



HAL
open science

Etude des déterminants de la dissémination du virus de la fièvre jaune dans son vecteur *Aedes aegypti*

Lucie Danet

► **To cite this version:**

Lucie Danet. Etude des déterminants de la dissémination du virus de la fièvre jaune dans son vecteur *Aedes aegypti*. Virologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019USPCC096 . tel-03073800

HAL Id: tel-03073800

<https://theses.hal.science/tel-03073800v1>

Submitted on 16 Dec 2020

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

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

Thèse de doctorat
de l'Université Sorbonne Paris Cité
Préparée à l'Université Paris Diderot
Ecole Doctorale n°562 Bio Sorbonne Paris Cité

*Institut Pasteur de Paris, Unité de Génomique Virale et Vaccination,
Équipe Pathogène des Flavivirus*

Étude des déterminants de la dissémination
du virus de la fièvre jaune dans son vecteur
Aedes aegypti

Par Lucie DANET

Thèse de doctorat de Virologie

Dirigée par le Dr Nolwenn JOUVENET

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 29 janvier 2019

Président du jury: Professeur Pierre-Emmanuel CECCALDI, Université Paris Diderot
Rapporteurs: Professeur Alain KOHL, Center for Virus Research of Glasgow
Professeur Dimitri LAVILLETTE, Institut Pasteur de Shanghai
Examineurs: Docteur Dorothee MISSÉ, IRD Montpellier
Docteur Valérie CHOUMET, Institut Pasteur de Paris
Directeur de thèse: Docteur Nolwenn JOUVENET, Institut Pasteur Paris
Membre invité: Docteur Frédéric TANGY, Institut Pasteur de Paris

Résumés

Titre : Étude des déterminants de la dissémination du virus de la fièvre jaune dans son vecteur *Aedes aegypti*

Résumé : De nombreuses arboviroses ont émergé ou ré-émergé dans les dernières décennies. L'approfondissement des connaissances des mécanismes de transmission de ces virus par leurs vecteurs est nécessaire pour le développement de nouveaux outils de prévention et de défense. Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié la réplication et la dissémination de deux souches du virus de la fièvre jaune (YFV) chez le moustique *Aedes aegypti*. Nous avons montré que la réplication de la souche vaccinale YFV-17D n'était pas efficace dans l'intestin moyen, par rapport à celle de l'isolat clinique YFV-Dakar. Les virus qui ont réussi à surmonter la barrière d'infection de l'intestin moyen ne se propagent pas aux organes secondaires. Les virus injectés dans le thorax des moustiques se répliquent dans les organes secondaires et les tissus associés à l'intestin moyen, ce qui suggère que, pendant l'infection naturelle, le blocage de la réplication du virus YFV-17D se produit au niveau de la membrane basale des cellules épithéliales de l'intestin moyen. L'analyse par séquençage de nouvelle génération a révélé que le génome de la souche YFV-Dakar présentait une diversité plus grande que celle de la souche vaccinale; un trait qui pourrait contribuer à sa capacité à infecter et à se disséminer efficacement dans le vecteur. Dans une deuxième partie, nous avons analysé les réponses de l'intestin moyen aux infections par YFV-17D et YFV-Dakar par des techniques de transcriptomique et de protéomique, dans le but d'identifier des éléments cellulaires impliqués dans la réponse différentielle aux deux virus. Seize candidats ont été choisis pour une analyse approfondie dans des cellules d'*Ae. aegypti*. Malheureusement, aucun de ces candidats ne semblent affecter la réplication virale. Nous pensons que le très faible taux d'infection des cellules de l'intestin moyen ne nous a pas permis d'identifier de candidats potentiels.

Mots clefs : virus, fièvre jaune, arbovirus, vecteur, *Aedes aegypti*, dissémination, barrière intestinale, transcriptomique, protéomique

Title: A study of yellow fever virus dissemination mechanisms in its vector *Aedes aegypti*

Abstract: Recent decades have seen emergence or re-emergence of many arboviral diseases. Increasing the knowledge underlying the mechanisms of transmission of these viruses by their vectors is necessary for the development of new tools for prevention and defense. In the first part of this work, we explored the replication and the dissemination of two strains of yellow fever virus (YFV) in *Aedes aegypti*. We showed that the replication of the vaccine strain YFV-17D was not efficient in *Aedes aegypti* midgut, as compared to the one of the clinical isolate YFV-Dakar. Viruses that managed to overcome the midgut infection barrier failed to disseminate to secondary organs. Viruses injected into the mosquitoes's thorax succeeded in replicating into secondary organs and midgut associated tissues, suggesting that, during natural infection, the block for YFV-17D replication occurs at the basal membrane of midgut epithelial cells. Next Generation Sequencing analysis revealed that YFV-Dakar genome exhibited a greater diversity than the one of the vaccine strain; a trait that may contribute to its ability to infect and disseminate efficiently in *Ae. aegypti*. In the second part, we analyzed the midgut responses to YFV-17D and YFV-Dakar infection using both RNA-Seq and proteomics approaches. The aim was to identify cellular components involved in the differential response to both viruses. Sixteen candidates were chosen for an in-depth analysis in *Ae. aegypti* cells. Unfortunately, none of these candidates seemed to affect viral replication. We believe that the low infection rate of the midgut cells did not allow us to identify potential candidates.

Keywords: virus, yellow fever, arbovirus, vector, *Aedes aegypti*, dissemination, midgut barrier, RNA-Seq, proteomics

À Vicky et Brenda,

Remerciements

Je remercie l'ensemble de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche :

Monsieur le Professeur Pierre-Emmanuel CECCALDI, Professeur à l'Université Paris Diderot.

Monsieur le Professeur Alain KOHL, Professeur au Center for Virus Research de Glasgow.

Monsieur le Professeur Dimitri LAVILLETTE, Professeur à l'Institut Pasteur de Shanghai.

Madame le Docteur Dorothée MISSÉ, Directeur de Recherche à l'Institut de Recherche pour le Développement de Montpellier.

Un grand et sincère merci à ma directrice de thèse, Madame le Docteur Nolwenn JOUVENET, pour m'avoir proposé ce sujet passionnant et m'avoir encadrée et soutenue pendant ces quatre dernières années. Merci pour ton aide précieuse, ta disponibilité et ton optimisme contagieux.

Je remercie également Madame le Docteur Valérie CHOUMET, pour avoir accepté d'apporter à ce projet son expertise en entomologie.

Merci à mon tuteur de Pasteur, le Docteur Rogerio AMINO, pour avoir pris le temps de me rencontrer et pour les discussions fructueuses qui sont sorties de ces rendez-vous.

Je remercie également les Docteurs Louis LAMBRECHTS et Sarah MERKLING pour leurs conseils avisés et leurs encouragements. Merci pour leurs conseils techniques et leur disponibilité à Christian MITRI, Gonzalo MORATORIO ainsi qu'aux membres de la plateforme Protéomique de Pasteur, Mariette MATONDO, Thibaut DOUCHÉ et Quentin GIAI-GIANETTO et aux membres de la plateforme de séquençage Transcriptome et Épigénome, Jean-Yves COPPÉE, Odile SISMEIRO, Rachel LEGENDRE et Hugo VARET.

Merci à Michèle BERTHET, pour son aide précieuse pour l'élevage et les expériences sur les moustiques. Merci à Guillaume BEAUCLAIR, qui m'a apporté ses lumières en bioinformatique, à Anaïs HERVÉ et Ségolène GRACIAS qui m'ont bien aidée pour certaines parties de mon projet.

Merci à Monsieur le Docteur Frédéric TANGY, Directeur de l'Unité de Génomique Virale et Vaccination pour m'avoir accueillie au sein de son unité. Merci également à tous les membres de l'unité G2V et tout particulièrement à l'équipe de Nolwenn JOUVENET, mes « collègues et néanmoins amis » : Dada, Max, Evgeniya, Laura, Ségo, Guigui, Sarah, Flo mais aussi Salomé, Anaïs et Felix. Merci d'abord de m'avoir formée à toutes les techniques utilisées au labo, merci pour toutes les discussions de science, les échanges de points de vue sur les dilemmes de vie de labo. Merci pour toutes les autres discussions non-scientifiques mais pas moins intéressantes, cela fait de nombreux souvenirs, de nombreuses chansons qui restent en tête, des tas d'expressions que j'ai volées à chacun de vous. C'est en travaillant avec ce genre d'équipe formidable qu'on est content d'arriver au labo le matin.

Je n'oublie pas tous les professeurs qui ont pu m'inspirer et me donner le goût de continuer dans la Biologie, Monsieur Fogelgesang et Mme de Pazzis en prépa, mais aussi ceux qui m'ont tant apporté pendant les années passées à l'ENS de Cachan, Pascale Rialland, Valérie Péris-Delacroix, Emilie Guillaume, Uriel Hazan et Gérard Peyroche.

Cette thèse ne s'est pas faite sans un solide environnement extra-professionnel, tantôt coach, tantôt souffle de changement. Je remercie de tout cœur ma famille, soutien inconditionnel depuis le tout début. Merci à tous mes amis, mes amis d'enfance de Guidel et des alentours, mes collègues de prépa, les membres de la Makiavé[ist] et autres personnes formidables rencontrées pendant les années à l'ENS, ceux rencontrés aux détours des stages en laboratoire, tous les colocataires de la Bikok et du FatFlat, aux copains spéléos d'Abimes, aux copains du boulevard de Charonne, la team du M2 de Viro, valeureux compères de thèse et tous les copains des bâtiments Darré et Borrel. Merci à Léo.

Merci enfin à tous ceux et celles qui ont fait les curieux, et m'auront fait parler de mon sujet de thèse, me forçant à prendre du recul et sortir la tête du guidon pour se recentrer sur les questions fondamentales et passionnantes qui ont données lieu à ce projet.

Table des matières

Abréviations	1
Introduction	3
1 Arboviroses et leurs vecteurs, problème de santé mondial	3
1.1 Les moustiques, vecteurs de maladies de plus en plus importantes mondialement.....	3
1.2 Mondialisation	6
1.3 Lutte anti-vectorielle	9
2 Le franchissement de la barrière intestinale, une étape majeure dans la transmission virale par le vecteur	15
2.1 Le moustique, vecteur biologique.....	15
2.2 Mécanismes de réponse à l'infection virale.....	19
2.3 Passage de la barrière intestinale par les virus	28
3 YFV, un modèle de franchissement de la barrière intestinale	33
3.1 La fièvre jaune	33
3.2 Biologie moléculaire et cellulaire du virus de la fièvre jaune.....	41
3.3 Transmission des souches vaccinale et clinique par le moustique <i>Aedes aegypti</i>	48
Objectifs du projet de recherche	55
Matériels et Méthodes	57
1 Biologie cellulaire.....	57
1.1 Cellules	57
1.2 Virus	57
1.3 Infection	58
1.4 Transfection	58
1.5 Cytométrie en flux.....	59
2 Biologie moléculaire.....	59
2.1 Analyse de l'expression des gènes	59
2.2 Analyse des protéines, Western Blot	60
2.3 Synthèse des ARN double-brin.....	61
3 Méthodes spécifiques aux moustiques.....	63
3.1 Élevage des moustiques	63
3.2 Gorgement des moustiques	64
3.3 Injection dans le thorax des moustiques.....	64
3.4 Dissection des moustiques	66
3.5 Immunofluorescence sur intestin moyen de moustique	66
3.6 DotBlot sur intestin moyen de moustique	66
4 Analyses à haut-débit.....	67
4.1 Séquençage des virus	67

4.2	Analyse des échantillons d'intestin moyen de moustique par Spectrométrie de Masse	69
4.3	Analyse des intestins moyens de moustique par transcriptomique	70
Résultats Axe 1 : Restriction de la souche vaccinale du virus de la fièvre jaune dans l'intestin moyen du moustique par les barrières d'infection et d'échappement		73
1	La souche YFV-Dakar, mais pas la souche YFV-17D, est capable de franchir la barrière de l'intestin moyen d' <i>Ae. aegypti</i> pour se disséminer	73
1.1	Caractérisation de la dissémination par titration en plage de lyse	73
1.2	Caractérisation de la dissémination par RT-qPCR	75
1.3	Evaluation des taux d'infection, dissémination et transmission	76
1.4	Détection des protéines virales par Western-Blot	77
1.5	Détection des foyers d'infection par immunofluorescence	79
2	Les souches YFV-17D et YFV-Dakar se répliquent efficacement dans les intestins moyens d' <i>Ae. aegypti</i> lorsque les virus sont injectés dans le thorax.....	81
3	Comparaison de la diversité des deux souches virales	83
Résultats Axe 2: La réponse de l'intestin moyen à l'infection analysée par techniques à haut débit		87
1	Mise en place de l'étude	87
2	Etude transcriptomique	90
2.1	Rapport sur la production des données	90
2.2	Analyse des données	93
3	Etude protéomique (1).....	97
4	Etude protéomique (2).....	98
4.1	Analyse des données	98
4.2	Validation fonctionnelle des candidats	104
4.3	Protéine VPS16 et cycle viral de YFV-Dakar	116
Discussion		121
1	Restriction du virus de la fièvre jaune dans l'intestin moyen du moustique par deux barrières : barrière d'infection et d'échappement.	121
1.1	Utilisation de récepteurs différents entre YFV-Dakar et YFV-17D	121
1.2	Échappement au système immunitaire du moustique	123
2	Analyse à haut débit de la réponse de l'intestin moyen à l'infection par YFV	124
2.1	Profil d'infection de YFV-17D hétérogène dans l'intestin moyen	124
2.2	Signal d'infection noyé dans les signaux non infectés des cellules de l'intestin moyen pour les études de transcriptomique et de protéomique	126
2.3	Analyse de protéomique	128
2.4	Validation des candidats dans le modèle cellulaire Aag2	130
Annexes		135
Bibliographie		147

Table des illustrations

Introduction :

Figure 1: Répartition de <i>Ae. aegypti</i> et <i>Ae. albopictus</i>	7
Figure 2: Cas importés de YFV à travers le monde. Source : (Barrett, 2018).	8
Figure 3: Etapes de la transmission d'un arbovirus par le vecteur moustique.	18
Figure 4: Les principales voies de signalisation du système immunitaire chez <i>Aedes aegypti</i>	21
Figure 5: Les trois principales voies de l'ARN interférence. Source : (Lucas et al., 2013)	24
Figure 6: Passage du virus chikungunya par la lame basale étirée lors du repas sanguin et infection subséquente des cellules musculaires.	32
Figure 7: Principaux contributeurs à la découverte du mode de transmission de la fièvre jaune.....	35
Figure 8: La fièvre jaune pendant la construction du canal de Panama.	36
Figure 9: Historique simplifié des passages des vaccins YFV-17D et YFV-17DD.....	39
Figure 10: Régions endémiques de YFV et distribution des principales épidémies depuis 1950.	40
Figure 11: structure de la particule virale de YFV.	41
Figure 12: Structure génomique de YFV.	42
Figure 13: Relations phylogénétiques entre les souches de YFV.	43
Figure 14: Cycle viral des <i>Flavivirus</i>	45
Figure 15: Maturation des particules de <i>Flavivirus</i>	47
Figure 16: Cycles de transmission de YFV.	49
Figure 17: Principaux vecteurs de YFV.	49

Tableau 1: Familles virales constituant les arbovirus et leurs caractéristiques.	4
---	---

Tableau 2: Facteurs de transcription de type NF- κ B impliqués dans la transduction du signal suite à l'activation de la voie Toll et leurs inhibiteurs, dans différents organismes.....	20
---	----

Matériels et Méthodes:

Figure 18: Elevage des moustiques.	63
Figure 19: Gorgement des moustiques <i>Aedes aegypti</i>	65
Figure 20: le site d'injection	65
Figure 21: organisation du génome de YFV et localisation et taille des 3 fragments amplifiés utilisés pour le séquençage.	67
Figure 22: principe de la librairie directionnelle	71

Résultats Axe 1:

Figure 23: La souche YFV-Dakar, mais pas la souche YFV-17D, est capable de franchir la barrière de l'intestin moyen d' <i>Ae. aegypti</i> pour se disséminer.	74
Figure 24: Taux d'infection, de dissémination et de transmission du virus YFV dans son vecteur <i>Aedes aegypti</i>	76
Figure 25: Les protéines virales E et NS1 sont détectées dans les intestins moyens infectés par YFV-Dakar pendant 7 jours.	78
Figure 26: Reconnaissance des protéines virales E, NS1 et NS4B dans les cellules Aag2.	78
Figure 27: La réplication du YFV-17D dans les intestins est localisée dans une zone confinée.	80
Figure 28: Les souches YFV-17D et YFV-Dakar se répliquent dans tous les organes secondaires et même les tissus de l'intestin lorsqu'ils sont injectés dans le thorax.	82
Figure 29: Séquençage des souches YFV-17D et YFV-Dakar et analyse de la diversité des génomes.	84

