 3 janv
2999 2013;121(1):95-106.
- 3000 136. Cong Y, McArthur MA, Cohen M, Jahrling PB, Janosko KB, Josleyn N, et al. Characterization of
3001 Yellow Fever Virus Infection of Human and Non-human Primate Antigen Presenting Cells and

- 3002 Their Interaction with CD4+ T Cells. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 18 mai 2016 [cité 8 mai
3003 2019];10(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4871483/>
- 3004 137. Sakhon OS, Severo MS, Kotsyfakis M, Pedra JHF. A Nod to disease vectors: mitigation of
3005 pathogen sensing by arthropod saliva. *Front Microbiol* [Internet]. 21 oct 2013 [cité 8 mai 2019];4.
3006 Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3801108/>
- 3007 138. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and
3008 immunity. *Cell Microbiol*. févr 2014;16(2):185-94.
- 3009 139. Chen S-T, Lin Y-L, Huang M-T, Wu M-F, Cheng S-C, Lei H-Y, et al. CLEC5A is critical for dengue-
3010 virus-induced lethal disease. *Nature*. 29 mai 2008;453(7195):672-6.
- 3011 140. Schoggins JW, MacDuff DA, Imanaka N, Gainey MD, Shrestha B, Eitson JL, et al. Pan-viral
3012 specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature*. 30 janv
3013 2014;505(7485):691-5.
- 3014 141. Sun B, Sundström KB, Chew JJ, Bist P, Gan ES, Tan HC, et al. Dengue virus activates cGAS
3015 through the release of mitochondrial DNA. *Sci Rep*. 15 2017;7(1):3594.
- 3016 142. Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine*. 7 janv
3017 2013;31(3):461-71.
- 3018 143. Dalrymple NA, Cimica V, Mackow ER. Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling
3019 by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-
3020 Regulating Virulence Determinant. *mBio* [Internet]. 12 mai 2015 [cité 7 avr 2019];6(3). Disponible
3021 sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4436066/>
- 3022 144. He Z, Zhu X, Wen W, Yuan J, Hu Y, Chen J, et al. Dengue Virus Subverts Host Innate Immunity
3023 by Targeting Adaptor Protein MAVS. *J Virol*. 15 2016;90(16):7219-30.
- 3024 145. Aguirre S, Luthra P, Sanchez-Aparicio MT, Maestre AM, Patel J, Lamothe F, et al. Dengue virus
3025 NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during
3026 infection. *Nat Microbiol*. 27 mars 2017;2:17037.
- 3027 146. Angleró-Rodríguez YI, Pantoja P, Sariol CA. Dengue Virus Subverts the Interferon Induction
3028 Pathway via NS2B/3 Protease-IκB Kinase ε Interaction. *Clin Vaccine Immunol* CVI. janv
3029 2014;21(1):29-38.
- 3030 147. Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, Patel JR, Savage T, Gutman D, et al. DENV inhibits type I IFN
3031 production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS Pathog*. 2012;8(10):e1002934.
- 3032 148. Zou J, Xie X, Lee LT, Chandrasekaran R, Reynaud A, Yap L, et al. Dimerization of flavivirus
3033 NS4B protein. *J Virol*. mars 2014;88(6):3379-91.
- 3034 149. Chan YK, Gack MU. A phosphomimetic-based mechanism of dengue virus to antagonize
3035 innate immunity. *Nat Immunol*. mai 2016;17(5):523-30.
- 3036 150. Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, et al.
3037 Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *J Virol*. juill
3038 2005;79(13):8004-13.

- 3039 151. Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi P-Y, García-Sastre A. NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2
3040 Binding and Degradation. *J Virol*. 1 juin 2009;83(11):5408-18.
- 3041 152. Morrison J, Laurent-Rolle M, Maestre AM, Rajsbaum R, Pisanelli G, Simon V, et al. Dengue
3042 Virus Co-opts UBR4 to Degrade STAT2 and Antagonize Type I Interferon Signaling. *PLoS Pathog*
3043 [Internet]. 28 mars 2013 [cité 7 avr 2019];9(3). Disponible sur:
3044 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610674/>
- 3045 153. Laurent-Rolle M, Morrison J, Rajsbaum R, Macleod JML, Pisanelli G, Pham A, et al. The
3046 interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I
3047 interferon. *Cell Host Microbe*. 10 sept 2014;16(3):314-27.
- 3048 154. Xia H, Luo H, Shan C, Muruato AE, Nunes BT, Medeiros DBA, et al. An evolutionary NS1
3049 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nat Commun*. 29
3050 2018;9(1):414.
- 3051 155. Gack MU, Shin YC, Joo C-H, Urano T, Liang C, Sun L, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin
3052 ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. 19 avr 2007;446(7138):916-20.
- 3053 156. Manokaran G, Finol E, Wang C, Gunaratne J, Bahl J, Ong EZ, et al. Dengue subgenomic RNA
3054 binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*. 9 oct
3055 2015;350(6257):217-21.
- 3056 157. Bidet K, Dadlani D, Garcia-Blanco MA. G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for
3057 translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA.
3058 *PLoS Pathog*. juill 2014;10(7):e1004242.
- 3059 158. Liu Y, Liu H, Zou J, Zhang B, Yuan Z. Dengue virus subgenomic RNA induces apoptosis through
3060 the Bcl-2-mediated PI3k/Akt signaling pathway. *Virology*. 5 janv 2014;448:15-25.
- 3061 159. Mehlhop E, Whitby K, Oliphant T, Marri A, Engle M, Diamond MS. Complement activation is
3062 required for induction of a protective antibody response against West Nile virus infection. *J Virol*.
3063 juin 2005;79(12):7466-77.
- 3064 160. Mehlhop E, Ansarah-Sobrinho C, Johnson S, Engle M, Fremont DH, Pierson TC, et al.
3065 Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an
3066 IgG subclass-specific manner. *Cell Host Microbe*. 13 déc 2007;2(6):417-26.
- 3067 161. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, et al. Antagonism of the
3068 complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med*. 12 avr
3069 2010;207(4):793-806.
- 3070 162. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of
3071 flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J*
3072 *Immunol Baltim Md* 1950. 1 juill 2011;187(1):424-33.
- 3073 163. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, et al. West Nile
3074 virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein
3075 factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 déc 2006;103(50):19111-6.
- 3076 164. Bokisch VA, Top FH, Russell PK, Dixon FJ, Müller-Eberhard HJ. The potential pathogenic role
3077 of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. *N Engl J Med*. 8 nov
3078 1973;289(19):996-1000.