Tableau 3: Comparaison de la diversité entre les génomes et pour chaque gène.	85
--	----

Résultats Axe 2:

Figure 30: Détection de la réplication virale dans les deux moitiés d'intestin moyen par deux méthodes : DotBlot et RT-qPCR.	89
Figure 31: Méthode de récolte et préparation des échantillons pour les analyses de transcriptomique et protéomique.	90
Figure 32: Qualité des échantillons d'ARN	91

Figure 33: Densité de clusters détectés dans chaque canal.....	91
Figure 34: Qualité des librairies	91
Figure 35: Dendrogramme regroupant les échantillons selon la distance euclidienne qui les sépare.....	93
Figure 36: Analyse par composantes principales.....	94
Figure 37: nombre de peptides viraux détectés dans chaque échantillon.....	97
Figure 38: Diagrammes de Ven représentant le nombre de protéines identifiées dans chaque échantillon.....	99
Figure 39: Dendrogramme regroupant les échantillons selon la distance euclidienne qui les sépare.....	100
Figure 40: Matrice de corrélation décrivant le taux de ressemblance entre les échantillons.....	100
Figure 41: Analyse par composantes principales des échantillons analysés.....	100
Figure 42: Analyse différentielle a) nombre de protéines régulées.....	101
Figure 43: Expression des gènes des protéines candidates, dans les échantillons de transcriptomique.....	104
Figure 44: Essai de <i>silencing</i> de gènes dans les moustiques <i>Ae. aegypti</i> par injection d'ARNdb.....	105
Figure 45: Efficacité d'infection des Aag2 par YFV-Dakar.....	107
Figure 46: Réplication de YFV-Dakar sur les cellules Aag2.....	107
Figure 47: VolcanoPlot représentant les protéines différentiellement exprimées entre les conditions NI et YFV-Dakar.....	109
Figure 48: Vérification de la production des ARNdb.....	110
Figure 49: Validation fonctionnelle du groupe 1 de candidats.....	113
Figure 50: Validation fonctionnelle du groupe 2 de candidats.....	115
Figure 51: Fonction de la protéine VPS16 dans le transport vésiculaire.....	116
Figure 52: Effet-dose du traitement avec l'ARNdb ciblant Q16SL9 sur la réplication virale.....	118
Figure 53: Localisation des ARNdb ciblant le gène codant pour Q16SL9/VPS16.....	118
Figure 54: Effet de la transfection de différents ARNdb ciblant le gène codant pour Q16SL9.....	119

Tableau 4: vérification du pourcentage de PhiX détecté dans les échantillons.....	92
Tableau 5: Nombre d'éléments up-, down- régulés et total pour chaque comparaison entre les J3 et J7.....	95
Tableau 6: Nombre d'éléments up-, down- régulés et total pour chaque comparaison entre les états d'infection.....	96
Tableau 7: Identité des éléments up- ou down-régulés identifiés.....	96
Tableaux 8: Ontologies géniques enrichies parmi a) les protéines up-régulée ou b) down-régulées par l'infection YFV-Dakar.....	103
Tableau 9: Détail des protéines sélectionnées comme candidates.....	109

Discussion :

Tableau 10: analyser les protéines dont la quantité est inversement proportionnelle à la quantité de virus... 130	
Tableau 11: Comparaison des ARNsi issus de l'ARNdb Q16SL9_v1 avec le génome YFV-Dakar et le génome d' <i>Ae. aegypti</i> (AaeL5.0).....	132

Annexes :

Tableau 12: Protéines dont l'abondance est augmentée dans les échantillons J7-Dakar par rapport aux échantillons J7-NI.....	135
Tableau 13: Protéines détectées dans les échantillons J7-Dakar, mais pas dans les échantillons J7-NI.....	136
Tableau 14: Protéines dont l'abondance est diminuée dans les échantillons J7-Dakar par rapport aux échantillons J7-NI.....	138
Tableau 15: Protéines détectées dans les échantillons J7-NI, mais pas dans les échantillons J7-Dakar.....	138
Tableau 16: Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression de gènes en RT-qPCR.....	141
Tableau 17: Amorces utilisées pour la synthèse des ARNdb.....	143
Tableau 18: Amorces utilisées pour amplifier le génome des virus YFV.....	145

Abréviations

Aag2 :	lignée cellulaire d' <i>Aedes aegypti</i>
ACP :	Analyse en composantes principales
ADNc :	ADN complémentaire
Ae. :	<i>Aedes</i>
Ago2 :	endonucléase Argonaute-2
ARNdb :	ARN double-brin
ARNmi :	micro ARN, <i>microRNA</i>
ARNpi :	ARN interagissant avec les protéines Piwi, <i>Piwi-interacting RNA</i>
ARNsi :	petits ARN interférents, <i>small interfering RNA</i> (siRNA)
BSA :	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Albumine de sérum bovin
C :	protéine de capsid
CHIKV :	<i>Chikungunya Virus</i> , virus du chikungunya
DENV :	<i>Dengue Virus</i> , virus de la dengue
DMEM :	<i>Dubelcco's Modified Eagle's medium</i> , milieu Eagle modifié par Dubelcco
EU :	États-Unis
FDR :	<i>False Discovery Rate</i> , taux de fausse découverte
GAPDH :	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (gène de ménage pour les cellules mammifères)
GFP :	<i>Green Fluorescent Protein</i> , protéine fluorescente verte
GO :	<i>Gene Ontologie</i> , ontologie génique
ID :	Indice de Diversité
IFN :	Interféron
IMD :	<i>immune deficiency pathway</i> , voie de signalisation de la déficience immunitaire
jpg :	jours post-gorgement
kb :	kilo base
kDa :	kilo Dalton
L-15 :	milieu de culture cellulaire Leibovitz
MDA5 :	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MEB :	<i>Midgut Escape Barrier</i> , barrière de dissémination hors de l'intestin moyen
MIB :	<i>Midgut Infection Barrier</i> , barrière d'infection de l'intestin moyen
MOI :	<i>Multiplicity Of Infection</i> , multiplicité d'infection
NEB :	<i>New England Biolabs</i>
NI :	Non Infecté
NS :	protéines non-structurales
ntp :	nucléotide
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
ONNV :	<i>O'Nyong-Nyong Virus</i> , virus O'Nyong-Nyong
PBS :	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tampon phosphate salin

PAMP :	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> , motifs moléculaires associés aux pathogènes
PNH :	primates non-humains
PFA :	Paraformaldéhyde
PFU :	<i>Plaque Forming Unit</i> , unité formant plaque
prM:	protéine précurseur de la protéine de membrane
qPCR :	PCR quantitative
RE:	réticulum endoplasmique
RIDL:	<i>Release of Insects Carrying a Dominant Lethal Gene</i> , lâchers d'insectes portant un dominant léthal
RIG-I :	<i>Retinoic acid-Inducible Gene I</i>
RISC :	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA-Seq :	<i>RNA sequencing</i> , séquençage des ARN
RP49:	<i>Ribosomal Protein 49</i> , protéine ribosomale 49 (gene de ménage pour cellules de moustique)
RVFB :	<i>Rift Valley Fever Virus</i> , virus de la fièvre de la vallée du Rift
SGIB :	<i>Salivary Gland Infection Barrier</i> , barrière d'infection des glandes salivaires
SGEB :	<i>Salivary Gland Escape Barrier</i> , barrière d'échappement des glandes salivaires
SFV :	<i>Semliki Forest Virus</i> , virus de la forêt de Semliki
SINV :	<i>Sindbis Virus</i> , virus Sindbis
SIT :	<i>Sterile Insect Technique</i> , Technique de l'Insecte Stérile
SNV :	<i>single nucleotid variant</i>
SVF :	Sérum de Veau Foetal
WNV:	<i>West Nile Virus</i> , virus du Nil occidental
WHO :	<i>World Health Organisation</i>
YF :	<i>Yellow Fever</i> , fièvre jaune
YFV :	<i>Yellow Fever Virus</i> , virus de la fièvre jaune
ZIKV :	<i>Zika virus</i> , virus Zika
3'-UTR :	<i>3' untranslated region</i> , extrémité 3' non traduite

Introduction

1 Arboviroses et leurs vecteurs, problème de santé mondial

1.1 Les moustiques, vecteurs de maladies de plus en plus importantes mondialement

1.1.1 Les différents arbovirus et leurs vecteurs

Les arthropodes sont une classe d'animaux invertébrés qui partagent tous la caractéristique d'avoir des pattes articulées, un exosquelette, et un corps segmenté. Certains arthropodes sont hématophages : ils doivent prendre un repas sanguin sur un hôte vertébré (mammifère, oiseau, reptile) afin de réaliser une étape de leur cycle de développement (maturation des œufs pour certains moustiques, survie pour les glossines). Lors de ce repas sanguin, certains arthropodes peuvent leur transmettre des virus, appelés arbovirus. Ce mot est une contraction de l'appellation *arthropod-borne virus*. Le virus se multiplie dans l'hôte, provoquant parfois une pathogenèse, et est de nouveau transmis au vecteur lors d'une nouvelle piqûre pour un repas sanguin.

La transmission particulière de ces virus leur confère des caractéristiques bien spécifiques d'adaptabilité par rapport à d'autres virus qui n'auraient qu'un seul hôte. Ils sont capables de s'adapter à au moins deux types d'organismes aux physiologies fondamentalement différentes, ne serait-ce que la température (température ambiante pour les insectes, 37°C pour les humains) ou le système immunitaire.

Les arbovirus constituent un groupe hétérogène, avec 537 virus différents décrits à ce jour (CDC, 2018). Seulement 50 ont été caractérisés pathogènes pour les animaux (dont les hommes). Ils sont répartis dans 7 familles virales (Hubálek et al., 2014), détaillées dans le **Tableau 1**. La plupart de ces virus sont des virus enveloppés à génome ARN. Les virus des familles *Nodoviridae* et *Reoviridae* sont les seuls à ne pas avoir d'enveloppe et le virus de la peste porcine africaine est le seul virus à ADN (180 kb). Ce dernier cause des épidémies dans les élevages de porcs en Europe de l'Est depuis 2014 (EFSA, 2018), et actuellement en Chine.

Tableau 1: Familles virales constituant les arbovirus et leurs caractéristiques.

Abréviations : YFV, virus de la fièvre Jaune ; DENV 1-4, 4 sérotypes du virus de la dengue ; WNV, virus du Nil occidental ; ZIKV, virus Zika ; JEV, virus de l'encéphalite japonaise ; TBEV, virus de l'encéphalite à tiques ; CHIKV, virus chikungunya ; SINV, virus Sindbis ; RRV, virus de la Rivière Ross ; SFV, virus de la forêt Semliki ; ONNV, virus O'Nyong-Nyong ; RVFV, Fièvre de la Vallée du Rift ; CCFV, virus de la fièvre hémorragique Crimée-Congo ; VSV, virus de la stomatite vésiculeuse ; BTV, *Bluetongue virus* ou virus de la fièvre catarrhale ovine. Le seul représentant des virus à ADN est le virus de la peste porcine africaine (ASFV pour *African swine fever virus*). Source : (Hubálek et al., 2014).

Génome	Enveloppe	Famille	Principaux virus	
			Genre	virus
ARN sb (+)	oui	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	YFV, DENV 1-4, WNV, ZIKV, JEV, TBEV
		<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	CHIKV, RRV, SFV, ONNV, VEEV, Mayaro
	non	<i>Nodoviridae</i>	<i>Alphanodavirus</i>	virus Nodamura
ARN sb (-)	oui	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Nairovirus</i>	CCFV
			<i>Phlebovirus</i>	RVFV
			<i>Bunyavirus</i>	virus Bunyamwera
		<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Vesiculovirus</i>	VSV
		<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Thogotovirus</i>	virus Thogoto
ARN db	non	<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	BTV, virus Orungo
ADN db	oui	<i>Asfviridae</i>	<i>Asfvirus</i>	ASFV

Différents types d'arthropodes transmettent des arbovirus. Le seul vecteur qui ne soit pas un insecte est la tique, qui fait partie de la classe des arachnides et de la sous-classe des acariens. Tous les autres vecteurs d'arbovirus font partie de la classe des insectes. Les insectes représentent 70 % de toutes les espèces décrites sur la planète (Misof et al., 2014). Depuis 250 ans, entre 800 000 et 1 million d'espèces ont été décrites (Rodhain, 2015). Seuls les diptères peuvent transmettre des virus. Le plus connu est sans doute le moustique, qui fait l'objet de cette étude, mais les phlébotomes (famille des *Psychodidae*) ou les culicoïdes (famille des *Ceratopogonidae*) sont aussi des vecteurs. Parmi les 3 500 espèces de moustiques décrites, seulement 100 (3 %) peuvent transmettre des maladies (Harbach and Besansky, 2014).

1.1.2 Arboviroses contemporaines

Les dernières décennies ont vu émerger ou ré-émerger une grande quantité de maladies dues aux arbovirus, toutes transmises par les moustiques du genre *Aedes* (Wilder-Smith et al., 2017). En 2017, le poids annuel sur la santé publique mondiale des arboviroses dues aux virus DENV, CHIKV, ZIKV, YFV, JEV et WNV estimé par l'OMS est de 100 millions de cas par an et 2,3 millions de DALY (WHO,

2018a). Les DALY (*Disability-adjusted life years*) ou années de vie corrigées de l'incapacité est un indice développé par l'OMS en 1990, représentant le nombre d'année de vie perdues par la population à cause d'une mort prématurée ou d'une mauvaise santé (WHO, 2014a).

Les paragraphes suivants donnent les caractéristiques des principales arboviroses ayant émergées ou ré-émergées ces dernières années : l'infection par le virus Zika (dernière en date), le chikungunya et la dengue. Le virus de la fièvre jaune et sa transmission sont l'objet d'étude de ce projet. Son épidémiologie est d'avantage approfondie dans la partie 3.

Le virus Zika. La première épidémie connue due au virus Zika a été déclarée sur l'île de Yap en 2007, en Micronésie (Pacifique Ouest). Cette épidémie touche 75 % de la population mais les symptômes sont modérés (fièvres, myalgies, atteintes cutanées) (Duffy et al., 2009). L'infection est asymptomatique dans 80 % des cas. Des complications neurologiques chez les adultes (syndrome de Guillain-Barré) sont rapportées pendant l'épidémie qui touche la Polynésie Française en 2013-2014 (Oehler et al., 2014) et se propage par la suite dans toutes les îles du Pacifique Sud (Musso et al., 2014). Le virus Zika atteint le Brésil en 2013 et se propage rapidement sur le continent. De nombreux cas de malformations du système nerveux central, appelés microcéphalies, sont rapportés chez les nouveaux nés à partir de 2015 au Brésil (Brasil et al., 2016). Ce virus inconnu devient alors une « urgence de santé publique de portée internationale » en quelques mois (WHO, 2016a). Une autre particularité de ce virus est sa transmission sexuelle, unique parmi les *Flavivirus* (D'Ortenzio et al., 2016).

Le virus du chikungunya. L'infection par le virus du chikungunya provoque des symptômes dans la majorité des cas (72-96 %) (Appassakij et al., 2013). Les patients déclarent soudainement une fièvre et des douleurs articulaires modérées à sévères. Ces douleurs peuvent devenir chroniques et entraîner une importante invalidité (Alfaro-Tolosa et al., 2015). Découvert en 1952 (Ross, 1956), ce virus a ré-émergé en Afrique de l'Est en 2004 (Sergon et al., 2008) puis s'est propagé dans les îles de l'Océan Indien (Chastel, 2005), jusqu'en Asie (Kularatne et al., 2012). Il atteint l'Europe en 2007 (Angelini et al., 2008) et les Caraïbes pour la première fois en 2013 (Khan et al., 2014). En 2013 et 2014, le virus a causé plus de 660 000 cas, dont 37 morts, dans de nombreux pays de la zone des Caraïbes, Amérique Centrale et Amérique du Sud (PAHO, 2014).

Le virus de la dengue. Avec une estimation de 390 millions d'infections par an, dont 100 millions sont symptomatiques, la dengue est l'arbovirose la plus répandue dans le monde (Bhatt et al., 2013). Elle touche principalement l'Asie et l'Amérique du Sud. Le nombre d'infection a été multiplié par 30 depuis les années 70 (Gubler, 2011). Cette infection provoque généralement un syndrome de type grippal. Il existe cependant des formes rares et sévères, soit hémorragiques soit dit « syndrome de choc », qui peuvent entraîner la mort. Il existe 4 sérotypes différents (DENV-1 à DENV-4). Une des

spécificités de la dengue est que l'infection par un des sérotypes, non seulement ne confère pas d'immunité contre les autres sérotypes (Simmons et al., 2012), mais provoque également des symptômes de plus en plus sévères lors d'infections ultérieures avec un sérotype différent (Halstead, 1988).