- 3079 165. Nascimento EJM, Silva AM, Cordeiro MT, Brito CA, Gil LHVG, Braga-Neto U, et al. Alternative
3080 complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. *PloS One*. 26 août
3081 2009;4(8):e6782.
- 3082 166. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent
3083 immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-
3084 cell-dependent immunity are less critical. *J Virol*. mars 2004;78(6):2701-10.
- 3085 167. Meier KC, Gardner CL, Khoretchenko MV, Klimstra WB, Ryman KD. A mouse model for
3086 studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog*. oct
3087 2009;5(10):e1000614.
- 3088 168. Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and innate immune responses
3089 in dengue infection: protection versus disease induction. *Am J Pathol*. juin 2013;182(6):1950-61.
- 3090 169. Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res*. avr 2008;78(1):116-24.
- 3091 170. Vitarana T, de Silva H, Withana N, Gunasekera C. Elevated tumour necrosis factor in dengue
3092 fever and dengue haemorrhagic fever. *Ceylon Med J*. juin 1991;36(2):63-5.
- 3093 171. Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and
3094 IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*. avr
3095 2001;30(3):229-33.
- 3096 172. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, et al. Elevated
3097 levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol*. nov 1998;56(3):280-5.
- 3098 173. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue
3099 hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. juill
3100 2000;28(3):183-8.
- 3101 174. ter Meulen J, Sakho M, Koulemou K, Magassouba N, Bah A, Preiser W, et al. Activation of the
3102 cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. *J Infect Dis*. 15 nov
3103 2004;190(10):1821-7.
- 3104 175. Pang J, Chia PY, Lye DC, Leo YS. Progress and Challenges towards Point-of-Care Diagnostic
3105 Development for Dengue. *J Clin Microbiol*. 2017;55(12):3339-49.
- 3106 176. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat*
3107 *Rev Microbiol*. juill 2007;5(7):518-28.
- 3108 177. Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, Diamond MS, Fremont DH. Structural basis of
3109 West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature*. 29 sept 2005;437(7059):764-9.
- 3110 178. Diamond MS, Shrestha B, Marri A, Mahan D, Engle M. B cells and antibody play critical roles
3111 in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J Virol*. févr
3112 2003;77(4):2578-86.
- 3113 179. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue
3114 viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J*
3115 *Infect Dis*. janv 2000;181(1):2-9.

- 3116 180. Xiao S-Y, Guzman H, da Rosa APAT, Zhu H-B, Tesh RB. Alteration of clinical outcome and
3117 histopathology of yellow fever virus infection in a hamster model by previous infection with
3118 heterologous flaviviruses. *Am J Trop Med Hyg.* juin 2003;68(6):695-703.
- 3119 181. Izurieta RO, Macaluso M, Watts DM, Tesh RB, Guerra B, Cruz LM, et al. Anamnestic immune
3120 response to dengue and decreased severity of yellow Fever. *J Glob Infect Dis.* juill
3121 2009;1(2):111-6.
- 3122 182. Gould EA, Buckley A. Antibody-dependent enhancement of yellow fever and Japanese
3123 encephalitis virus neurovirulence. *J Gen Virol.* juin 1989;70 (Pt 6):1605-8.
- 3124 183. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue
3125 hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered.
3126 *Yale J Biol Med.* avr 1970;42(5):311-28.
- 3127 184. Lobigs M, Pavy M, Hall R. Cross-protective and infection-enhancing immunity in mice
3128 vaccinated against flaviviruses belonging to the Japanese encephalitis virus serocomplex.
3129 *Vaccine.* 2 avr 2003;21(15):1572-9.
- 3130 185. Halstead SB, Venkateshan CN, Gentry MK, Larsen LK. Heterogeneity of infection
3131 enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *J Immunol Baltim Md* 1950. mars
3132 1984;132(3):1529-32.
- 3133 186. Barrett AD, Gould EA. Antibody-mediated early death in vivo after infection with yellow fever
3134 virus. *J Gen Virol.* nov 1986;67 (Pt 11):2539-42.
- 3135 187. Kreil TR, Eibl MM. Pre- and postexposure protection by passive immunoglobulin but no
3136 enhancement of infection with a flavivirus in a mouse model. *J Virol.* avr 1997;71(4):2921-7.
- 3137 188. Wallace MJ, Smith DW, Broom AK, Mackenzie JS, Hall RA, Shellam GR, et al. Antibody-
3138 dependent enhancement of Murray Valley encephalitis virus virulence in mice. *J Gen Virol.* juill
3139 2003;84(Pt 7):1723-8.
- 3140 189. Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of
3141 dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J*
3142 *Trop Med Hyg.* avr 1989;40(4):444-51.
- 3143 190. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology.* 25 avr
3144 1999;257(1):1-6.
- 3145 191. Weiskopf D, Sette A. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. *Front*
3146 *Immunol.* 2014;5:93.
- 3147 192. Xavier Eurico de Alencar L, de Mendonça Braga-Neto U, José Moura do Nascimento E,
3148 Tenório Cordeiro M, Maria Silva A, Alexandre Antunes de Brito C, et al. HLA-B*44 Is Associated
3149 with Dengue Severity Caused by DENV-3 in a Brazilian Population. *J Trop Med.*
3150 2013;2013:648475.
- 3151 193. Nguyen TH, Lei H-Y, Nguyen TL, Lin Y-S, Huang K-J, Le BL, et al. Dengue hemorrhagic fever in
3152 infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis.* 15 janv 2004;189(2):221-32.
- 3153 194. King NJC, Getts DR, Getts MT, Rana S, Shrestha B, Kesson AM. Immunopathology of flavivirus
3154 infections. *Immunol Cell Biol.* janv 2007;85(1):33-42.

- 3155 195. Sarasombath S, Suvatte V, Homchampa P. Kinetics of lymphocyte subpopulations in dengue
3156 hemorrhagic fever/dengue shock syndrome. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. déc
3157 1988;19(4):649-56.
- 3158 196. Shen J, Devery JM, King NJ. Adherence status regulates the primary cellular activation
3159 responses to the flavivirus West Nile. *Immunology*. févr 1995;84(2):254-64.
- 3160 197. Leis AA, Stokic DS. Neuromuscular manifestations of west nile virus infection. *Front Neurol*.
3161 2012;3:37.
- 3162 198. Liu T, Chambers TJ. Yellow fever virus encephalitis: properties of the brain-associated T-cell
3163 response during virus clearance in normal and gamma interferon-deficient mice and
3164 requirement for CD4+ lymphocytes. *J Virol*. mars 2001;75(5):2107-18.
- 3165 199. Song ATW, Abdala E, de Martino RB, Malbouisson LMS, Tanigawa RY, Andrade GM, et al.
3166 Liver Transplantation for Fulminant Hepatitis Attributed to Yellow Fever. *Hepatology*. mars
3167 2019;69(3):1349-52.
- 3168 200. Chan CYY, Ooi EE. Dengue: an update on treatment options. *Future Microbiol*.
3169 2015;10(12):2017-31.
- 3170 201. García LL, Padilla L, Castaño JC. Inhibitors compounds of the flavivirus replication process.
3171 *Virology*. 15 2017;14(1):95.
- 3172 202. Wang Q-Y, Shi P-Y. Flavivirus Entry Inhibitors. *ACS Infect Dis*. 11 sept 2015;1(9):428-34.
- 3173 203. Padilla-S L, Rodríguez A, Gonzales MM, Gallego-G JC, Castaño-O JC. Inhibitory effects of
3174 curcumin on dengue virus type 2-infected cells in vitro. *Arch Virol*. mars 2014;159(3):573-9.
- 3175 204. Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi E. A review of successful flavivirus vaccines and the
3176 problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine*. 10 mars
3177 2014;32(12):1326-37.
- 3178 205. Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III:
3179 preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine.
3180 *Vaccine*. 23 sept 2011;29(42):7229-41.
- 3181 206. Guy B, Saville M, Lang J. Développement d'un vaccin tétravalent contre la dengue. *Virologie*.
3182 1 sept 2010;14(5):311-21.
- 3183 207. Staples JE, Gershman M, Fischer M, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Yellow
3184 fever vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).
3185 *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep*. 30 juill 2010;59(RR-7):1-27.
- 3186 208. Touret F, Gilles M, Klitting R, Aubry F, de Lamballerie X, Nougairède A. Live Zika virus chimeric
3187 vaccine candidate based on a yellow fever 17-D attenuated backbone. *Emerg Microbes Infect*. 26
3188 sept 2018;7(1):161.
- 3189 209. Kum DB, Mishra N, Boudewijns R, Gladwyn-Ng I, Alfano C, Ma J, et al. A yellow fever-Zika
3190 chimeric virus vaccine candidate protects against Zika infection and congenital malformations in
3191 mice. *NPJ Vaccines*. 2018;3:56.

- 3192 210. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S,
3193 et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in
3194 Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet Lond Engl.* 3 nov
3195 2012;380(9853):1559-67.
- 3196 211. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HIHJM, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al.
3197 Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a
3198 phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 11 oct
3199 2014;384(9951):1358-65.
- 3200 212. Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a
3201 tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med.* 8 janv 2015;372(2):113-23.
- 3202 213. Sridhar S, Luedtke A, Langevin E, Zhu M, Bonaparte M, Machabert T, et al. Effect of Dengue
3203 Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *N Engl J Med.* 26 juill 2018;379(4):327-40.
- 3204 214. Scherwitzl I, Mongkolsapaja J, Screatton G. Recent advances in human flavivirus vaccines. *Curr*
3205 *Opin Virol.* 2017;23:95-101.
- 3206 215. Stenvall A, Larsson E, Strand S-E, Jönsson B-A. A small-scale anatomical dosimetry model of
3207 the liver. *Phys Med Biol.* 7 juill 2014;59(13):3353-71.
- 3208 216. van Grunsven LA. 3D in vitro models of liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 01
3209 2017;121:133-46.
- 3210 217. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell.*
3211 16 févr 2010;18(2):175-89.
- 3212 218. Gissen P, Arias IM. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol.*
3213 oct 2015;63(4):1023-37.
- 3214 219. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, et al. Liver sinusoidal
3215 endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol.* 2017;66(1):212-27.
- 3216 220. Crispe IN. Hepatocytes as Immunological Agents. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 janv
3217 2016;196(1):17-21.
- 3218 221. Lessel CE, Parkes TL, Dickinson J, Merritt TJS. Sex and Genetic Background Influence
3219 Superoxide Dismutase (cSOD)-Related Phenotypic Variation in *Drosophila melanogaster*. *G3*
3220 *Genes Genomes Genet.* 1 août 2017;7(8):2651-64.
- 3221 222. Mauvais-Jarvis F. Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biol Sex*
3222 *Differ* [Internet]. 3 sept 2015 [cité 16 avr 2019];6. Disponible sur:
3223 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4559072/>
- 3224 223. Pradhan AD. Sex differences in the metabolic syndrome: implications for cardiovascular
3225 health in women. *Clin Chem.* janv 2014;60(1):44-52.
- 3226 224. Wolowczuk I, Verwaerde C, Viltart O, Delanoye A, Delacre M, Pot B, et al. Feeding our
3227 immune system: impact on metabolism. *Clin Dev Immunol.* 2008;2008:639803.
- 3228 225. Zmora N, Bashirdes S, Levy M, Elinav E. The Role of the Immune System in Metabolic Health
3229 and Disease. *Cell Metab.* 07 2017;25(3):506-21.

- 3230 226. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase
3231 proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*. nov 2005;6(11):1045-56.
- 3232 227. Gao B, Jeong W-I, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*
3233 *Baltimore*. févr 2008;47(2):729-36.
- 3234 228. Crispe IN. Liver Antigen-Presenting Cells. *J Hepatology*. févr 2011;54(2):357-65.
- 3235 229. Pascussi J-M, Vilarem M-J. Inflammation et métabolisme des médicaments - NF- κ B et les
3236 xénorécepteurs CAR et PXR. *médecine/sciences*. 1 mars 2008;24(3):301-5.
- 3237 230. Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, Saric J, Fabre J-M, Maurel P, et al. Interleukin 1beta
3238 inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance.
3239 *Hepatology* *Baltimore*. oct 2004;40(4):951-60.
- 3240 231. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P, et al.
3241 Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively
3242 activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 11 août
3243 2000;274(3):707-13.
- 3244 232. Gu X, Ke S, Liu D, Sheng T, Thomas PE, Rabson AB, et al. Role of NF-kappaB in regulation of
3245 PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by
3246 proinflammatory agents. *J Biol Chem*. 30 juin 2006;281(26):17882-9.
- 3247 233. Zhou C, Tabb MM, Nelson EL, Grün F, Verma S, Sadatrafiei A, et al. Mutual repression
3248 between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic
3249 metabolism and inflammation. *J Clin Invest*. août 2006;116(8):2280-9.
- 3250 234. Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory
3251 signaling. *J Clin Invest*. 1 mars 2006;116(3):607-14.
- 3252 235. Wang S, Lei T, Zhang K, Zhao W, Fang L, Lai B, et al. Xenobiotic Pregnane X Receptor (PXR)
3253 Regulates Innate Immunity via Activation of NLRP3 Inflammasome in Vascular Endothelial Cells. *J*
3254 *Biol Chem*. 24 oct 2014;289(43):30075-81.
- 3255 236. Samanta J, Sharma V. Dengue and its effects on liver. *World J Clin Cases WJCC*. 16 févr
3256 2015;3(2):125-31.
- 3257 237. Itha S, Kashyap R, Krishnani N, Saraswat VA, Choudhuri G, Aggarwal R. Profile of liver
3258 involvement in dengue virus infection. *Natl Med J India*. juin 2005;18(3):127-30.
- 3259 238. Faridi MMA, Aggarwal A, Kumar M, Sarafrazul A. Clinical and biochemical profile of dengue
3260 haemorrhagic fever in children in Delhi. *Trop Doct*. janv 2008;38(1):28-30.
- 3261 239. Mohan B, Patwari AK, Anand VK. Hepatic dysfunction in childhood dengue infection. *J Trop*
3262 *Pediatr*. 2000;46(1):40-3.
- 3263 240. Huy NT, Van Giang T, Thuy DHD, Kikuchi M, Hien TT, Zamora J, et al. Factors associated with
3264 dengue shock syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*.
3265 2013;7(9):e2412.
- 3266 241. Item 318 : Hépatomégalie et masse abdominale. :21.