Futures épidémies ? La liste des arbovirus pathogènes transmis par les moustiques aux humains ne s'arrête pas là, et certains virus déjà bien caractérisés pourraient produire des épidémies similaires. Plusieurs exemples de virus du genre *Alphavirus* sont concernés, comme le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV), qui provoque des atteintes neurologiques dans les régions tropicales du continent américain et les virus de la rivière Ross et Mayaro, qui provoquent des pathologies proches du chikungunya en Australie et Amérique du Sud respectivement (Wilder-Smith et al., 2017). L'existence d'un virus transmis par les moustiques du genre *Anopheles*, le virus O'Nyong-Nyong (ONNV) (Carissimo et al., 2015a), soulève également le fait que ce type de moustique, très largement répandu dans les zones tropicales du monde, pourrait dans les années à venir devenir une menace de transmission d'arbovirus. Enfin, l'émergence du *Flavivirus* Usutu transmis par les moustiques du genre *Culex* est également source d'inquiétude en Europe (Ashraf et al., 2015).

1.2 Mondialisation

Les virus appartenant aux genres *Flavivirus* et des *Alphavirus* circulaient initialement entre les singes et les moustiques dans un cycle sylvatique et se sont adaptés à un cycle urbain entre les moustiques et l'homme, donnant lieu à des épidémies (Weaver and Reisen, 2010). Les facteurs liés à la mondialisation listés ci-après ont favorisé ces émergences, laissant penser que le contexte mondial sera de plus en plus favorable à l'émergence et la dissémination d'autres arboviroses.

1.2.1 Multiplication des échanges

La multiplication des voyages internationaux, des échanges économiques caractéristiques de la mondialisation offrent des opportunités de voyage incroyables à la fois aux vecteurs moustiques et aux virus, le plus souvent *via* des voyageurs malades. (Wilder-Smith and Gubler, 2008)

L'expansion des vecteurs du genre *Aedes* a commencé par bateau avec l'introduction d'*Ae. aegypti* sur le continent américain lors du commerce triangulaire, d'où il a atteint toutes les régions tropicales et sub-tropicales du monde (Brown et al., 2014). *Ae. albopictus*, aussi appelé moustique tigre à cause de ses zébrures, a été introduit en Europe, aux EU et au Brésil dans les années 1980 (Carvalho et al., 2014; Medlock et al., 2012). Ces deux espèces de moustiques sont aujourd'hui présentes dans la plupart des grandes villes d'Asie et très répandus en Amérique du Sud (Lambrechts et al., 2011) (voir

la carte de répartition mondiale sur la **Figure 1.a et .b**). *Ae. albopictus* s'installe également progressivement en Europe (**Figure 1.c et.d**). *Aedes spp.* est aujourd'hui le vecteur le plus répandu dans le monde avec 3 milliards de personnes habitant dans des régions colonisées (Wilder-Smith et al., 2017).

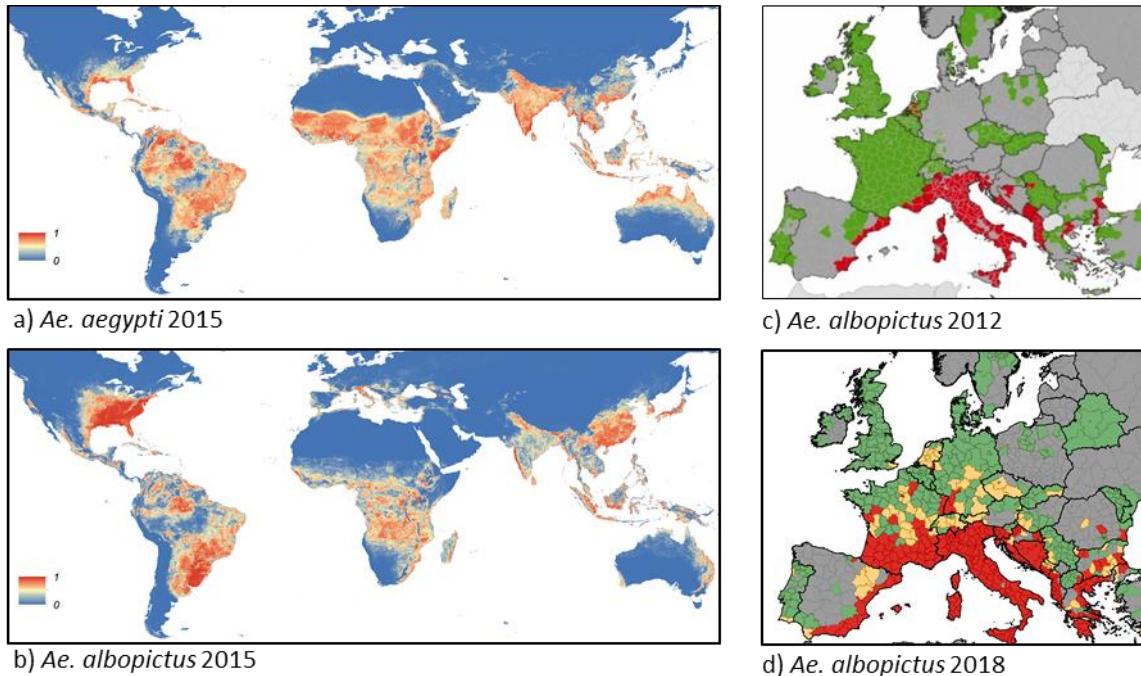


Figure 1: Répartition de *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*.

Cartes de distribution prédite mondiale de a) *Ae. aegypti* et b) *Ae. albopictus*. Les couleurs représentent une probabilité de présence : rouge probabilité 1 et bleu probabilité 0. Carte de répartition européenne d'*Ae. albopictus* en Europe c) en 2012 et d) en 2018. Rouge : endémique ; vert : absent ; jaune : introduit ; gris : pas de données. Sources : (ECDC, 2018; Kraemer et al., 2015).

Le transport des virus par les humains permet leur propagation sur de nouveaux territoires, et donc dans de nouvelles populations naïves. L'implantation du virus dépend de la colonisation au préalable par son vecteur, ce qui explique pourquoi la dengue n'est jamais devenue endémique en Europe, faute de vecteur compétent. De nombreux exemples illustrent le transport des virus par les voyageurs. Ils sont le plus souvent identifiés car déclarent la maladie une fois arrivés. Depuis la ré-émergence de la fièvre jaune en Afrique et en Amérique du Sud de nombreux cas ont été importés en Europe (Barrett, 2018) (**Figure 2**). Onze travailleurs chinois de retour d'Angola ont même déclaré la fièvre jaune, important la maladie en Asie, territoire où elle ne s'est encore jamais installée (Wasserman et al., 2016). Les personnes qui ne tombent pas malades ne sont pas comptabilisées mais pourraient aussi être à l'origine de cas secondaires, comme montre cette étude qui confirme que les virus responsables des cas de dengue asymptomatiques sont transmis aux moustiques (Duong et al., 2015). Les études phylogéniques permettent de retracer l'histoire des virus et de confirmer l'origine des émergence (Gubler et al., 2017; Klitting et al., 2018).

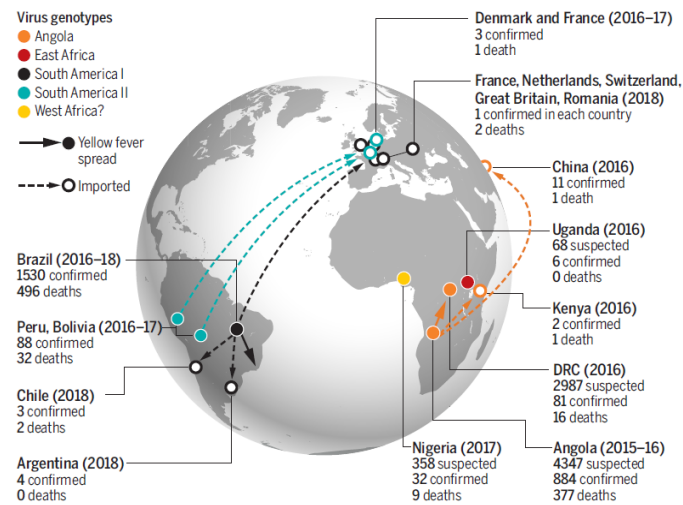


Figure 2: Cas importés de YFV à travers le monde. Source : (Barrett, 2018).

1.2.2 Augmentation de la population et urbanisation

La population mondiale a triplé depuis 1950 : elle est passée de 2.5 milliards en 1950 à 7.3 milliards en 2015 (source : Organisation des Nations Unies), et sa densification dans les zones urbaines est un facteur important pour l'apparition des épidémies d'arboviroses (Gubler and Meltzer, 1999). Une étude épidémiologique portant sur la dengue et le chikungunya a montré une corrélation entre les épidémies et la densité de population (Rossi et al., 2018).

L'urbanisation fulgurante depuis la fin de la seconde guerre mondiale s'accompagne de peu d'infrastructures dans les pays à l'époque appelés en voie de développement. L'inefficacité des systèmes de ramassage des déchets et de collecte des eaux usées créent une source de développement idéale pour les populations de moustiques, proches des habitations humaines (Gubler, 2002). Ces conditions ont été corrélées avec la circulation de la dengue (Thammapalo et al., 2008).

1.2.3 Changement climatique

Même si le critère du changement climatique semble expliquer dans une moindre mesure l'augmentation de l'incidence des arboviroses jusque-là (Wilder-Smith and Gubler, 2008), ce paramètre jouera très probablement sur la propagation des vecteurs et donc des virus qu'ils transmettent à travers le monde. Premièrement, la température élevée favorise la capacité vectorielle des moustiques. Ainsi, *Ae. albopictus* et *aegypti* ont été montrés plus compétents pour la transmission de la dengue avec des températures élevées (Ciota et al., 2018; Liu-Helmersson et al., 2014). Deuxièmement, les températures élevées favorisent l'installation d'*Aedes spp.* dans des zones qui

étaient tempérées mais deviennent de plus en plus favorables à leur installation. Cet effet est bien décrit pour *Ae. albopictus* et semble être également vrai pour *Ae. aegypti*. D'ici 2030, Carbajo et ses collaborateurs ont estimé que la zone de présence d'*Ae. aegypti* pourrait doubler en s'étendant vers le sud, grâce à l'augmentation de la température et de la densification de la population (Carbajo et al., 2018).

1.3 Lutte anti-vectorielle

Afin de lutter contre les arboviroses, aucun traitement anti-viral n'est disponible, seuls les traitements symptomatiques peuvent être utilisés. Des vaccins humains existent et protègent, avec plus ou moins d'efficacité, contre 3 arbovirus : YFV, JEV et DENV. Le vaccin contre la DENV est très controversé, à cause d'une recrudescence de cas graves chez les personnes non-immunes, surtout chez les enfants. Sa recommandation par l'OMS a été restreinte aux zones de forte endémicité de la dengue (WHO, 2018b). D'autres vaccins sont à l'étude en essais cliniques pour CHIKV (Reisinger et al., 2018) et ZIKV (NIH, 2018). Le moyen de lutte le plus général est la lutte anti-vectorielle, qui consiste à réduire la population de vecteur pour diminuer la transmission des arboviroses et donc leur incidence. Cette partie détaille certaines techniques de lutte anti-vectorielle utilisées et leurs limites.

1.3.1 Lutte anti-vectorielle historique

La lutte anti-vectorielle mise en place suite à la découverte de la transmission vectorielle de la fièvre jaune consistait en la destruction des gîtes larvaires, c'est-à-dire couvrir les réserves d'eau douce, éliminer les réserves d'eau stagnante comme les pots de fleurs, les pneus ou les bouteilles vides, et plus tard, la vaporisation d'insecticide comme le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), disponible dès 1947. Sur le continent américain, entre les années 30 et 70, de nombreux programmes de santé publique qui appliquent ces mesures anti-vectorielles se succèdent. Le plan d'éradication d'*Ae. aegypti* est efficace et un grand nombre de pays déclarent le moustique éradiqué en 1947 (Soper, 1965), concordant avec la réduction drastique de l'incidence de la fièvre jaune et de la dengue (Monath, 1994). Des programmes de contrôle vectoriel similaires à Singapour dans les années 70 et 80 ont permis la diminution de l'incidence de la dengue (Ooi et al., 2006). Malheureusement, l'arrêt des programmes d'éradication du moustique marque sa réinstallation progressive. Ce type de mesure demande une volonté politique forte, des infrastructures et des moyens importants : *“Eradication is neither easy nor cheap; it is most difficult and expensive, requiring a type of coverage and careful administration not dreamed of in most public health programs”* (Soper, 1965).

Implication de la communauté. La lutte vectorielle consistant à éliminer les gîtes larvaires a montré son efficacité. Si la population applique largement ces mesures sanitaires, le contrôle de la population vectorielle devrait pouvoir être efficace sans intervention de personnel dédié, moyennant une communication et une formation en amont. Certaines études ont montré l'efficacité significative de l'implication de la communauté, à la fois sur la présence de vecteur et sur l'incidence de la dengue (Andersson et al., 2015). Beaucoup d'autres études sont plus mitigées et soulèvent notamment la nécessité de personnel spécialisé pour accompagner la population dans cette démarche (Louis et al., 2016; Stefopoulou et al., 2018).

1.3.2 Moyens de lutte anti-vectorielle alternatifs

De nombreuses méthodes sont utilisées ou sont encore à l'étude. Ils ciblent différents stades du cycle du moustique.

Les moyens de contrôle biologiques. L'introduction de poissons ou de petits crustacés (copépodes) larvivores permet de diminuer la quantité de larves dans les réservoirs d'eau (Kay and Nam, 2005). Malgré son efficacité prouvée, la mise en place de cette technique est complexe et onéreuse car demande l'implication de personnel formé et d'un soutien prolongé des autorités publiques (Marten and Reid, 2007).

L'utilisation d'insecticides reste largement répandue. Utilisés dans les réservoirs d'eau, ils peuvent cibler les larves (Temephos, Novaluron, *Bacillus thuringiensis* serotype *israelensis* ou Bti) ou les nymphes (méthoprène, pyriproxyfène). Utilisés par vaporisation intérieure ou extérieure, ils ciblent les adultes (pyréthroïdes, cyperméthrine) (Achee et al., 2015). Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) est un exemple d'insecticide utilisé largement dès la deuxième guerre mondiale, qui a fait ses preuves en matière de lutte anti-vectorielle, notamment dans la lutte contre le paludisme (WHO, 2011a). Son utilisation a cependant soulevé une première limite, celle des effets nocifs sur la santé et l'environnement, qui a conduit à une forte diminution de son utilisation dès 1970. L'impact sur l'environnement a été dénoncé dans le livre de Rachel Carson, *Silent Spring* (Carson, 1962). L'impact suspecté sur la santé humaine a été largement décrit (infertilité, cancer, diabète) mais les études épidémiologiques n'ont pas pu démontrer un lien de cause à effet clair (Van Den Berg, 2009). Une deuxième limite à leur utilisation est l'apparition d'insectes résistants (Marcombe et al., 2012), qui pousse au développement de nouvelles générations d'insecticides (Achee et al., 2015).

La protection personnelle permet d'éviter le contact avec les moustiques au moment du repas sanguin. L'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides pour la nuit a montré son efficacité contre les moustiques du genre *Anopheles* dans la lutte contre le paludisme. Cette technique ne peut

pas être appliquée pour les *Aedes spp.* car ceux-ci sont actifs le jour. En revanche, l'utilisation de moustiquaires pour bloquer les ouvertures des habitations, des écoles et des lieux de travail est recommandée (Wilder-Smith et al., 2017). L'utilisation de répulsif, par exemple le DEET (N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide), est adaptée aux les voyageurs mais pas pour les personnes vivant en zone endémique.

1.3.3 Moyens de lutte anti-vectorielle issus des biotechnologies

De nouvelles techniques, issues des avancées importantes en biotechnologies ont récemment vu le jour et sont parfois déjà utilisées sur le terrain.

La technique de l'insecte stérile ou SIT pour *Sterile Insect Technique*, vise une diminution de la population de vecteur par lâchers d'insectes irradiés aux rayons-X. Leur croisement avec les insectes sauvages produit un nombre d'œufs très réduits ou non viables. Cette technique a été utilisée avec succès dans différentes îles du monde afin de diminuer les populations de lucilie bouchère (*Cochliomyia hominivorax*) qui fait de gros dégâts dans le bétail (Wyss, 2006) (Lindquist et al., 1992), sur la mouche méditerranéenne des fruits (*Ceratitis capitata*) (Hendrichs et al., 1995), sur la glossine (mouche Tsétsé) qui transmet un trypanosome au Zanzibar (Msanga et al., 2000). La limite de cette technique est la perte de compétitivité des mâles irradiés (Dame et al., 2009). Elle est un peu utilisée pour les moustiques, contre *Ae. albopictus* sur l'île de la Réunion par exemple.

La technique de lâchers d'insectes portant un dominant léthal ou RIDL pour *Release of Insects Carrying a Dominant Lethal Gene*, vise une diminution de la population de vecteurs par lâchers de moustiques transgéniques portant un gène dominant léthal. Leur reproduction avec les insectes sauvages produit une progéniture non viable. Cette technique a émergé suite à l'apparition des techniques de transgénèse chez les moustiques. La technique utilisée dans l'exemple ci-dessous repose sur l'utilisation d'un élément transposable, et la technique de transgénèse par CRISPR-Cas9 est détaillée plus bas.

Les Friendly™ Mosquitoes. L'exemple le plus connu de technique RIDL est la souche OX513A d'*Ae. aegypti*, produite par la compagnie Oxitec. C'est la première solution de lutte-antivectorielle reposant sur des moustiques génétiquement modifiés qui est utilisée à grande échelle. Ces moustiques ont été modifiés génétiquement grâce à l'insertion d'un transposon. Ils expriment le facteur de transcription tTAV (*Tetracycline-controlled transactivator*) qui est toxique si exprimé en grande quantité. Son expression est contrôlée par un promoteur inhibé en présence de tétracycline (Phuc et al., 2007). Ceci permet d'élever les moustiques en laboratoire jusqu'à maturité en présence de tétracycline. La reproduction avec les moustiques sauvages donne une progéniture hétérozygote mais

portant le gène dominant létal, actif au stade larvaire du moustique. Les moustiques n'arrivent donc pas à l'âge adulte. La diminution de la population suite à des lâchers successifs a été validée sur le terrain aux îles Caïman en 2009 (Harris et al., 2012) et au Brésil en 2012 (Carvalho et al., 2015) avec 80 % et 95 % de réduction de population adulte rapportées respectivement. Des lâchers massifs ont commencé au Brésil en 2015, sur la commune de Piracicaba (Etat de São Paulo, Brésil). Des publications sur le site d'Oxitec (oxitec.com) rapportent pour deux années consécutives une diminution de la quantité de gîtes larvaires de 81 %, mais ne donnent aucune information sur la diminution de l'incidence de la dengue. Les moustiques OX513, appelés Friendly™ Mosquitoes, sont aujourd'hui relâchés dans 5 pays différents : Brésil, EU (îles Key, Floride), îles Caïman, Panama et Inde. Ils pourraient être utilisés prochainement en Europe comme indiquent des rapports positifs de l'Institut National de Santé Publique et de l'Environnement des Pays-Bas et du Haut Conseil des Biotechnologies en France (Oxitec.com, 2018).

L'arrivée de la **technologie CRISPR-Cas9** a ouvert très largement le champ des possibles en matière de moustiques transgéniques. Cette technologie est issue du système immunitaire des bactéries *Streptococcus pyogenes*. Les séquences CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) intégrées aux génomes sont transcrites et prises en charge par l'endonucléase Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) pour aller cibler et cliver le génome des pathogènes (Jinek et al., 2012). Cette technologie est utilisée pour faire de la mutation dirigée et intégrer ou supprimer des gènes particuliers. L'application *in vivo* pour faire des animaux transgéniques est rapidement apparue, y compris chez les moustiques *Ae. aegypti* (Hall et al., 2015; Kistler et al., 2015) et *albopictus* (Liu et al., 2018). Cette technique de génie génétique est décrite comme étant beaucoup moins coûteuse, plus facile à mettre en place et plus efficace que toutes les autres techniques d'édition du génome utilisées précédemment (Sun et al., 2017), telles que les nucléases à motifs en doigts de Zinc (ZFN), les nucléases couplées à des facteurs de transcription (TALENs) ou les éléments transposables.

Le forçage génétique ou gene drive est un processus permis par la technologie CRISPR-Cas9. En insérant l'endonucléase Cas9 elle-même accompagnée de la séquence du gène à modifier dans le génome des organismes, la mutation peut se propager au moment de la fécondation. C'est-à-dire que le zygote n'est plus hétérozygote pour le gène modifié mais devient homozygote car le second allèle est lui-aussi modifié. Il est possible d'introduire des moustiques dans l'environnement des moustiques modifiés par ce processus. En se reproduisant avec les moustiques sauvages, ils propagent le gène qu'ils transportent par forçage génétique.

Eliminer ou remplacer la population. La stratégie de contrôle vectoriel dépend alors du gène qui est transmis. Une étude réalisée sur un moustique du genre *Anopheles* a permis de modifier le ratio mâle/femelle dans la progéniture, avec une majorité de mâles (Gantz et al., 2015). Cette stratégie

a pour but de diminuer la population. En revanche, l'introduction d'un gène qui ne modifie pas la compétitivité aurait pour effet de remplacer la population. Par exemple, un gène qui modulerait la compétence vectorielle permettrait de diminuer la capacité vectorielle (notions expliquées § 2.1.1) de toute une population de moustique pour un virus en particulier. Ces techniques sont encore au stade de la mise au point mais seront certainement testées sur *Ae. aegypti* dans les prochaines années (Sun et al., 2017).

Wolbachia. Les bactéries du genre *Wolbachia* sont classées dans l'ordre des Rickettsiales. Ce sont de petites bactéries (300 nm) en forme de bâtonnet, endosymbiotiques intra-cytoplasmiques, qui infectent environ 65 % des invertébrés (Werren et al., 2008). Elles sont naturellement absentes chez les moustiques du genre *Aedes* mais présentes chez les *Culex*. Plusieurs lignées de *Wolbachia* agissent différemment sur les moustiques de type *Aedes*. Trois effets sont exploitables pour la lutte anti-vectorielle :

1) La diminution de la population par l'effet d'incompatibilité cytoplasmique. Cette incompatibilité se traduit par le fait qu'une femelle se reproduisant avec un mâle infecté par *Wolbachia* ne donnera pas de descendance. En introduisant des mâles porteurs d'une souche non endémique de *Wolbachia* dans l'environnement, on peut provoquer la diminution de la population par effet d'incompatibilité cytoplasmique (McGraw and O'Neill, 2013). La nécessité de relâcher strictement uniquement des mâles rend cette stratégie techniquement difficile à mettre en place (Dorigatti et al., 2018).

2) La diminution de la capacité vectorielle par diminution de la durée de vie du moustique. La souche *wMelPop* de *Wolbachia*, est capable de raccourcir la durée de vie des femelles moustiques (Carrington et al., 2009). L'introduire de manière stable dans la population permettrait d'avoir une population de femelles qui meurent avant d'avoir pu transmettre le virus (McMeniman et al., 2009). Les essais de colonisation effectués en Australie n'ont pas été concluants, car l'infection par cette souche induit un désavantage reproductif trop élevé (Yeap et al., 2014).

3) La diminution de la compétence vectorielle sans affecter la durée de vie. La souche *wMel* affecte la compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* pour DENV, CHIKV et YFV mais sans altérer sa durée de vie (Walker et al., 2011) (van den Hurk et al., 2012). Les tests de colonisation sont un succès, en cage puis sur le terrain en Australie (Hoffmann et al., 2014; Walker et al., 2011). L'étape suivante est de prouver que la diminution de compétence vectorielle des moustiques provoque une diminution de l'incidence des arboviroses qu'ils transportent. Des essais sont en cours dans des zones endémique de la dengue en Indonésie, Vietnam, Australie, Colombie et Brésil (Dorigatti et al., 2018). Les premiers

résultats sont prometteurs puisqu'ils montrent un effet sur l'incidence de dengue au Vietnam (Carrington et al., 2018).

De nombreuses avancées ont été faites ces dernières décennies dans la lutte anti-vectorielle. Cependant, la connaissance des interactions vecteur-pathogène reste très limitée. Ce projet s'inscrit dans une volonté d'approfondir ces connaissances pour à terme produire de nouveaux outils qui permettront de prévenir et de contenir l'émergence de nouvelles infections arbovirales.

La partie suivante présente les mécanismes de transmission des arbovirus par les arthropodes, et plus particulièrement les insectes. Les barrières à cette transmission sont présentées, ainsi que les mécanismes moléculaires qui les caractérisent.

2 Le franchissement de la barrière intestinale, une étape majeure dans la transmission virale par le vecteur

2.1 Le moustique, vecteur biologique

2.1.1 Définitions : vecteur biologique, capacité et compétence vectorielle

Vecteur biologique. « Un vecteur est un arthropode hématophage qui assure une transmission biologique et active d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre vertébré » (Rodhain, 2015). Comme détaillé auparavant, les arthropodes hématophages peuvent être des insectes ou des arachnides. Le terme « transmission biologique » signifie que le pathogène réalise forcément une phase de développement (pour les parasites) ou de multiplication (ici, pour les virus) dans l'organisme de l'arthropode. Elle s'oppose à la « transmission mécanique », où le pathogène ingéré lors d'un repas sanguin reste au niveau des pièces buccales et est transmis à l'hôte suivant lors du prochain repas sanguin. Ce type de transmission est décrit pour les virus phytopathogène transmis par les pucerons (Société française de microbiologie. et al., 1999). Le terme « transmission active » fait référence au comportement de l'insecte. En raison de son régime hématophage, il est capable de détecter le vertébré et de se déplacer pour aller prendre son repas sanguin. Il établit ainsi activement le contact entre le virus qu'il héberge et le vertébré réceptif. Ce n'est pas le cas pour les vecteurs intermédiaires dit passifs qui répliquent le pathogène et le libèrent dans l'environnement. Ce système passif n'existe pas pour les arbovirus, mais est décrit par exemple pour certains parasites du genre *Schistosoma* qui se répliquent dans les escargots d'eau douce et provoquent la Bilharziose (Famakinde, 2018).

La capacité vectorielle est le niveau d'efficacité d'un vecteur dans la transmission d'un agent pathogène, à un moment et à un endroit donnés. Elle inclut des facteurs intrinsèques au vecteur mais aussi des facteurs extrinsèques, c'est-à-dire dépendant de l'environnement. Elle est définie par la formule ci-dessous avec C : la capacité vectorielle ; m : la quantité de vecteurs par vertébré ; a : la probabilité d'une piqûre ; b : la compétence vectorielle ; p : la probabilité de survie du vecteur ; n : la période d'incubation extrinsèque ; $1 - \ln(p)$: la probabilité de survie du vecteur après que la période d'incubation soit achevée.

$$C = \frac{m \cdot a^2 \cdot b \cdot p^n}{-\ln(p)}$$

Cette formule indique bien que les conditions environnementales jouent sur la capacité vectorielle. Les mesures de lutte anti-vectorielle affectent notamment ces valeurs pour diminuer l'efficacité de transmission d'une arbovirose. Par exemple, le nombre de moustique par vertébré (m)

peut être réduit par la diminution de la population de moustique (destruction des gîtes larvaires, SIT, RIDL, voir § 1.3.3). La probabilité d'une piqûre (a) peut être diminuée par l'utilisation de moyens de protection personnels.

La compétence vectorielle (b) est un facteur intrinsèque au vecteur. Elle est définie comme la probabilité qu'un vecteur devienne infecté et soit capable de transmettre le virus après un repas sanguin. Cette compétence vectorielle peut être évaluée en laboratoire et apporte des informations cruciales pour l'évaluation du risque d'émergence d'un virus sur un territoire déjà colonisé par une espèce particulière de moustique (Vega-Rúa et al., 2014). La compétence vectorielle dépend de facteurs génétiques du moustique, avec de grandes variations même au sein d'une même espèce (Lambrechts et al., 2009). Elle dépend également de facteurs environnementaux comme la température (Watts et al., 1987), la nourriture disponible, la compétition pendant le développement larvaire, ainsi que la présence d'insecticide dans l'environnement (Tabachnick et al., 2013). Cependant, l'apparition d'une épidémie ne repose pas forcément sur la présence d'un type de moustique très compétent. Une étude a en effet montré que la population d'*Ae. aegypti* urbain Ogbomosho du Nigeria, qui est très faiblement compétente pour YFV, peut être à l'origine d'une épidémie, sous condition d'être présente en très grande densité (Miller et al., 1989). La compétence vectorielle peut être évaluée en laboratoire par 3 paramètres :

1) taux d'infection : pourcentage de moustique présentant une infection du tube digestif.

2) taux de dissémination : pourcentage des moustiques infectés qui présentent une infection dans les organes secondaires, pattes, ailes ou tête.

3) taux de transmission : pourcentage de moustiques avec une infection disséminée qui présentent des virus dans leur salive. Compte tenu de la faible quantité de virus présente dans la salive et de la difficulté technique que représente la salivation, une approximation du taux de transmission est parfois faite en considérant le pourcentage de moustique ayant une infection disséminée qui présentent aussi du virus dans leurs glandes salivaires.

La période d'incubation extrinsèque (PIE) est le laps de temps qui s'écoule entre le repas sanguin et le moment où le virus est présent dans la salive du moustique pour être transmis. Cette période varie entre les espèces et les souches de moustique, ainsi qu'entre les arbovirus qui sont transmis. Ainsi, la PIE pour le virus de la fièvre jaune est de 9 à 12 jours (Bauer and Hudson, 1928) contre 2 ou 3 jours pour CHIKV (Dong et al., 2016) dans *Aedes aegypti*. Remplacer la population de vecteurs par une population réfractaire comme décrit plus haut par une technique de forçage génétique ou bien par des moustiques infectés avec la bactérie *Wolbachia* est une façon de réduire la capacité vectorielle en touchant la compétence vectorielle.

Afin d'atteindre les glandes salivaires, le virus doit pouvoir se répliquer dans différents organes, passer différentes barrières. Ces étapes sont présentées dans le paragraphe suivant.

2.1.2 Transmission du virus par le moustique et barrières tissulaires

L'interaction hôte-vecteur est très spécifique et seules certaines souches de virus sont capables d'outrepasser les différentes barrières tissulaires que représentent l'organisme du moustique pour être sécrétées dans la salive (Hardy et al., 1983). Ces étapes sont décrites sur la **Figure 3**.

La portion du tube digestif dans laquelle arrive le repas sanguin est l'intestin moyen. Ce segment, ainsi que le segment postérieur de l'intestin, sont impliqués dans l'absorption des sucres et des composants du sang. L'épithélium de l'intestin moyen est composé d'une monocouche de cellules épithéliales, avec des microvillosités absorbantes sur la face apicale et une lame basale riche en protéines (**Figure 3**). Celle-ci sépare l'épithélium des réseaux de muscle longitudinaux et verticaux, ainsi que du réseau de trachées qui entourent le tube digestif (Okuda et al., 2002). Les avancées dans l'analyse de la composition de l'épithélium intestinal du modèle *Drosophila melanogaster* et les similitudes avec la physiologie du moustique laissent penser que cet épithélium possède également des cellules souches et des cellules endocrines (Dutta et al., 2015). Lors de l'ingestion du repas sanguin, l'épithélium intestinal sécrète la matrice péritrophique. Cette membrane chitineuse, riche en protéines et glycoprotéines est sécrétée entre 6 et 12 h selon l'espèce de moustique (Perrone and Spielman, 1988).

La première étape de la transmission virale est l'infection par le virus de cet épithélium intestinal. Cette barrière est appelée barrière d'infection de l'intestin moyen (MIB, *midgut infection barrier*). L'accrochage à la surface cellulaire doit survenir avant l'apparition de la membrane péritrophique qui présente des pores d'un diamètre trop faible pour laisser passer le virus (20-30 nm) (Hardy et al., 1983). Le passage de la MIB requiert également la réplication du virus dans les cellules épithéliales.