- 3267 242. World Health Organization, Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue
3268 and Dengue Haemorrhagic Fever [Internet]. SEARO. [cité 17 avr 2019]. Disponible sur:
3269 http://www.searo.who.int/vector_borne_tropical_diseases/documents/SEAROTPS60/en/
- 3270 243. Parkash O, Almas A, Jafri SW, Hamid S, Akhtar J, Alishah H. Severity of acute hepatitis and its
3271 outcome in patients with dengue fever in a tertiary care hospital Karachi, Pakistan (South Asia).
3272 *BMC Gastroenterol.* 7 mai 2010;10:43.
- 3273 244. Singh S, Meena JK, Verma CR, Bhaskar V. A hospital-based study of hepatic dysfunction in
3274 children with dengue fever. *Asian Pac J Trop Dis.* 1 déc 2015;5(12):964-7.
- 3275 245. Tuboi SH, Costa ZGA, da Costa Vasconcelos PF, Hatch D. Clinical and epidemiological
3276 characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998-2002. *Trans R Soc Trop
3277 Med Hyg.* févr 2007;101(2):169-75.
- 3278 246. Item 275 - Ictère - Fiches item 275 concours ECN - HGE: Hépatogastro-entérologie
3279 [Internet]. StuDocu. [cité 17 avr 2019]. Disponible sur:
3280 <https://www.studocu.com/fr/document/universite-catholique-de-lille/hepatogastro-entérologie/autre/item-275-ictere-fiches-item-275-concours-ecn/2644680/view>
3281
- 3282 247. de Souza LJ, Nogueira RMR, Soares LC, Soares CEC, Ribas BF, Alves FP, et al. The impact of
3283 dengue on liver function as evaluated by aminotransferase levels. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz
3284 Soc Infect Dis.* août 2007;11(4):407-10.
- 3285 248. Tristão-Sá R, Kubelka CF, Zandonade E, Zagne SMO, Rocha N de SM, Zagne LO, et al. Clinical
3286 and hepatic evaluation in adult dengue patients: a prospective two-month cohort study. *Rev Soc
3287 Bras Med Trop.* déc 2012;45(6):675-81.
- 3288 249. Saha AK, Maitra S, Hazra SC. Spectrum of hepatic dysfunction in 2012 dengue epidemic in
3289 Kolkata, West Bengal. *Indian J Gastroenterol Off J Indian Soc Gastroenterol.* nov
3290 2013;32(6):400-3.
- 3291 250. Vazquez-Pichardo M, Rosales-Jimenez C, Rojas-Espinosa O, Lopez-Martinez I. Is Liver Damage
3292 Dependent on the Serotype of Dengue Virus?-A Study in Mexico. déc 2006 [cité 29 avr 2019];
3293 Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/170356>
- 3294 251. Romano APM, Costa ZGA, Ramos DG, Andrade MA, Jayme V de S, Almeida MAB de, et al.
3295 Yellow Fever outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008-2009. *PLoS Negl Trop Dis.* mars
3296 2014;8(3):e2740.
- 3297 252. Nimmanitya S. Dengue Hemorrhagic Fever: Disorders of Hemostasis. 1 janv 1999;
- 3298 253. Srichaikul T, Nimmanitya S, Artchararit N, Siriasawakul T, Sungpeuk P. Fibrinogen
3299 metabolism and disseminated intravascular coagulation in dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop
3300 Med Hyg.* mai 1977;26(3):525-32.
- 3301 254. Mitrakul C. Bleeding problem in dengue haemorrhagic fever: platelets and coagulation
3302 changes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* sept 1987;18(3):407-12.
- 3303 255. Chuang Y-C, Lin Y-S, Liu H-S, Wang J-R, Yeh T-M. Antibodies against thrombin in dengue
3304 patients contain both anti-thrombotic and pro-fibrinolytic activities. *Thromb Haemost.* août
3305 2013;110(2):358-65.

- 3306 256. Nimmagadda SS, Mahabala C, Bolor A, Raghuram PM, Nayak U A. Atypical Manifestations of
3307 Dengue Fever (DF) - Where Do We Stand Today? J Clin Diagn Res JCDR. janv 2014;8(1):71-3.
- 3308 257. Tan S-S, Bujang MA. The clinical features and outcomes of acute liver failure associated with
3309 dengue infection in adults: a case series. Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis. avr
3310 2013;17(2):164-9.
- 3311 258. Hudson NP. The Pathology of Experimental Yellow Fever in the Macacus Rhesus. Am J Pathol.
3312 sept 1928;4(5):419-430.9.
- 3313 259. De Brito T, Siqueira SA, Santos RT, Nassar ES, Coimbra TL, Alves VA. Human fatal yellow fever.
3314 Immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. Pathol Res Pract.
3315 févr 1992;188(1-2):177-81.
- 3316 260. Póvoa TF, Alves AMB, Oliveira CAB, Nuovo GJ, Chagas VLA, Paes MV. The Pathology of Severe
3317 Dengue in Multiple Organs of Human Fatal Cases: Histopathology, Ultrastructure and Virus
3318 Replication. PLoS ONE [Internet]. 15 avr 2014 [cité 17 avr 2019];9(4). Disponible sur:
3319 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3987999/>
- 3320 261. Smith DR, Khakpoor A. Involvement of the liver in dengue infections. 2009;33:12.
- 3321 262. Vieira WT, Gayotto LC, de Lima CP, de Brito T. Histopathology of the human liver in yellow
3322 fever with special emphasis on the diagnostic role of the Councilman body. Histopathology. mars
3323 1983;7(2):195-208.
- 3324 263. Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Takakura C, da Costa Vasconcelos PF, et
3325 al. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow
3326 fever. Acta Trop. mai 2005;94(2):116-27.
- 3327 264. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected
3328 human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. J Infect Dis. 15 avr
3329 2004;189(8):1411-8.
- 3330 265. Quaresma JAS, Barros VLRS, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade HF, Vasconcelos PFC, et al.
3331 Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. Trans R Soc Trop
3332 Med Hyg. févr 2007;101(2):161-8.
- 3333 266. Quaresma JAS, Barros VLRS, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CFH, et al.
3334 Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated
3335 with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. Virology. 5 févr 2006;345(1):22-30.
- 3336 267. Xiao S-Y, Zhang H, Guzman H, Tesh RB. Experimental Yellow Fever Virus Infection in the
3337 Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. J Infect Dis. 2001;183(10):1437-44.
- 3338 268. Tesh RB, Guzman H, da Rosa AP, Vasconcelos PF, Dias LB, Bunnell JE, et al. Experimental
3339 yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic,
3340 biochemical, and immunologic studies. J Infect Dis. 15 mai 2001;183(10):1431-6.
- 3341 269. Leal SG, Romano APM, Monteiro RV, Melo CB de, Vasconcelos PF da C, Castro MB de, et al.
3342 Frequency of histopathological changes in Howler monkeys (*Alouatta* sp.) naturally infected with
3343 yellow fever virus in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. févr 2016;49(1):29-33.