La seconde étape est le franchissement de la barrière d'échappement de l'intestin moyen (MEB, *midgut escape barrier*). Ce passage permet d'atteindre l'hémocœle, et de là, atteindre les organes secondaires : les tissus adipeux, les ovaires, les pattes, les ailes, la tête et les glandes salivaires. Cette barrière peut être mise en évidence en testant la présence de virus dans les organes secondaires. Historiquement, les virus étaient détectés par immunofluorescence sur des broyats de tête (Miller and Adkins, 1988). Les mécanismes moléculaires exploités par les virus pour atteindre les différents organes secondaires restent mal connus. L'hémolymphe est un liquide dans lequel baignent tous les organes secondaires et comporte également des cellules immunitaires, appelées hémocytes (Hillyer,

2015). La détection d'hémocytes infectés par l'*Alphavirus* O'Nyong-Nyong (ONNV) lors de sa dissémination dans le moustique *Anopheles gambiae* suggère que les virus pourraient de disséminer *via* les cellules immunitaires qui circulent dans l'hémolymphe (Carissimo et al., 2015a). Le système trachéal qui apporte directement le dioxygène de l'air aux cellules musculaires et est donc présent dans tout l'organisme pourrait également servir de réseau de dissémination du virus dans les organes secondaires (Romoser et al., 2004) (voir § 2.3.4).

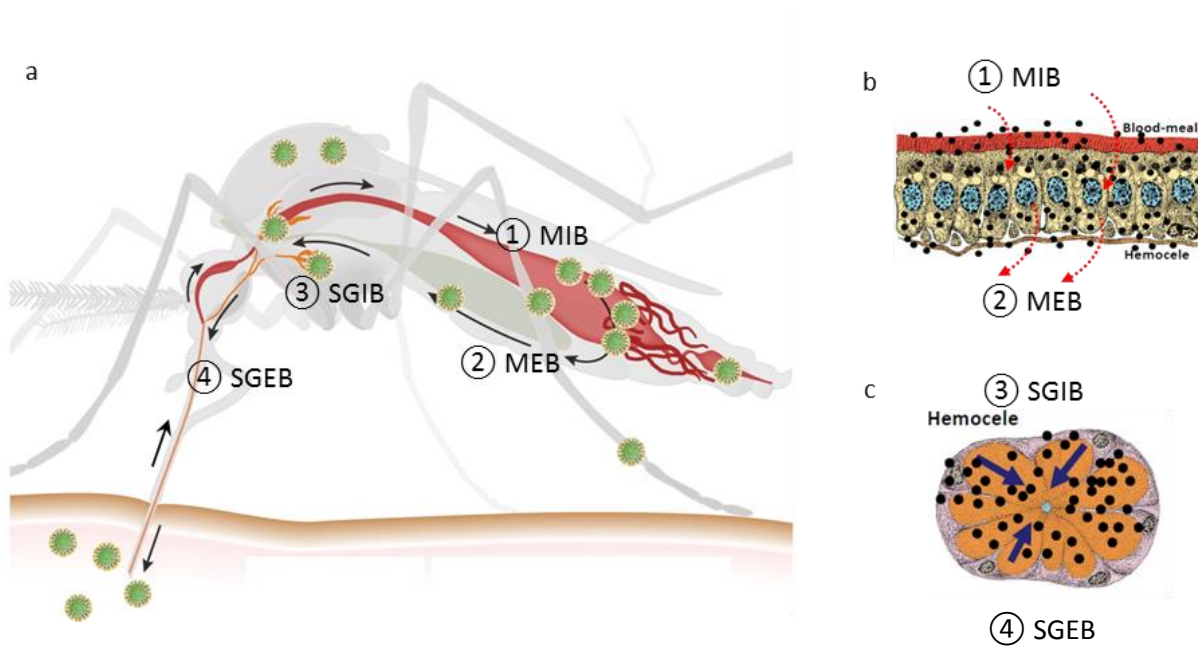


Figure 3: Etapes de la transmission d'un arbovirus par le vecteur moustique.

a) Etapes de transmission du virus dans l'organisme entier du moustique. b) détail de l'organisation de l'épithélium de l'intestin moyen : monocouche de cellules épithéliales polarisées, repas sanguin et membrane périphérique à sa face apicale et lame basale du côté hémocèle. c) détail de l'organisation d'un acinus de glande salivaire.

Les différentes étapes et barrières : Le moustique prend d'abord un repas sanguin sur un hôte vertébré virémique. ① MIB, *midgut infection barrier* ou barrière d'infection de l'intestin moyen. Le virus ingéré lors du repas sanguin arrive dans l'intestin moyen, infecte les cellules de l'épithélium intestinal et s'y réplique. ② MEB, *midgut escape barrier* ou barrière d'échappement de l'intestin moyen. Le virus franchit la barrière de l'épithélium intestinal et la lame basale qui l'entoure pour se disséminer dans les organes secondaires : tissus adipeux, ovaires, pattes, tête. ③ SGIB, *salivary gland infection barrier* ou barrière d'infection des glandes salivaires. Le virus infecte l'épithélium sécrétoire des glandes salivaires et s'y réplique. ④ SGEB, *salivary gland escape barrier* ou barrière d'échappement des glandes salivaires. Le virus est sécrété avec la salive par les glandes salivaires et est injecté à l'hôte vertébré lors du repas sanguin. Sources : (McNeil, 2016) (Franz et al., 2015).

La troisième étape de transmission consiste à infecter les cellules des glandes salivaires (SGIB, *salivary gland infection barrier*). La paire de glandes salivaires est localisée dans le thorax, chaque glande salivaire contient 3 lobes. Une monocouche de cellules épithéliales s'organise autour d'un canal central, le tout entouré d'une lame basale (Clements, 1996). De la même manière que pour l'intestin moyen, la particule virale doit être recouverte de glycoprotéines d'enveloppe adaptées à l'entrée dans ces cellules particulières et pouvoir se répliquer dans ces cellules de manière efficace tout en échappant aux mécanismes immunitaires du moustique. La détection de virus dans les glandes salivaires disséquées assure que le virus a pu passer cette barrière.

La dernière étape est la barrière d'échappement des glandes salivaires (SGEB, *salivary gland escape barrier*). La sécrétion des virus dans la salive permet au virus d'être injecté dans l'épiderme de l'hôte lors du repas sanguin et ainsi de commencer son cycle de réplication. Cette barrière peut être évaluée en détectant les virus dans la salive, par titrage en plaque de lyse, RT-qPCR ou *via* leur amplification sur des cellules permissives comme les cellules d'*Ae. albopictus* C6/36.

La double barrière intestinale est cruciale pour la transmission des vecteurs et sera le cœur du sujet de recherche présenté ici.

2.2 Mécanismes de réponse à l'infection virale

Cette partie décrit les voies de signalisation et les effecteurs qui ont un rôle dans la réponse immunitaire du moustique à la réplication virale (**Figure 4**). Elles ont été identifiées soit parce qu'elles ont été détectées up- ou down-régulées lors de l'infection, ou bien parce que des études fonctionnelles ont montré qu'elles interféraient avec la réplication virale.

Une grande partie des connaissances accumulées sur le système immunitaire du moustique provient des études menées sur le modèle insecte *Drosophila melanogaster* (Merkling and van Rij, 2013). Beaucoup de voies de signalisation impliquées dans les réponses immunitaires possèdent leur équivalent chez le moustique voire même chez l'humain, avec des orthologues protéiques. A titre d'exemple, des facteurs de transcription de la famille NF- κ B (DIF et Rel I chez les insectes et NF- κ B chez l'humain), interviennent dans tous ces organismes suite à la stimulation de récepteurs Toll. Lorsqu'ils sont non-activés, les facteurs de transcription sont séquestrés par un inhibiteur dans le cytoplasme (Cactus chez les insectes et I κ B chez l'humain). Les différents orthologues sont listés dans le **Tableau 2**. La phosphorylation de cet inhibiteur conduit à sa dégradation et donc à la libération du facteur de transcription qui peut être transloqué dans le noyau.

Tableau 2: Facteurs de transcription de type NF- κ B impliqués dans la transduction du signal suite à l'activation de la voie Toll et leurs inhibiteurs, dans différents organismes. Sources : (Merkling and van Rij, 2013; Mogensen, 2009; Terradas et al., 2017)

Organisme	Facteur de transcription	Inhibiteur
<i>Drosophila melanogaster</i>	DIF (Dorsal-related Immunity Factor)	Cactus
<i>Aedes aegypti</i>	Rel I	Cactus
<i>Homo sapiens</i>	NF- κ B (p50 et p65)	I κ B

2.2.1 Les principales voies antimicrobiennes de la réponse immunitaire

La voie Toll. La voie de signalisation Toll a été découverte chez la drosophile, d'abord grâce à son rôle dans le développement embryonnaire (Lemaitre et al., 1996), et a été par la suite associée au système de défense anti-bactérien, anti-fongique et antiviral (Zambon et al., 2005). La reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) conduit au clivage de la protéine Spaetzle. Celle-ci se lie et active les récepteurs de la famille Toll et provoque l'activation des protéines adaptatrice MyD88, Tube et Pelle. La phosphorylation de Cactus par le complexe MyD88, Tube et Pelle permet sa dégradation par le protéasome et la libération du facteur de transcription Rel I. Ce dernier est transloqué dans le noyau et active la transcription de gènes anti-microbiens dont les peptides anti-microbiens (AMP, *anti-microbial peptides*) cécropine, défensine, drosomycine (Sim et al., 2014) (**Figure 4**).

Des analyses transcriptomiques ont montré l'augmentation de l'expression des acteurs de cette voie suite à l'infection par la DENV (Luplertlop et al., 2011; Sim et al., 2012; Xi et al., 2008), suggérant son implication dans la défense antivirale contre la DENV, voir de manière globale contre les arbovirus.

Des tests fonctionnels de *silencing in vivo* ont confirmé l'implication de la voie Toll dans la défense d'*Aedes aegypti* contre la DENV (Ramirez and Dimopoulos, 2010; Sim et al., 2013; Xi et al., 2008). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) suite à l'infection par la bactérie *Wolbachia* semble activer cette voie Toll, et donc permettre la diminution de l'infection par le virus de la dengue (Pan et al., 2012). En revanche, elle ne semble pas jouer de rôle anti-viral contre les *Alphavirus*. En effet, aucun effet n'a été observé dans les modèles cellulaires contre SFV, SINV, CHIKV (Avadhanula et al., 2009; Fragkoudis et al., 2008; McFarlane et al., 2014). L'extinction du gène RelI n'affecte pas non plus la réplication de ONNV dans le modèle *Anopheles gambiae* (Carissimo et al., 2015a). Cela suggère que les virus n'activent pas tous les mêmes voies de l'immunité ou bien qu'il existe d'un inhibiteur de cette voie Toll chez les *Alphavirus* (McFarlane et al., 2014).

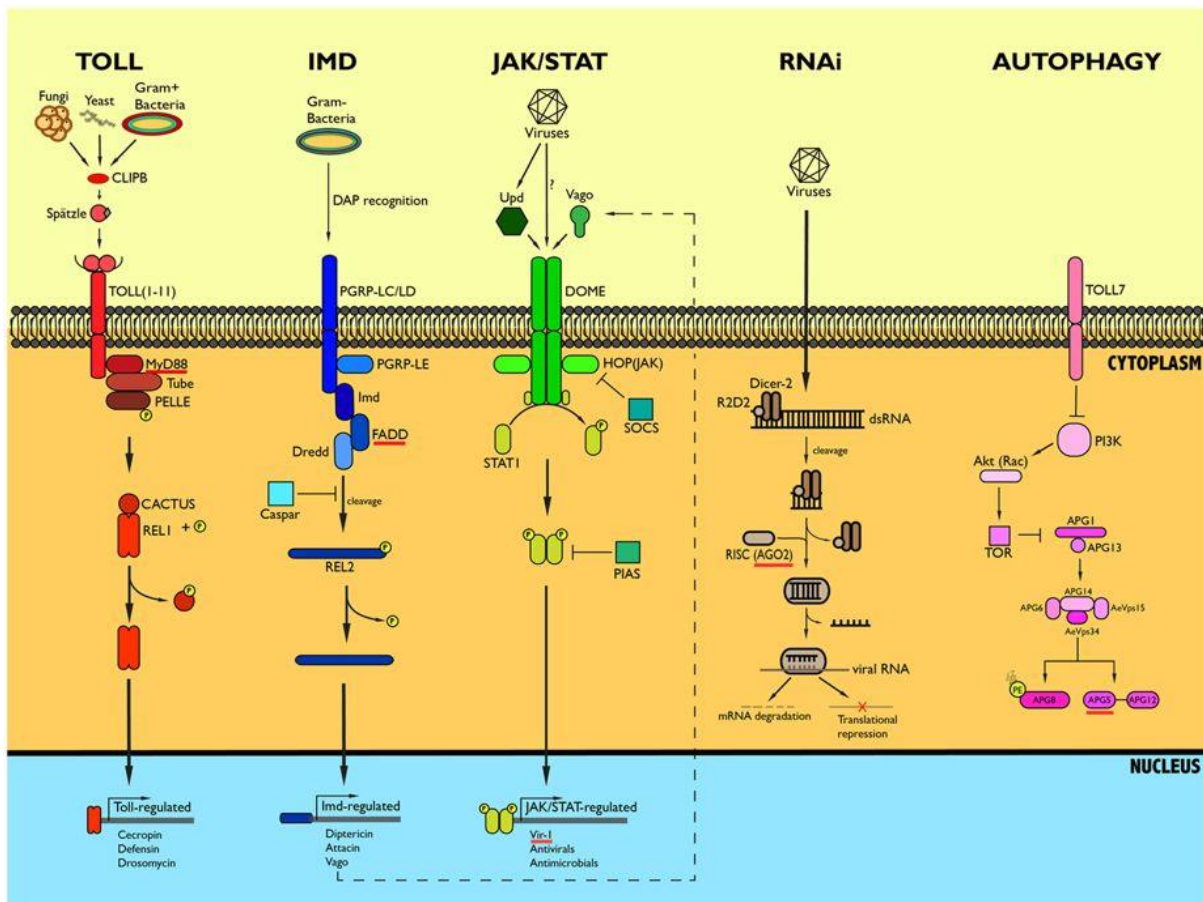


Figure 4: Les principales voies de signalisation du système immunitaire chez *Aedes aegypti*.

Source : (Terradas et al., 2017)

La voie IMD. La voie de la déficience immunitaire (IMD, *immune deficiency*) a d'abord été mise en évidence en tant que mécanisme important de défense de la drosophile contre les bactéries (Georgel et al., 2001). Chez la drosophile, la voie est activée *via* la reconnaissance de PAMPs par des récepteurs membranaires, conduisant à l'activation intracellulaire de protéines adaptatrices telles que FADD (*Fas-associated death domain*) et Imd (*Immune deficiency*) mais aussi d'une voie de signalisation similaire à la voie des kinases c-Jun/JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) des humains (Sluss et al., 1996). Il en résulte un clivage de l'inhibiteur Caspar du facteur de type NF- κ B Rel II, sa translocation dans le noyau et la transcription de facteurs anti-microbiens tels que Diptéricine, Attacine et la protéine Vago (**Figure 4**). La protéine Vago est une protéine sécrétée proche des interférons, qui jouerait potentiellement un rôle amplificateur de la réponse immunitaire (Paradkar et al., 2012). Elle a été décrite comme la protéine la plus up-réglée lors de l'infection de la drosophile par le virus DCV (*Drosophila C virus*) (Dostert et al., 2005). L'activation de cette voie par les virus reste mal décrite, même s'il est établi que chez les moustiques du genre *Culex*, cette activation passe par la détection d'ARN double-brin (ANdb) par l'endonucléase Dicer-2 (Paradkar et al., 2014).

L'activation de la voie IMD a été détectée par transcriptomique suite à l'infection d'*Ae. aegypti* par les virus DENV et SINV (Luplertlop et al., 2011; Sanders et al., 2005). Un test fonctionnel de *silencing* de l'inhibiteur Caspar ou Rel II dans les moustiques a révélé son implication pour réduire l'infection du virus DENV dans l'intestin moyen d'*Ae. aegypti* (Sim et al., 2013) et de ONNV chez *An. gambiae* (Carissimo et al., 2015a) (mais pas lors d'une infection systémique (Waldock et al., 2012)). La stimulation de cette voie par application de lysat bactérien diminue la réplication du virus SFV sur cellules d'*Ae. albopictus* U4.4 (Fragkoudis et al., 2008), confortant le rôle anti-viral de cette voie, au moins pour certains arbovirus.

La voie JAK/STAT. La voie de signalisation impliquant les kinases Janus (JAK) et les facteurs de transcription STAT (*signal transducers and activators of transcription*) a été identifiée à l'origine chez les vertébrés comme une voie qui stimule la production d'interférons (IFN) (Schindler et al., 1992), et impliquée dans la réponse anti-virale (Karst et al., 2003). Chez la drosophile, l'activation de cette voie passe par la fixation de la protéine Upd (*Unpaired*) sur le récepteur Dome (*Domeless*). L'activation et la dimérisation de ce récepteur conduisent à l'activation des Janus kinases associées, provoquant l'activation des facteurs de transcription STAT (**Figure 4**).