- 3344 270. Quaresma JAS, Pagliari C, Medeiros DBA, Duarte MIS, Vasconcelos PFC. Immunity and
3345 immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the
3346 immunopathology of yellow fever. *Rev Med Virol.* sept 2013;23(5):305-18.
- 3347 271. Bhamarapavati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever:
3348 a study of 100 autopsy cases. *Ann Trop Med Parasitol.* déc 1967;61(4):500-10.
- 3349 272. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver histopathology and
3350 biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch Int*
3351 *J Pathol.* févr 2001;438(2):107-15.
- 3352 273. Sung J-M, Lee C-K, Wu-Hsieh BA. Intrahepatic Infiltrating NK and CD8 T Cells Cause Liver Cell
3353 Death in Different Phases of Dengue Virus Infection. *PLoS ONE* [Internet]. 26 sept 2012 [cité 20
3354 avr 2019];7(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3458800/>
- 3355 274. Chen H-C, Lai S-Y, Sung J-M, Lee S-H, Lin Y-C, Wang W-K, et al. Lymphocyte activation and
3356 hepatic cellular infiltration in immunocompetent mice infected by dengue virus. *J Med Virol.* juill
3357 2004;73(3):419-31.
- 3358 275. Tan GK, Ng JKW, Trasti SL, Schul W, Yip G, Alonso S. A non mouse-adapted dengue virus strain
3359 as a new model of severe dengue infection in AG129 mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 27 avr
3360 2010;4(4):e672.
- 3361 276. Julander JG. Animal models of yellow fever and their application in clinical research. *Curr*
3362 *Opin Virol.* 2016;18:64-9.
- 3363 277. Lefeuvre A. Caractérisation des interactions entre les cellules hépatiques et les souches
3364 sauvage et vaccinale du virus de la fièvre jaune : application à l'étude de virus fièvre jaune
3365 chimériques utilisés pour le développement d'un vaccin contre la dengue [Internet] [thesis]. Lyon
3366 1; 2005 [cité 20 avr 2019]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2005LYO10129>
- 3367 278. Perelygin AA, Scherbik SV, Zhulin IB, Stockman BM, Li Y, Brinton MA. Positional cloning of the
3368 murine flavivirus resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 juill 2002;99(14):9322-7.
- 3369 279. Shellam GR, Sangster MY, Urosevic N. Genetic control of host resistance to flavivirus infection
3370 in animals. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot.* avr 1998;17(1):231-48.
- 3371 280. Lee E, Lobigs M. E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain
3372 enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *J Virol.*
3373 juin 2008;82(12):6024-33.
- 3374 281. Na W, Yeom M, Choi I-K, Yook H, Song D. Animal models for dengue vaccine development
3375 and testing. *Clin Exp Vaccine Res.* juill 2017;6(2):104-10.
- 3376 282. Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao H-M, Duncan A, Villinger F, Ansari AA, et al. Dengue virus-
3377 induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood.* 4 mars 2010;115(9):1823-34.
- 3378 283. Halstead SB, Casals J, Shotwell H, Palumbo N. Studies on the immunization of monkeys
3379 against dengue. I. Protection derived from single and sequential virus infections. *Am J Trop Med*
3380 *Hyg.* mai 1973;22(3):365-74.

- 3381 284. Pamungkas J, Iskandriati D, Saepuloh U, Affandi M, Arifin E, Paramastri Y, et al. Dissemination
3382 in Pigtailed Macaques after Primary Infection of Dengue-3 Virus. *Microbiol Indones.* 1 juin
3383 2011;5:94-88.
- 3384 285. Sariol CA, Muñoz-Jordán JL, Abel K, Rosado LC, Pantoja P, Giavedoni L, et al. Transcriptional
3385 activation of interferon-stimulated genes but not of cytokine genes after primary infection of
3386 rhesus macaques with dengue virus type 1. *Clin Vaccine Immunol CVI.* juin 2007;14(6):756-66.
- 3387 286. Hickey AC, Koster JA, Thalmann CM, Hardcastle K, Tio P-H, Cardoso MJ, et al. Serotype-
3388 Specific Host Responses in Rhesus Macaques after Primary Dengue Challenge. *Am J Trop Med*
3389 *Hyg.* 4 déc 2013;89(6):1043-57.
- 3390 287. Raut CG, Deolankar RP, Kolhapure RM, Goverdhan MK. Susceptibility of laboratory-bred
3391 rodents to the experimental infection with dengue virus type 2. *Acta Virol.* juin 1996;40(3):143-6.
- 3392 288. Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in
3393 response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology.* 20 févr 2004;319(2):262-73.
- 3394 289. Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment
3395 reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 21 janv
3396 2003;35(1):33-42.
- 3397 290. Paes MV, Lenzi HL, Nogueira ACM, Nuovo GJ, Pinhão AT, Mota EM, et al. Hepatic damage
3398 associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Investig J Tech*
3399 *Methods Pathol.* oct 2009;89(10):1140-51.
- 3400 291. Gonçalves D, de Queiroz Prado R, Almeida Xavier E, Cristina de Oliveira N, da Matta Guedes
3401 PM, da Silva JS, et al. Immunocompetent Mice Model for Dengue Virus Infection. *Sci World J*
3402 [Internet]. 15 mai 2012 [cité 22 avr 2019];2012. Disponible sur:
3403 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3362018/>
- 3404 292. França RF de O, Zucoloto S, da Fonseca BAL. A BALB/c mouse model shows that liver
3405 involvement in dengue disease is immune-mediated. *Exp Mol Pathol.* déc 2010;89(3):321-6.
- 3406 293. Paes MV, Pinhão AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC, et al. Liver injury and
3407 viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology.* 1 août 2005;338(2):236-46.
- 3408 294. Guabiraba R, Marques RE, Besnard A-G, Fagundes CT, Souza DG, Ryffel B, et al. Role of the
3409 chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR4 in the pathogenesis of experimental dengue
3410 infection in mice. *PloS One.* 29 déc 2010;5(12):e15680.
- 3411 295. Renneson J, Guabiraba R, Maillet I, Marques RE, Ivanov S, Fontaine J, et al. A detrimental role
3412 for invariant natural killer T cells in the pathogenesis of experimental dengue virus infection. *Am*
3413 *J Pathol.* oct 2011;179(4):1872-83.
- 3414 296. Guabiraba R, Besnard A-G, Marques RE, Maillet I, Fagundes CT, Conceição TM, et al. IL-22
3415 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental
3416 dengue infection. *Eur J Immunol.* juin 2013;43(6):1529-44.
- 3417 297. Bartenschlager R, Pietschmann T. Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a
3418 difference the host cell makes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 juill 2005;102(28):9739-40.

- 3419 298. Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Cell lines: a tool for in vitro drug
3420 metabolism studies. *Curr Drug Metab.* janv 2008;9(1):1-11.
- 3421 299. Marion M-J, Hantz O, Durantel D. The HepaRG cell line: biological properties and relevance as
3422 a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol Clifton NJ.*
3423 2010;640:261-72.
- 3424 300. Hiller T, Berg J, Elomaa L, Röhrs V, Ullah I, Schaar K, et al. Generation of a 3D Liver Model
3425 Comprising Human Extracellular Matrix in an Alginate/Gelatin-Based Bioink by Extrusion
3426 Bioprinting for Infection and Transduction Studies. *Int J Mol Sci.* 12 oct 2018;19(10).
- 3427 301. Desai PK, Tseng H, Souza GR. Assembly of Hepatocyte Spheroids Using Magnetic 3D Cell
3428 Culture for CYP450 Inhibition/Induction. *Int J Mol Sci.* 18 mai 2017;18(5).
- 3429 302. Hengstler JG, Brulport M, Schormann W, Bauer A, Hermes M, Nussler AK, et al. Generation of
3430 human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert Opin Drug*
3431 *Metab Toxicol.* juin 2005;1(1):61-74.
- 3432 303. Gao X, Liu Y. A transcriptomic study suggesting human iPSC-derived hepatocytes potentially
3433 offer a better in vitro model of hepatotoxicity than most hepatoma cell lines. *Cell Biol Toxicol.*
3434 2017;33(4):407-21.
- 3435 304. Schöbel A, Rösch K, Herker E. Functional innate immunity restricts Hepatitis C Virus infection
3436 in induced pluripotent stem cell–derived hepatocytes. *Sci Rep.* 1 mars 2018;8(1):3893.
- 3437 305. Rose KA, Holman NS, Green AM, Andersen ME, LeCluyse EL. Co-culture of Hepatocytes and
3438 Kupffer Cells as an In Vitro Model of Inflammation and Drug-Induced Hepatotoxicity. *J Pharm Sci.*
3439 févr 2016;105(2):950-64.
- 3440 306. Petropolis DB, Faust DM, Tolle M, Rivière L, Valentin T, Neuveut C, et al. Human Liver
3441 Infection in a Dish: Easy-To-Build 3D Liver Models for Studying Microbial Infection. *PLoS One.*
3442 2016;11(2):e0148667.
- 3443 307. Petropolis DB, Faust DM, Deep Jhingan G, Guillen N. A new human 3D-liver model unravels
3444 the role of galectins in liver infection by the parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* sept
3445 2014;10(9):e1004381.
- 3446 308. Ramaiahgari SC, Waidyanatha S, Dixon D, DeVito MJ, Paules RS, Ferguson SS. Three-
3447 Dimensional (3D) HepaRG Spheroid Model With Physiologically Relevant Xenobiotic Metabolism
3448 Competence and Hepatocyte Functionality for Liver Toxicity Screening. *Toxicol Sci Off J Soc*
3449 *Toxicol.* 01 2017;160(1):189-90.
- 3450 309. Bell CC, Hendriks DFG, Moro SML, Ellis E, Walsh J, Renblom A, et al. Characterization of
3451 primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver
3452 function and disease. *Sci Rep.* 04 2016;6:25187.
- 3453 310. Foty R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J Vis Exp*
3454 *JoVE [Internet].* 6 mai 2011 [cité 16 avr 2019];(51). Disponible sur:
3455 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3197119/>
- 3456 311. Massé-Deragon N. Dynamique des réponses immunitaires humaines dans un modèle 3D de
3457 foie : un autre regard sur la pathogénèse hépatique du virus de la fièvre jaune [Internet]

- 3458 [phdthesis]. Université de Lyon; 2016 [cité 16 avr 2019]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01664950/document>
3459
- 3460 312. Ortega-Prieto AM, Skelton JK, Wai SN, Large E, Lussignol M, Vizcay-Barrena G, et al. 3D
3461 microfluidic liver cultures as a physiological preclinical tool for hepatitis B virus infection. *Nat*
3462 *Commun.* 14 févr 2018;9(1):682.
- 3463 313. Lang J, Vera D, Cheng Y, Tang H. Modeling Dengue Virus-Hepatic Cell Interactions Using
3464 Human Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocyte-like Cells. *Stem Cell Rep.* 13 2016;7(3):341-54.
- 3465 314. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes
3466 with dengue virus serotype 2. *J Med Virol.* mars 2007;79(3):300-7.
- 3467 315. Thepparit C, Phoolcharoen W, Suksanpaisan L, Smith DR. Internalization and propagation of
3468 the dengue virus in human hepatoma (HepG2) cells. *Intervirology.* 2004;47(2):78-86.
- 3469 316. Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification
3470 of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1
3471 receptor. *J Virol.* nov 2004;78(22):12647-56.
- 3472 317. Pattanakitsakul S-N, Rungrojcharoenkit K, Kanlaya R, Sinchaikul S, Noisakran S, Chen S-T, et
3473 al. Proteomic analysis of host responses in HepG2 cells during dengue virus infection. *J Proteome*
3474 *Res.* déc 2007;6(12):4592-600.
- 3475 318. Conceição TM, El-Bacha T, Villas-Bôas CSA, Coello G, Ramírez J, Montero-Lomeli M, et al.
3476 Gene expression analysis during dengue virus infection in HepG2 cells reveals virus control of
3477 innate immune response. *J Infect.* janv 2010;60(1):65-75.
- 3478 319. Brandler S, Brown N, Ermak TH, Mitchell F, Parsons M, Zhang Z, et al. Replication of chimeric
3479 yellow fever virus-dengue serotype 1-4 virus vaccine strains in dendritic and hepatic cells. *Am J*
3480 *Trop Med Hyg.* janv 2005;72(1):74-81.
- 3481 320. Lefeuvre A, Contamin H, Decelle T, Fournier C, Lang J, Deubel V, et al. Host-cell interaction of
3482 attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of
3483 hepatocyte infection. *Microbes Infect.* mai 2006;8(6):1530-8.
- 3484 321. Woodson SE, Holbrook MR. Infection of hepatocytes with 17-D vaccine-strain yellow fever
3485 virus induces a strong pro-inflammatory host response. *J Gen Virol.* oct 2011;92(Pt 10):2262-71.
- 3486 322. Marianneau P, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Kirn A, Deubel V. Differing infection patterns
3487 of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line. *J Infect Dis.* nov
3488 1998;178(5):1270-8.
- 3489 323. Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR. Differential cytokine responses from primary human
3490 Kupffer cells following infection with wild-type or vaccine strain yellow fever virus. *Virology.* 30
3491 mars 2011;412(1):188-95.
- 3492 324. Marianneau P, Cardona A, Edelman L, Deubel V, Desprès P. Dengue virus replication in
3493 human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J Virol.*
3494 avr 1997;71(4):3244-9.