Le rôle antiviral de la voie JAK/STAT a été suggéré par des études sur la réaction anti-bactérienne du moustique *An. gambiae*, et la réaction antivirale des drosophiles (Barillas-Mury et al., 1999; Dostert et al., 2005).

Des tests fonctionnels de *silencing* ont montré le rôle anti-viral de la voie JAK/STAT sur l'infection d'*Ae. aegypti* par la DENV et sur l'infection d'*An. gambiae* par ONNV (Carissimo et al., 2015a; Sim et al., 2013). La protéine Vago, sécrétée suite à l'activation de la voie IMD est décrite pour interférer avec la réplication de WNV dans le moustique *Culex* en activant la voie JAK/STAT (Paradkar et al., 2012).

Le mode d'action de ces voies immunitaires est encore mal compris. Leur activation entraîne la production de peptides anti-microbiens, qui ont un rôle anti-viral. La diminution de l'expression de certains peptides provoque une réplication augmentée. Cela a été montré pour les peptides attC (attacine) et dptB (diptéricine) qui contrôlent la réplication du virus SINV chez la drosophile (Huang et al., 2013) et pour les protéines riches en leucine APL1A et APL1C qui contrôlent la réplication de ONNV chez *An. gambiae* (Carissimo et al., 2015a). Mais de manière étonnante, la déplétion de l'effecteur anti-microbien cécropine 3 induit une diminution de la réplication virale dans le même modèle. Pourtant le traitement de cellules avec ces protéines semble freiner la réplication du CHIKV (Luplertlop et al., 2011), et leur expression ectopique grâce à des moustiques transgéniques permet la diminution

de la réplication du virus de la DENV dans l'intestin moyen et le tissu adipeux (Luplertlop et al., 2011; Pan et al., 2012).

Le mécanisme d'action directe de ces peptides sur les arbovirus chez les insectes est mal connu. Certains modes d'action de peptides antimicrobiens sont cependant décrits contre les bactéries ou bien contre d'autres types de virus (rétrovirus, herpesvirus). Certains peptides interagissent directement avec les bicouches lipidiques (enveloppe virale ou membranes bactérienne), en provoquant leur dégradation (Ding et al., 2009; Zhang and Gallo, 2016). D'autres peptides inhibent l'entrée virale en interagissant avec les glycoprotéines de membrane ou les récepteurs comme gp120 et CD4 pour le virus de l'immuno-déficience humaine (VIH) (Ding et al., 2009). La modulation des voies de signalisation intracellulaire par ces peptides peut également conduire à la restriction de la réplication virale ou de l'infection bactérienne (Zhang and Gallo, 2016).

2.2.2 Voies d'interférence par ARN

Il existe trois voies principales d'ARN interférence (**Figure 5**) basées sur l'action de trois types de petits ARN : les micro ARN (ARNmi ou miRNA pour *microRNA*), les petits ARN interférents (ARNsi ou siRNA pour *small interfering RNA*) et les ARN interagissant avec les protéines Piwi (ARN pi ou piRNA pour *Piwi-interacting RNA*). Ces voies sont activées par la présence d'ARN spécifiques soit endogènes, donc produits dans le noyau de la cellule, ou bien exogènes pour des ARN provenant de l'extérieur. La voie la mieux décrite dans le cadre de l'immunité anti-virale chez les insectes est la voie des ARNsi exogènes, qui est reconnue comme fondamentale dans la défense anti-virale (Blair and Olson, 2014). Les voies miRNA et piRNA sont moins bien décrites mais leur rôle dans l'immunité a récemment été soulevé.

La voie des petits ARN interférents. Les petits ARN de cette voie peuvent être produits de manière endogène (endo-ARNsi) ou exogène (exo-ARNsi). La transcription bidirectionnelle de gènes qui se recouvrent ou bien la transcription d'ARN à structure secondaire en tige-boucle permet la production des endo-ARNsi. Les exo-ARNsi sont produits à partir d'ARN double brins issus de la réplication de génomes viraux ou bien d'autres ARN double-brins comme des ARN transfectés. Ces ARN double-brin sont reconnus par la protéine Dicer-2, *via* son domaine hélicase DexD/H-Box. De manière surprenante, ce domaine est aussi partagé par les protéines qui reconnaissent les ARN viraux dans les cellules de vertébrés RIG-I et MDA-5 (Merkling and van Rij, 2013). Dicer-2 possède aussi un domaine endonucléase et clive l'ARN double-brin en petits duplexes de 21 ntp (avec deux ntp 5' sortants), appelés ARNsi. Ces ARNsi sont pris en charge par le complexe protéique RISC (*RNA-induced silencing complex*), suite à l'interaction du complexe Dicer-2/siRNA avec la protéine R2D2 pour les exo-ARNsi et avec un isoforme de la protéine Loquacious (Loqs) pour les endo-siRNA (Hartig et al.,

2009). Un des deux brins (le brin *passenger*) est dégradé par l'endonucléase Argonaute-2 (Ago2), le second brin (le brin *guide*) est conservé et permet l'activation du complexe RISC. Ce complexe peut alors cibler un ARNm portant une séquence complémentaire au brin guide. L'endonucléase Ago2 catalyse le clivage de cet ARNm et entraîne alors une diminution de sa traduction, et donc une diminution de l'expression du gène ou bien ici, une diminution de la réplication du virus.

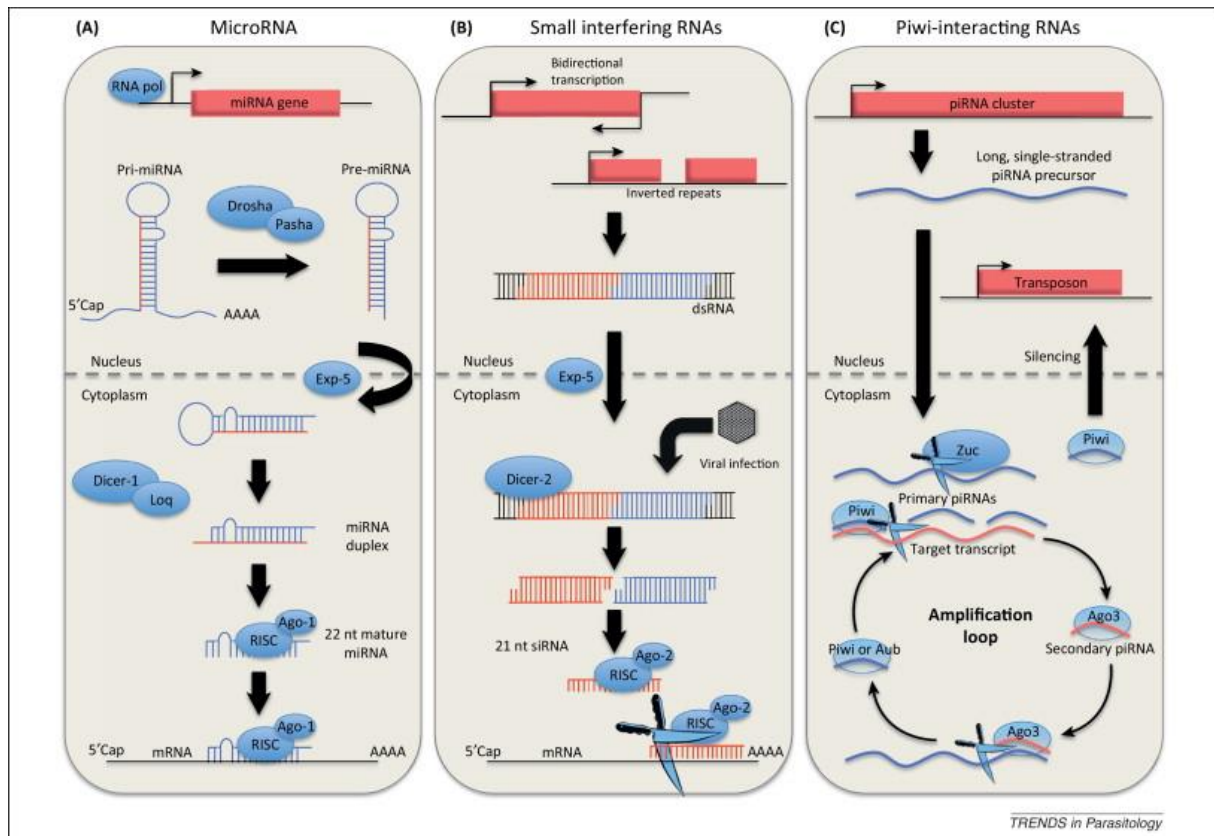


Figure 5: Les trois principales voies de l'ARN interférence. Source : (Lucas et al., 2013)

Cette voie de signalisation est exploitée en laboratoire pour diminuer l'expression de gènes dans de nombreuses cellules et modèles animaux. Le terme *silencing* sera utilisé dans la suite du manuscrit pour faire référence à cette technique. Il est possible de transfecter des longs ARNdb ou directement les petits ARNsi, la seule différence étant la présence ou non de l'étape de clivage par la ribonucléase Dicer-2.

La voie des ARNsi exogènes est une voie de signalisation très conservée chez tous les animaux. Elle joue un rôle anti-viral chez les arthropodes (moustiques, abeilles, mouches, lépidoptères, tiques) (Chejanovsky et al., 2014; Galiana-Arnoux et al., 2006; Jayachandran et al., 2012; Keene et al., 2004; Schnettler et al., 2014) et chez les plantes (Agius et al., 2012). Son rôle anti-viral chez les vertébrés est

moins clair (Jeang, 2012; Petitjean et al., 2018). Cette voie a été découverte par des études chez les plantes puis chez *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998; Jorgensen, 1995).

Cette voie d'interférence par ARN est décrite comme la voie la plus importante de l'immunité anti-virale chez les insectes (Blair and Olson, 2014). De nombreuses études montrent son importance chez le moustique dans la réponse anti-arbovirale. La transfection d'ARNdb ciblant des éléments de la voie elle-même a pu montrer son rôle sur les *Alphavirus* ONNV, CHIKV et SINV (Campbell et al., 2008; Keene et al., 2004; McFarlane et al., 2014), mais aussi sur la DENV (Franz et al., 2006). L'apparition des techniques de génération de moustiques transgéniques a permis de créer des moustiques exprimant un ARN de structure tige-boucle dérivé de la DENV-2, sous contrôle du promoteur de la carboxypeptidase A, activé lors du repas sanguin. L'ARN dérivé du virus est exprimé et pris en charge par la voie d'ARN interférence, conduisant à une inhibition de la réplication du virus (Franz et al., 2006). Ces moustiques transgéniques sont stables sur plusieurs générations et réfractaires à plusieurs génotypes de DENV-2 (Franz et al., 2014). Même si ce type de moustique devrait être amélioré (réfractaire à tous les sérotypes de DENV) avant d'envisager être testés, cela représente une solide preuve de concept pour la lutte anti-vectorielle grâce à des moustiques transgéniques.

Des processus d'inhibition de cette voie par les virus ont été décrits. Par exemple, la protéine B2, du virus *Flock-House* de la drosophile (FHV) se lie directement à l'ARNdb viral. Cela empêche la protéine Dicer-2 de reconnaître l'ARNdb viral et donc de le protéger (Li et al., 2002). L'ARN subgénomique du virus WNV a également été montré comme inhibant le clivage par Dicer-2 (Schnettler et al., 2013b).

La voie des micro ARN. Cette voie est importante pour le développement embryonnaire et la régulation d'expression des gènes chez tous les métazoaires et les plantes (Blair and Olson, 2015). Les petits ARN de cette voie sont uniquement produits de manière endogène, à partir de loci particuliers du génome. Les ARN produits ont une structure tige-boucle, avec un appariement souvent imparfait. La partie ARN double-brin est isolée par clivage d'abord dans le noyau par l'endonucléase Drosha, puis dans le cytoplasme par l'endonucléase Dicer-1 qui produit les ARNmi. De manière similaire à la voie des petits ARN interférents, les ARNmi sont reconnus par le complexe RISC grâce à une protéine Loquacious (Loq) et le complexe RISC clive les ARNm complémentaires grâce à l'endonucléase Argonaute-1 (Ago1).

Des modulations dans l'abondance de nombreux ARNmi est détectée suite à l'infection d'*Aedes aegypti* par les virus DENV, CHIKV, ZIKV (Campbell et al., 2014; Saldaña et al., 2017; Shrinet et al., 2014). Des études ont identifié des ARNmi exprimés suite au repas sanguin ou à l'infection qui semblent avoir un effet pro-viral sur la DENV et anti-viral sur WNV (Hussain et al., 2013; Slonchak et

al., 2014). De plus, des ARNmi ont été identifiés dans la partie non-traduite en 3' de ces mêmes arbovirus (Hussain et al., 2012; Hussain and Asgari, 2014). Cependant, leur mécanisme d'action reste mal décrit, et demande de plus amples recherches (Samuel et al., 2018).

La voie des ARN interrégissant avec les protéines Piwi. Cette voie a été principalement décrite chez la drosophile. Les petits ARN de cette voie sont produits à partir de loci particuliers appelés *piRNA cluster* (Samuel et al., 2018) (**Figure 5**). Ils sont impliqués dans la régulation de la transcription et de la transposition des éléments mobiles du génome dans les cellules germinales et embryonnaires (Blair and Olson, 2015). La production des ARNpi est indépendante de Dicer-2 et repose principalement sur l'activité d'endonucléases de type Piwi, une sous-classe de la famille Argonaute : Zucchini (Zuc), Piwi, Aubergine (Aub) et Ago3. Les transcrits d'éléments mobiles sont ciblés par une protéine de type Piwi, activée par un ARNpi. Le clivage de ce transcrit produit un ARNpi secondaire qui activera une autre protéine de type Piwi pour cliver les transcrits des *piRNA clusters* et créer à nouveau les ARNpi (**Figure 5**), dans un mécanisme dit de « ping-pong ». Les ARNpi font entre 26 et 31 ntp (Vodovar et al., 2012) et possèdent un biais d'identité nucléotidique : une uridine en position 1 (U_1) et une adénine en position 10 (A_{10}). Chez la drosophile, cette voie n'est pas impliquée dans la défense anti-virale (Petit et al., 2016).

Chez les moustiques, les protéines de type Piwi impliquées dans cette voie sont plus nombreuses (Piwi 1-7 et Ago3) et sont largement exprimées dans les cellules somatiques à la différence de la drosophile (Samuel et al., 2018). Les ARNpi sont produits à partir des *piRNA clusters* mais aussi à partir d'ARNm et d'ARN exogènes issus de la répllication virale (Miesen et al., 2016b). Des ARNpi dérivés d'arbovirus ont été décrits dans des cellules de moustiques infectées par le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV, famille *Bunyaviridae*), DENV-2, SINV (Léger et al., 2013; Miesen et al., 2016a; Scott et al., 2010; Vodovar et al., 2012) mais aussi dans des moustiques du genre *Aedes* infectés avec le CHIKV et DENV-2 (Hess et al., 2011; Morazzani et al., 2012).

Cependant, le mécanisme anti-viral à proprement parler de cette voie n'est pas encore parfaitement décrit. La suppression de la protéine Piwi-4 dans les cellules Aag2 provoque une diminution de la répllication du virus de la forêt de Semliki (SFV, genre *Alphavirus*). Paradoxalement, cet effet ne semble pas associé à la production d'ARNpi, on impute donc un effet anti-viral à Piwi-4 indépendant des ARNpi (Schnettler et al., 2013a; Varjak et al., 2017).

2.2.3 Autophagie

Cette voie a été découverte chez la levure (Tsukada and Ohsumi, 1993). Elle maintient l'homéostasie en cas de stress cellulaire mais elle est également impliquée dans la différenciation et le

développement embryonnaire (Mizushima and Levine, 2010). L'autophagie est caractérisée par la formation de vésicules à double membrane autour de complexes protéiques ou d'organelles défailants et la prise en charge de leur transport jusqu'aux lysosomes pour dégradation (Jung et al., 2010) (**Figure 4**).

L'autophagie est stimulée suite à l'infection par un très grand nombre de virus. Cependant, cette voie peut avoir un effet sur le cycle viral différent selon le virus : anti-viral pour le virus Sindbis et les herpesvirus, pro-viral pour certains *Enterovirus*, le virus de l'hépatite C (HCV), ainsi que pour le virus de la dengue. Dans le cas de la DENV, l'autophagie favorise la maturation des virions et permet un apport d'énergie supplémentaire par le phénomène de « lipophagie » (Lennemann and Coyne, 2015). Enfin, lors de l'infection par le virus de la rougeole ou du chikungunya, l'autophagie a un rôle protecteur car elle inhibe la mort par apoptose (Joubert et al., 2012; Lennemann and Coyne, 2015). L'autophagie a également été montrée comme diminuant l'effet pathogène de l'infection par le virus chikungunya *in vivo* dans un modèle souris (Joubert et al., 2012).