- 3495 325. Thepparit C, Khakpoor A, Khongwichit S, Wikan N, Fongsaran C, Chingsuwanrote P, et al.
3496 Dengue 2 infection of HepG2 liver cells results in endoplasmic reticulum stress and induction of
3497 multiple pathways of cell death. *BMC Res Notes*. 14 sept 2013;6:372.
- 3498 326. Sessions OM, Tan Y, Goh KC, Liu Y, Tan P, Rozen S, et al. Host Cell Transcriptome Profile
3499 during Wild-Type and Attenuated Dengue Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 14 mars
3500 2013 [cité 22 avr 2019];7(3). Disponible sur:
3501 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3597485/>
- 3502 327. Charretier C, Saulnier A, Benair L, Armanet C, Bassard I, Daulon S, et al. Robust real-time cell
3503 analysis method for determining viral infectious titers during development of a viral vaccine
3504 production process. *J Virol Methods*. 2018;252:57-64.
- 3505 328. Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, et al. Standardized
3506 quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue
3507 vaccines. *J Virol Methods*. juill 2008;151(1):40-6.
- 3508 329. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative
3509 PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods San Diego Calif*. déc 2001;25(4):402-8.
- 3510 330. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-
3511 seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
- 3512 331. Zhu A, Ibrahim JG, Love MI. Heavy-tailed prior distributions for sequence count data:
3513 removing the noise and preserving large differences. *Bioinforma Oxf Engl*. 3 nov 2018;
- 3514 332. Belouzard S, Danneels A, Fénéant L, Séron K, Rouillé Y, Dubuisson J. Entry and Release of
3515 Hepatitis C Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J Virol*. 15 sept 2017;91(18):e00478-17.
- 3516 333. Messner S, Fredriksson L, Lauschke VM, Roessger K, Escher C, Bober M, et al. Transcriptomic,
3517 Proteomic, and Functional Long-Term Characterization of Multicellular Three-Dimensional
3518 Human Liver Microtissues. *Appl Vitro Toxicol*. 14 nov 2017;4(1):1-12.
- 3519 334. Vorrink SU, Ullah S, Schmidt S, Nandania J, Velagapudi V, Beck O, et al. Endogenous and
3520 xenobiotic metabolic stability of primary human hepatocytes in long-term 3D spheroid cultures
3521 revealed by a combination of targeted and untargeted metabolomics. *FASEB J Off Publ Fed Am
3522 Soc Exp Biol*. 2017;31(6):2696-708.
- 3523 335. Subramanian K, Owens DJ, Raju R, Firpo M, O'Brien TD, Verfaillie CM, et al. Spheroid Culture
3524 for Enhanced Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Hepatocyte-Like Cells. *Stem
3525 Cells Dev*. 15 janv 2014;23(2):124-31.
- 3526 336. Asthana A, Kisaalita WS. Microtissue size and hypoxia in HTS with 3D cultures. *Drug Discov
3527 Today*. août 2012;17(15-16):810-7.
- 3528 337. Ananthanarayanan A, Nugraha B, Triyatni M, Hart S, Sankuratri S, Yu H. Scalable spheroid
3529 model of human hepatocytes for hepatitis C infection and replication. *Mol Pharm*. 7 juill
3530 2014;11(7):2106-14.
- 3531 338. Chong TW, Smith RL, Hughes MG, Camden J, Rudy CK, Evans HL, et al. Primary human
3532 hepatocytes in spheroid formation to study hepatitis C infection. *J Surg Res*. janv
3533 2006;130(1):52-7.

- 3534 339. Lin Y-L, Lei H-Y, Lin Y-S, Yeh T-M, Chen S-H, Liu H-S. Heparin inhibits dengue-2 virus infection
3535 of five human liver cell lines. *Antiviral Res.* oct 2002;56(1):93-6.
- 3536 340. Park S-J, Kumar M, Kwon H, Seong R-K, Han K, Song J, et al. Dynamic changes in host gene
3537 expression associated with H5N8 avian influenza virus infection in mice. *Sci Rep.* 18 nov
3538 2015;5:16512.
- 3539 341. Walters K-A, Syder AJ, Lederer SL, Diamond DL, Paepfer B, Rice CM, et al. Genomic analysis
3540 reveals a potential role for cell cycle perturbation in HCV-mediated apoptosis of cultured
3541 hepatocytes. *PLoS Pathog.* janv 2009;5(1):e1000269.
- 3542 342. Yoksan S, Rabablert J, Chaiyo K, Rajchakam S, Tiewcharoen S, Rabablert N, et al. Cytokine
3543 gene expression in human hepatocytes infected with dengue virus serotype 3 (strain-16562).
3544 *Health (N Y).* 1 janv 2013;05:1516-25.
- 3545 343. Nasirudeen AMA, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam K-P, Liu DX. RIG-I, MDA5 and TLR3
3546 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.*
3547 4 janv 2011;5(1):e926.
- 3548 344. Sprokholt JK, Kaptein TM, van Hamme JL, Overmars RJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH. RIG-I-
3549 like Receptor Triggering by Dengue Virus Drives Dendritic Cell Immune Activation and TH1
3550 Differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 2017;198(12):4764-71.
- 3551 345. Chazal M, Beauclair G, Gracias S, Najburg V, Simon-Lorière E, Tangy F, et al. RIG-I Recognizes
3552 the 5' Region of Dengue and Zika Virus Genomes. *Cell Rep.* 10 juill 2018;24(2):320-8.
- 3553 346. Bruni D, Chazal M, Sinigaglia L, Chauveau L, Schwartz O, Desprès P, et al. Viral entry route
3554 determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci Signal.* 3
3555 mars 2015;8(366):ra25.
- 3556 347. Okabayashi T, Kojima T, Masaki T, Yokota S, Imaizumi T, Tsutsumi H, et al. Type-III interferon,
3557 not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells.
3558 *Virus Res.* 1 sept 2011;160(1):360-6.
- 3559 348. Long X, Li Y, Qi Y, Xu J, Wang Z, Zhang X, et al. XAF1 contributes to dengue virus-induced
3560 apoptosis in vascular endothelial cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* mars
3561 2013;27(3):1062-73.
- 3562 349. Masse-Deragon N. Dynamique des réponses immunitaires humaines dans un modèle 3D de
3563 foie: un autre regard sur la pathogénèse hépatique du virus de la fièvre jaune. :260.
- 3564 350. Pan W, Zuo X, Feng T, Shi X, Dai J. Guanylate-binding protein 1 participates in cellular antiviral
3565 response to dengue virus. *Virol J.* 27 nov 2012;9:292.
- 3566 351. Tolfvenstam T, Lindblom A, Schreiber MJ, Ling L, Chow A, Ooi EE, et al. Characterization of
3567 early host responses in adults with dengue disease. *BMC Infect Dis.* 2 août 2011;11:209.
- 3568 352. Dalrymple NA, Mackow ER. Endothelial cells elicit immune-enhancing responses to dengue
3569 virus infection. *J Virol.* juin 2012;86(12):6408-15.
- 3570 353. Mazumdar B, Kim H, Meyer K, Bose SK, Di Bisceglie AM, Ray RB, et al. Hepatitis C Virus
3571 Proteins Inhibit C3 Complement Production. *J Virol.* févr 2012;86(4):2221-8.

- 3572 354. Kim H, Meyer K, Di Bisceglie AM, Ray R. Hepatitis C virus suppresses C9 complement
3573 synthesis and impairs membrane attack complex function. *J Virol.* mai 2013;87(10):5858-67.
- 3574 355. Marianneau P, Mégret F, Olivier R, Morens DM, Deubel V. Dengue 1 virus binding to human
3575 hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J Gen Virol.* oct 1996;77 (Pt 10):2547-54.
- 3576 356. Piccini LE, Castilla V, Damonte EB. Dengue-3 Virus Entry into Vero Cells: Role of Clathrin-
3577 Mediated Endocytosis in the Outcome of Infection. *PLOS ONE.* 15 oct 2015;10(10):e0140824.
- 3578 357. Bielefeldt-Ohmann H, Meyer M, Fitzpatrick DR, Mackenzie JS. Dengue virus binding to human
3579 leukocyte cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res.* janv
3580 2001;73(1):81-9.
- 3581 358. Zanini F, Pu S-Y, Bekerman E, Einav S, Quake SR. Single-cell transcriptional dynamics of
3582 flavivirus infection. *eLife.* 16 2018;7.
- 3583 359. Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, et al. The TIM and
3584 TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe.*
3585 18 oct 2012;12(4):544-57.
- 3586 360. Gaskell H, Sharma P, Colley HE, Murdoch C, Williams DP, Webb SD. Characterization of a
3587 functional C3A liver spheroid model †Electronic supplementary information (ESI) available. See
3588 DOI: 10.1039/c6tx00101g. *Toxicol Res.* 27 avr 2016;5(4):1053-65.
- 3589 361. Kyffin JA, Sharma P, Leedale J, Colley HE, Murdoch C, Harding AL, et al. Characterisation of a
3590 functional rat hepatocyte spheroid model. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* mars
3591 2019;55:160-72.

3592 **Résumé :** Les formes sévères de l'infection par les virus de la fièvre jaune (YFV) et de la
3593 dengue (DENV) sont caractérisées par une atteinte du foie, plus sévère lors d'une infection
3594 YFV. L'objectif de cette thèse est de comparer les infections de YFV et DENV dans un
3595 modèle d'hépatocytes humains dérivés de cellules souches (iHeps) afin d'identifier des
3596 facteurs à l'origine de cette différence de pathogénèse.

3597 Dans un premier temps, nous avons comparé le tropisme de YFV aux 4 sérotypes de DENV
3598 dans notre modèle hépatique établi en monocouche cellulaire. Nous avons observé une faible
3599 propagation de DENV dans les iHeps par rapport YFV. Les mêmes observations ont été faites
3600 dans des hépatocytes primaires. L'utilisation de souches chimériques 17D/DENV a permis de
3601 mettre en évidence que cette faible propagation serait liée à une faible efficacité d'entrée de
3602 DENV dans les hépatocytes. Nous avons également étudié l'infection dans des sphéroïdes
3603 iHeps, métaboliquement plus actifs que les iHeps 2D. Une infection productive a été observée
3604 uniquement avec YFV. Ce résultat pourrait s'expliquer par la faible accessibilité des cellules à
3605 l'intérieur des sphéroïdes.

3606 Dans un 2ème temps, nous avons étudié les réponses cellulaires induites dans les iHeps 2D
3607 après infection par les différents virus en utilisant une approche RNAseq. Les résultats
3608 préliminaires suggèrent un lien entre le taux de réplication et le nombre de gènes activés. La
3609 réponse interféron est plus précocement détectée dans le cas de YFV, mais l'infection par
3610 DENV induit un plus grand nombre de gènes. De plus, DENV-1 et DENV-4 induisent une
3611 augmentation d'expression de certains gènes impliqués dans la présentation d'antigène
3612 comme HLA-E et TAP-2, alors que YFV diminue l'expression de certains gènes de
3613 chimiokines et molécules d'adhésion. L'analyse préliminaire des voies liées au métabolisme
3614 hépatique révèle une inhibition de la voie de la coagulation dans le cas de l'infection par
3615 YFV, qui n'est pas observée lors de l'infection par DENV. Des observations similaires ont été
3616 décrites in vivo, au niveau protéique, confirmant la pertinence du modèle iHeps.

3617

3618

3619

3620 **Abstract:** Severe forms of infection with yellow fever virus (YFV) and dengue virus (DENV)
3621 are characterized by liver damage, with more severe symptoms observed during YFV
3622 infection. The aim of this thesis is to compare YFV and DENV infections in a model of
3623 human hepatocytes derived from stem cells (iHeps) in order to identify factors that could
3624 explain their difference in pathogenesis.

3625 First, we compared YFV tropism to the four DENV serotypes in 2D iHeps. We observed a
3626 low spread of DENV compared to YFV in both iHeps and primary hepatocytes. By using
3627 chimeric 17D/DENV strains, we demonstrate that this low propagation is linked to a low
3628 DENV entry efficiency in hepatocytes. We also studied infection in iHeps spheroids,
3629 metabolically closer to primary cells than 2D iHeps. A productive infection was observed
3630 with YFV only. The low accessibility of cells inside the spheroids could explained this result.

3631 Second, we studied cellular responses induced following infection by different viruses in 2D
3632 iHeps using an RNAseq approach. Preliminary results suggest a link between replication rate
3633 and the number of activated genes. The interferon response is detected earlier following YFV
3634 infection, but DENV induces a greater number of genes implicated in this pathway.
3635 Moreover, DENV-1 and DENV-4 up-regulate some genes involved in antigen presentation
3636 such as HLA-E and TAP-2, while YFV down-regulates genes encoding chemokines and
3637 adhesion molecules. Preliminary analysis of hepatic metabolism pathways reveals inhibition
3638 of the coagulation pathway induced by YFV infection, which is not observed during DENV
3639 infection. Similar observations have been described in vivo, at the protein level, confirming
3640 the relevance of the iHeps model.

3641