Le rôle de l'autophagie sur l'infection virale chez les insectes a surtout été décrit chez la drosophile et très peu chez le moustique (Brackney, 2017). Le rôle majeur de l'autophagie décrit est un rôle protecteur face aux arbovirus. Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV, famille *Rhabdoviridae*) est reconnu par le récepteur Toll7 et induit une inhibition de la voie PI3/AKT (phosphatidyl-inositol 3-kinase), stimulant la fonction d'autophagie chez la drosophile (Nakamoto et al., 2012). Les drosophiles déficientes pour des gènes de l'autophagie succombent rapidement à l'infection par VSV (Nakamoto et al., 2012; Shelly et al., 2009), suggérant un rôle protecteur de l'autophagie. Ce rôle protecteur est aussi décrit lors des infections par RVFV (Moy et al., 2014). Chez le moustique *Aedes aegypti*, de nombreux gènes de l'autophagie sont up-régulés par l'infection par le virus de la dengue (Eng et al., 2016). Ceci corrèle avec une quantité accrue de protéines de l'autophagie détectées dans des souches de moustiques réfractaires à la dengue (Behura et al., 2014). Une validation fonctionnelle par *silencing* de gènes de l'autophagie a montré une charge virale plus importante suite à une infection par la DENV (Eng et al., 2016), suggérant un rôle anti-viral de l'autophagie chez le moustique, comme chez la drosophile.

2.2.4 Réponse immunitaire « adaptative » chez les insectes

L'absence chez les insectes d'éléments comparables à ceux du système adaptatif des vertébrés, comme les lymphocytes ou les anticorps, laisse supposer que les insectes ne sont dotés que d'une immunité innée, sans mémoire aucune, donc sans possibilité de modification de réponse immunitaire d'un individu au cours de sa vie. Différents faits remettent en cause ce principe. En effet, il existe chez la drosophile et chez *An. gambiae* une famille de récepteurs à domaines hypervariables

similaires aux immunoglobulines (DSCAM, *Down syndrome cell adhesion molecule*) (Dong et al., 2006; Zhang et al., 2004). Certains insectes présentent des processus de mémoire, mis en place par des éléments du système immunitaire inné (Kurtz, 2005; Netea et al., 2011). Chez *Aedes aegypti*, une équipe a récemment montré qu'inoculer des virus inactivés antérieurement à l'infection par la DENV induisait une certaine « protection », à savoir des taux de réplication plus bas (Serrato-Salas et al., 2018). L'implication de synthèse d'ADN massive est suggérée comme participant à la mise en place de cette « protection ».

2.3 Passage de la barrière intestinale par les virus

2.3.1 Barrière dépendante de la charge virale

La restriction des virus par les barrières intestinales dépend du titre viral du repas sanguin ingéré. Cet effet dose-dépendant a été décrit très tôt avec l'infection de *Culex tarsalis* par le virus de l'encéphalite équine de l'Ouest (WEEV, famille *Togaviridae*) (Kramer et al., 1981). Le taux d'infection et le taux de transmission varient de manière corrélée au titre viral contenu dans le repas sanguin : 68 % d'infection et 29 % de transmission avec une ingestion de $10^{1.7}$ PFU, contre 96 % d'infection et 96 % de transmission avec une ingestion de $10^{6.1}$ PFU (Kramer et al., 1981). Ce phénomène est relaté pour d'autres virus dans *Aedes aegypti*, comme YFV et DENV (Duong et al., 2015; Miller, 1987; Olmo et al., 2018).

Ce gradient de dissémination pourrait être expliqué par une réponse immunitaire, qui contrôlerait plus efficacement une petite quantité de virus qui se réplique mais perd en efficacité au fur et à mesure que la quantité de virus augmente (Hardy et al., 1983). Alternativement, ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence de « passages » dans la barrière intestinale. Plus la quantité de virus est élevée, plus la probabilité d'infecter une zone proche de ces passages est élevée. L'apparition du concept de quasi-espèces virales ces dernières années (Lauring and Andino, 2010; Rozen-Gagnon et al., 2014) apporte une autre dimension à cette possibilité, discutée dans le paragraphe suivant.

2.3.2 Importance de la diversité virale pour le passage de la barrière intestinale

Les virus à ARN ne sont plus représentés par une seule séquence consensus mais par une multitude de génomes générés par leur ARN polymérase ARN dépendante, sans correction sur épreuve, qui insère en moyenne une mutation par génome (Elena and Sanjuan, 2005). La multitude des mutations confèrerait des caractéristiques phénotypiques différentes aux virions de la population virale, lui donnant une capacité d'adaptabilité à des milieux variés.

Une diminution significative de la variabilité de la population virale a été observée lors de la progression des virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV, famille *Togaviridae*) de l'intestin moyen vers l'hémocœle, puis de l'hémocœle vers les glandes salivaires (Forrester et al., 2012). La diminution de la diversité au passage d'une barrière semble être compensée par la réplication virale ultérieure (Grubaugh et al., 2016). Une étude récente a comparé une population virale capable de dissémination dans le moustique avec une population virale dont la réplication est restreinte à l'intestin moyen (Patterson et al., 2018). Les virus de l'infection disséminée sont beaucoup plus divers que ceux de l'infection restreinte, ce qui suggère que la diversité de la population virale est corrélée avec la dissémination. La barrière intestinale semble donc être infectée puis traversée par un nombre restreint de variants viraux.

2.3.3 Rôle de la voie d'ARN interférence dans le passage de la barrière intestinale

L'importance de la voie d'interférence à ARN a été montrée dans différentes études consacrées au passage de la barrière intestinale. Les conclusions varient en fonction des cas étudiés.

L'ARN subgénomique de WNV a été montré comme inhibant la voie d'interférence par l'ARN (Schnettler et al., 2013b). Une souche de WNV déficiente pour l'ARN subgénomique présente des taux d'infection et de transmission réduits lorsqu'administré par voie orale, mais ne présente pas de différence de réplication lorsqu'injecté dans le thorax (Göertz et al., 2016). La voie d'ARN interférence semble donc contrôler l'infection de WNV dans l'intestin du moustique *Culex pipiens*.

Des moustiques transgéniques avec une voie d'interférence à ARN diminuée présentent des taux d'infection et de transmission augmentés pour les virus SINV et DENV (Khou et al., 2010, 2013). Des moustiques transgéniques cette fois-ci avec une voie d'interférence par l'ARN renforcée présentent un blocage de la DENV (Franz et al., 2006). La voie d'ARN interférence semble donc également contribuer à contrôler également les virus SINV et DENV dans l'intestin moyen d'*Aedes aegypti*.

En revanche, une étude récente montre que cette voie d'interférence à ARN est bien stimulée dans l'intestin moyen d'*Aedes aegypti* infecté par DENV, mais qu'elle n'est pas efficace pour la réduction de la réplication, alors qu'elle est nécessaire à la limitation de la réplication pour une infection systémique (Olmo et al., 2018). L'hypothèse est qu'un effecteur crucial de la voie d'interférence à ARN pour les ARN exogènes, la protéine Loqs2, n'est pas exprimé dans l'intestin moyen et donc rend le processus inefficace dans cet organe. Une hétérogénéité tissulaire de la réponse immunitaire a été décrite également chez *Anopheles gambiae* lors de l'infection par ONNV (Carissimo et al., 2015a).

La voie d'ARN interférence n'affecterait donc pas la réplication du virus dans l'intestin moyen mais serait nécessaire pour contrôler l'infection systémique.

Les premières études de passage de la barrière intestinale se sont penchées d'avantage sur les tissus comme barrière physique. La réflexion partait du postulat que la lame basale qui entoure l'épithélium intestinal est trop dense pour que les virus puissent la traverser, la taille de ses pores étant estimée à 9-12 nm (Hecker and Rudin, 1981). Le diamètre des *Flavivirus* est estimé à 50 nm et celui des *Alphavirus* à 70 nm (Knipe and Howley, 2013). Cela illustre le fait que le mécanisme de passage du virus dans l'hémocœle implique forcément un moyen de contournement ou de modification de cette lame basale. Ces deux solutions sont détaillées par la suite.

2.3.4 Voie du contournement de la lame basale par les trachées

L'épithélium intestinal est isolé de la cavité de l'hémocœle par la lame basale. Cependant, des observations en microscopie électronique ont montré l'association des cellules trachéales et épithéliales chez *Culex pipiens*, observation confirmée chez d'autres insectes (Maina, 1989; Volkman, 1997). Cette organisation suggère une voie d'échappement par les cellules trachéales (Romoser et al., 2004). Cette hypothèse est appuyée par l'identification de sites primaires d'infection lorsque des virus sont injectés dans le thorax dans les cellules musculaires et les trachées, puis par l'identification de virus dans les cellules intestinales après plusieurs cycles viraux (Romoser et al., 2004). Le fait que le virus Sindbis soit capable d'infecter de manière durable les cellules trachéales soutient le fait que ce réseau de trachées présent dans tout l'organisme pourrait être une voie de dissémination (Bowers et al., 1995).

2.3.5 Altération de la lame basale

Les premières observations microscopiques suggérant que les virus pourraient profiter d'altérations de la lame basale lors du repas sanguin pour se disséminer hors de l'intestin moyen ont été faites sur des moustiques du genre *Culex* (Romoser et al., 2004; Weaver et al., 1988).

Cette hypothèse a été reprise et complétée récemment grâce à de nouvelles techniques, sur le modèle d'*Aedes aegypti* infecté avec CHIKV. Des moustiques nourris avec des repas, non pas sanguins, mais salins ou protéinés (contenant de l'albumine bovine) infectés avec le CHIKV présentent des taux d'infection et dissémination à peu près similaires (Dong et al., 2017). Cela indique que l'étirement de la paroi intestinale lors du repas sanguin est important et pas forcément le contenu du repas sanguin. De plus, une surexpression de certaines métalloprotéases est détectée lors des repas sanguins, suggérant un rôle dans la dégradation de la membrane basale (Dong et al., 2017). Ce fait est

appuyé par le fait que la quantité de collagène IV diminue au cours du temps après le repas sanguin et que l'activité globale des métalloprotéases augmente. Ces métalloprotéases ont été caractérisées plus en détail par la suite (Kantor et al., 2017). Des analyses des intestins moyens après repas sanguin par microscopie électronique à balayage révèlent bien des zones dégradées de la lame basale (**Figure 6.A**), en contact avec des cellules trachéales et des cellules musculaires (Kantor et al., 2018). De plus, des virions sont détectés à proximité des cellules musculaires, ayant franchi la première couche de la lame basale (**Figure 6.B**).

Ces données viennent conforter l'hypothèse générale émise par Romoser et ses collaborateurs (Romoser et al., 2004), d'un passage des arbovirus hors de l'intestin moyen par la combinaison de cellules permissives à sa proximité directe, comme les trachées et les muscles, et de zones dégradées de la lame basale.

Les connaissances sur le passage de la barrière intestinale par les virus sont encore minimales. Il semblerait que les mécanismes qui définissent cette barrière soient multiples. Cependant, comme vu dans la première partie, la menace présentée par les arboviroses est grandissante, et nous avons donc besoin d'approfondir ces connaissances pour pouvoir à terme créer des outils efficaces pour lutter contre la dissémination des arbovirus dans leur vecteur, et par conséquent, lutter contre leur propagation au sein des populations humaines.

La partie suivante présente le virus de la fièvre jaune, et plus particulièrement comment il peut servir de modèle pour améliorer la connaissance des mécanismes de franchissement de la barrière intestinale du moustique *Aedes aegypti*.

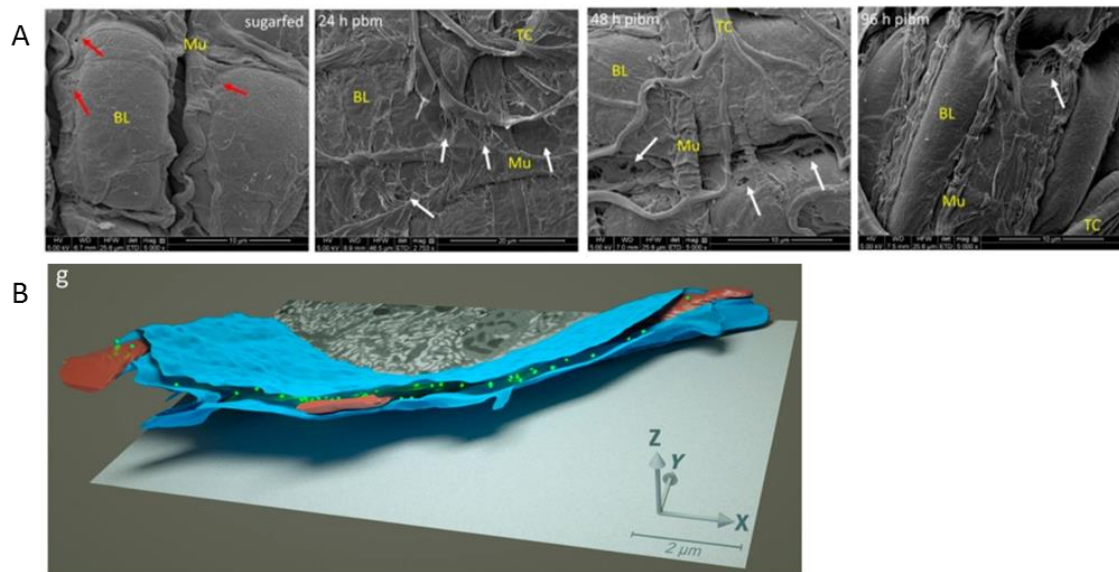


Figure 6: Passage du virus chikungunya par la lame basale étirée lors du repas sanguin et infection subséquente des cellules musculaires.

A) Images de microscopie électronique à balayage montrant l'étirement de la paroi intestinale après un repas sanguin et la destruction partielle de la lame basale. Les images sont prises avant le repas sanguin et 24 h, 48 h et 96 h après le repas sanguin. Abréviations : BL : lame basale ; Mu : muscle ; TC : cellules trachéales ; les flèches vertes indiquent les zones où la lame basale est abîmée.

B) Reconstruction numérique 3D à partir d'images de microscopie électronique à balayage à sonde ionique focalisée. En bleu les lames basales entourant l'intestin moyen, en rouge les muscles et en vert les virions de chikungunya. Source : (Kantor et al., 2018).

3 YFV, un modèle de franchissement de la barrière intestinale

3.1 La fièvre jaune

3.1.1 Emergence de la fièvre jaune

Le virus a été apporté sur le continent américain et en Europe depuis le golfe de Guinée pendant la période du commerce triangulaire des esclaves (Zanotto et al., 1996). Les premiers témoignages d'épidémies de fièvre jaune, aussi appelée *Yellow Jack*, ont été rapportés dans les Antilles en 1647, à la Barbade et à Saint-Christophe (maintenant Saint-Kitts-et-Nevis) (Carter, 1931; Findlay, 1948). Des épidémies touchant les villes portuaires d'Amérique du Sud et du Nord, d'Europe (particulièrement la côte méditerranéenne) ont été décrites jusqu'à la fin du XIX^{ème} siècle, pouvant causer plusieurs milliers de morts comme celle qui a touché Philadelphie en 1793 (5 000 morts) (Eckert, 1993). Les réserves d'eau douce transportées sur les bateaux pendant la traversée de 6 semaines, permettait probablement le cycle de développement du moustique, garantissant l'établissement d'infections sur le bateau et dans le port d'arrivée (Rodhain, 2017). Le virus n'est jamais devenu endémique dans les villes d'Europe et d'Amérique du Nord, à l'inverse des régions d'Amérique du Sud, au climat propice à l'installation du vecteur *Aedes aegypti*.

Maladie et symptômes. L'infection est souvent asymptomatique : des études menées en Afrique donnent des ratios d'infection apparentes sur inapparentes de 7-12:1 (Barrett, 2012). L'infection est dite viscérotropique : elle touche d'abord le foie avant de s'étendre à d'autres organes tels que les reins, la rate, les ganglions lymphatiques et le cœur. Le taux de mortalité peut atteindre 20 % à 60 % selon les régions, les épidémies, et les études épidémiologiques qui ont pu être menées (Monath and Vasconcelos, 2015). Dans les cas d'infections apparentes, trois phases sont décrites :

1) Après une période d'incubation de 3 à 6 jours, la phase d'infection se caractérise par des symptômes grippaux (fièvre, maux de tête, myalgie, nausée).

2) Vient ensuite une période de régression des symptômes ou phase de rémission, synonyme de guérison pour la plupart des patients.

3) Dans les cas sévères, cette période est courte (jusque 48 h) et les patients progressent vers la phase d'intoxication. Les symptômes de cette phase sont alors typiques de la maladie de la fièvre jaune : jaunisse due à l'atteinte hépatique sévère donnant son nom à la maladie et perméabilité vasculaire conduisant à des hémorragies, voire à du vomissement de sang noir (donnant le nom *vomito negro*) (Monath, 1987).

3.1.2 Découverte de la transmission vectorielle à Cuba

Contexte historique. A la fin du XIX^e siècle, d'importantes épidémies ont encore lieu, décimant la population et causant des pertes économiques importantes. Découvrir le mode de transmission de cette maladie était un élément clé pour pouvoir prendre des mesures sanitaires et éviter les épidémies. Les années 1890 sont mouvementées à Cuba, qui se bat contre l'Espagne depuis des décennies pour obtenir l'indépendance. A cette époque, les Etats-Unis (EU) ont développé des relations commerciales étroites (notamment le commerce du sucre) avec Cuba et souffrent des épidémies qui atteignent périodiquement leur côte *via* les transports maritimes. La vallée du Mississippi connaît ainsi en 1878 une des épidémies les plus étendues et meurtrières de fièvre jaune avec 20 000 morts et un coût économique estimé à 100 millions de dollars. En 1898, les EU gagnent l'indépendance de Cuba face à l'Espagne et installent un gouvernement militaire. Un millier de soldats américains périssent pendant l'affrontement, mais 5 000 meurent de maladie, dont la fièvre jaune (Espinosa, 2009). Ceci explique pourquoi les EU s'acharneront à trouver la cause étiologique de la fièvre jaune sur le sol cubain.

Hypothèse de la transmission par le moustique. La première brique de la découverte du mode de transmission de la fièvre jaune est apportée par Patrick Manson (**Figure 7**). Parasitologue, il travaille sur les filarioses à Hong Kong. Il est le premier à décrire le moustique comme vecteur d'une maladie, ici provoquée par la filaire de Bancroft (*Wucheria bancrofti*) (Manson, 1878). Il suggère par la suite que le moustique était également impliqué dans la transmission du paludisme, même s'il se trompait en pensant que les humains contractaient le parasite en se baignant dans de l'eau souillée par les œufs de moustiques. Probablement inspiré par les découvertes de Manson, le médecin cubain Carlos Finlay (**Figure 7**) développe la théorie de la transmission de la fièvre jaune par le moustique dès 1881 (Finlay, 1881). Il fait partie d'une première commission sanitaire envoyée par les EU visant à prouver ce mécanisme et à diminuer la transmission sur le territoire cubain. Finlay réalise des expériences de transfert de la maladie d'individus malades à individus sains via la piqûre de moustique. Il ne parvient pas à transmettre la maladie aux 88 individus sains testés entre 1881 et 1893. On comprendra par la suite que c'est parce que le temps entre les deux piqûres de moustiques était trop court pour qu'ils soient compétents et transmettent le virus. Son erreur a été d'émettre l'hypothèse d'une transmission mécanique et non biologique (Finlay, 1886).

La période d'incubation extrinsèque. Le médecin épidémiologiste, Henry Rose Carter (**Figure 7**), envoyé à Cuba en tant que médecin de quarantaine pour les bateaux arrivant au port semble apporter la pièce manquante au système. Il est le premier à décrire la « période d'incubation extrinsèque » pour la fièvre jaune, c'est-à-dire extrinsèque à l'humain, dans l'environnement, qu'il croit être transmetteur. Il l'a décrit comme le temps écoulé entre un individu infecté et une infection

secondaire et l'estime entre 2 ou 3 semaines (Carter, 1900). La définition de l'incubation extrinsèque évoluera un peu par la suite pour être celle que l'on connaît aujourd'hui (§ 2.1.1).

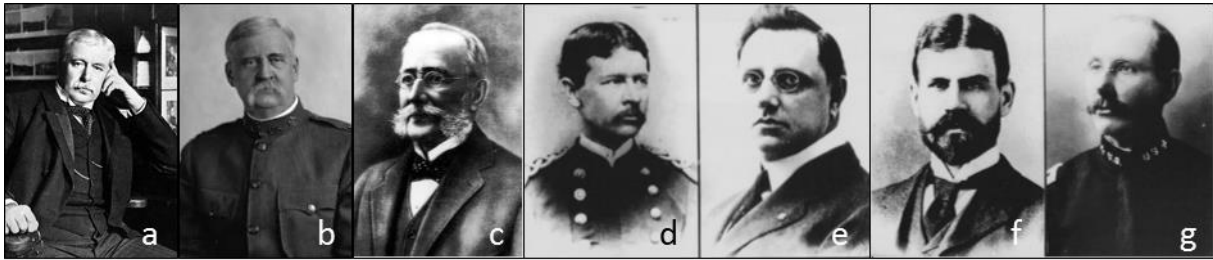


Figure 7: Principaux contributeurs à la découverte du mode de transmission de la fièvre jaune.

a) Patrick Manson b) Henry Rose Carter c) Carlos Finlay d, e, f, g) Membres de la Commission Reed : de gauche à droite : Walter Reed, Aristide Agramonte, Jesse Lazear et James Carroll. Sources : photo de P. Manson, Wikipédia, autres photos, (Chaves-Carballo, 2005).

Preuve de la transmission par le moustique. Une seconde commission américaine, *The Yellow Fever Commission*, dirigée par W. Reed en collaboration avec J. W. Lazear, J. Carroll et A. Agramonte (**Figure 7**), fut envoyée à Cuba en 1900. C'est cette commission, influencée par les avancées récentes, et les discussions notamment avec deux médecins britanniques (H. Durham et W. Myers) de passage sur leur route vers le Brésil, qui réussira les expériences fonctionnelles de transmission de la fièvre jaune d'un individu malade à un individu sain par la piqûre du moustique *Aedes aegypti* (Reed et al., 1901a, 1901b, 1900). Ces montages expérimentaux étaient réalisés avec des membres de la commission et des volontaires militaires, parfois au prix de leur vie (ex : J. Lazear, décédé de fièvre jaune, septembre 1900). Plus tard, ces résultats furent confirmés par transmission du virus au singes *via* le moustique, par l'équipe d'Adrian Stokes, en Afrique (Stokes et al., 1928a, 1928b).

Controverses. De nombreuses personnes ont participé au processus de découverte du mode de transmission du virus de la fièvre jaune. Beaucoup de controverses existent à propos de la paternité des idées et des expériences importantes qui ont mené à ces découvertes fondatrices de l'arbovirologie et de l'entomologie médicale. Walter Reed hérite de tous les honneurs dans beaucoup d'écrits. Un premier livre, écrit par François Delaporte (Delaporte, 1989), conteste ce point de vue et mène l'enquête. Il sera complété par des écrits plus récents (Clements and Harbach, 2017; Espinosa, 2009; Spielman and D'Antonio, 2001).

Début de la lutte anti-vectorielle. Cette découverte a mené à des mesures de lutte anti-vectorielle très efficaces, mises en place par W. C. Gorgas. La destruction des moustiques adultes et à leur stade larvaire, mais aussi la mise en quarantaine des malades de fièvre jaune et la surveillance des mouvements portuaires (Carter, 1931), a permis d'éliminer les cas de fièvre jaune de l'île de Cuba en 5 mois. Ces mesures et leur contrôle par W. C. Gorgas permirent également de limiter les épidémies

qui frappèrent les troupes américaines qui construisaient le canal de Panama en 1904 (Spielman and D'Antonio, 2001) (voir **Figure 8**).

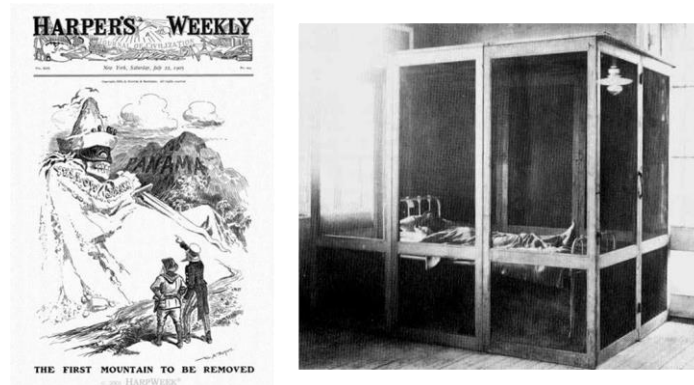


Figure 8: La fièvre jaune pendant la construction du canal de Panama.

a) "The First Mountain to Be Removed." Une du Harper's Weekly, juillet 1905, par W.A. Rogers. b) chambre d'isolement des cas de fièvre jaune, Panama 1905. (Image, www.canalmuseum.com)

3.1.3 Découverte de l'étiologie de la maladie et création du vaccin

Agent étiologique viral. L'identification de différentes bactéries (*Bacillus icteroides* ou *Leptospira icteroides*) dans les échantillons prélevés sur des malades laissèrent longtemps penser qu'elles étaient l'agent étiologique de la fièvre jaune (American Association for the Advancement of Science, 1899; Stokes et al., 1928a). J. Carroll et A. Agramonte étaient d'ailleurs spécialement envoyés au sein de la Commission Reed pour analyser l'implication de *B. icteroides* dans la maladie (Clements and Harbach, 2017). En 1898, le filtre de Chamberland permet la découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac. Suivra ensuite la découverte du virus du syndrome pied-main-bouche (genre *Enterovirus*). En 1902, la commission Reed démontre que l'agent étiologique de la fièvre jaune est filtrable et donc assimilable à un virus (Reed et al., 1901b). Il faudra encore quelques années pour officialiser la nature virale de la maladie.

Isolement du virus. Une nouvelle commission américaine est mobilisée en 1926, en Afrique cette fois, pour étudier la clinique et l'épidémiologie de la fièvre jaune : *West African Yellow Fever Commission of the Rockefeller Foundation*. L'hypothèse de l'origine bactérienne de la maladie n'est pas encore écartée. Les tentatives pour la cultiver et l'isoler à partir du sang des malades sont multiples. D'abord sur milieu de culture, puis sur différents animaux : cochon d'Inde (décrit comme susceptible à *Leptospira icteroides*), lapin, souris, rat, chiot, chaton, chèvre et singe africain. Aucun ne développa de symptôme. Le directeur de la commission décida d'importer au Ghana des singes originaires de pays lointains de l'Afrique (depuis une ferme au Pays-Bas) : Inde et Brésil. En 1927, c'est finalement l'inoculation du sang de Monsieur Asibi, patient ghanéen atteint d'un cas de fièvre jaune modéré, à un macaque (*Macacus rhesus*) qui permit l'obtention du premier cas de fièvre jaune

reproduit chez un animal. La souche a été isolée par infection de 30 singes successifs *via* injection de fluides corporels filtrés. Le fait qu'aucune bactérie n'est observée dans les singes infectés confirme que l'agent pathogène est bien un virus. (Stokes et al., 1928a, 1928b) Ces articles fondateurs furent publiés après la mort d'Adrian Stokes, décédé de fièvre jaune en septembre 1927. La souche YFV-Asibi est encore aujourd'hui la souche de référence. La souche française de la fièvre jaune viscérotropique (YFV-FVV) est également isolée en 1927, à Dakar au Sénégal, à partir du sang d'un patient syrien, Monsieur Mayali.

Le vaccin YFV-FNV. Le vaccin vivant atténué neurovirulent français YFV-FNV a été développé à l'Institut Pasteur de Dakar, au Sénégal, en 1932 (Sawyer et al., 1932). La souche YFV-FVV a été passée sur cerveau de souris 128 fois, 237 passages au total avant d'être testé. Les singes montrent une viscérotropie diminuée mais une neurovirulence augmentée. Le premier essai clinique a été mené en 1931, pendant lequel le virus était administré avec du sérum immun pour limiter la propagation du virus. Un deuxième essai clinique sans sérum aboutit à la première campagne de vaccination dans les colonies françaises en 1941 (virus entre passages 237 et 260 administré sans sérum, par scarification). L'utilisation du vaccin YFV-FNV a été interdite par l'OMS en 1980 à cause du fort taux d'encéphalite associé à la vaccination (3-4 cas pour 1 000 vaccinés), surtout chez les enfants (avec 38 % de cas mortels). L'adaptation du virus au cerveau des souris explique probablement ces encéphalites (Wang et al., 1995).

Le vaccin YFV-17D. Max Theiler, à l'Institut Rockefeller de New York, a développé le vaccin vivant atténué YFV-17D, par passages multiples de la souche YFV-Asibi sur différents tissus (**Figure 9**). Les 18 premiers passages ont été réalisés sur tissus embryonnaires de souris, montrant perte progressive de virulence chez le macaque (Theiler, 1930). 158 passages ont ensuite été effectués sur des tissus embryonnaires de poulet, utilisés dans un premier temps dans leur intégralité puis sans les tissus nerveux (cerveau et moelle épinière). Ce qui a donné la souche YFV-17D, correspondant au 176^{ème} passage au total. A ce stade, Theiler a montré que le virus présentait un neurotropisme et viscérotropisme atténué chez le macaque, tout en se répliquant et induisant une réponse immunitaire (M Theiler and Smith, 1937). La perte de viscérotropisme dans les macaques est apparue entre les 89^{ème} et 114^{ème} passages. La perte de neurovirulence chez les souris est apparue entre les 114^{ème} et 176^{ème} passages. Les premiers tests cliniques, réalisés sur 4 volontaires (dont les auteurs) déjà immuns, puis sur 8 volontaires non-immuns, ont montré une protection par production d'anticorps accompagnée de faibles symptômes (M. Theiler and Smith, 1937). Les propriétés d'atténuation de cette souche se sont révélées stables pour les passages suivants. La diffusion de ce vaccin a débuté très rapidement, avec la vaccination de 50 000 brésiliens dès la fin de l'année 1937 (Benchimol, 2013). Max Theiler a obtenu le prix Nobel de Médecine en 1951 pour son travail.

En 1945, l'OMS a certifié deux souches en tant que stocks de base (*seed stock*) pour la production mondiale : la souche YFV-17DD (passage 195) et la souche YFV-17D-204 (passage 204). La souche YFV-17DD a été cultivée jusqu'au passage 243 puis produite sur œufs embryonnés de poulet pour donner le vaccin utilisé actuellement (passage 286). La souche YFV-17D-204 a été cultivée jusqu'au passage 221 sur tissus embryonnaires de poulet puis sur œufs embryonnés de poulet pour donner la majorité des vaccins produits dans le monde. Dans les années 1970, une contamination avec le virus de la leucose aviaire (ALV) a été découverte dans des doses de vaccin produites sur des œufs infectés. En 1977, l'Institut Robert Koch en Allemagne a préparé de nouveaux stocks de base pour l'OMS à partir du passage 236, appelés 17D-213-77. Il est référencé dans la littérature comme 17D-213, mais représente en fait la souche 17D-204. Ces stocks sont certifiés sans ALV. Aujourd'hui, 4 producteurs sont agréés par l'OMS : Institut Pasteur du Sénégal ; Bio-Manguinhos au Brésil ; Institut Chumakov de la Poliomyélite et des Encéphalites virales en Russie et Sanofi Pasteur en France (WHO, 2011b). Sanofi Pasteur aux EU et l'Institut Wuhan des Produits Biologiques en Chine produisent aussi des doses de vaccin. Ce vaccin est l'un des plus sûrs et efficaces jamais créés. Depuis 75 ans, plus de 650 millions de doses ont été distribuées (Barrett, 2016). En 2013, l'OMS a déclaré qu'une seule dose procurait une immunité pour la vie (WHO, 2014b).

3.1.4 Ré-émergence actuelle

La fièvre jaune est endémique dans 34 pays d'Afrique et 13 pays d'Amérique du Sud (Wilder-Smith and Gubler, 2008), où sa circulation se fait principalement par cycle sylvatique entre les primates non-humains (PNH) et les moustiques (voir paragraphe 3.3.1). Des cas humains sont régulièrement rapportés. On distingue les cas de fièvre jaune sylvatique et urbains. Les cas de fièvre jaune sylvatiques sont contractés par des personnes travaillant ou habitant en bordure de forêt ou de zone marécageuse. L'humain est alors un hôte accidentel du cycle sylvatique entre les moustiques et les singes. Ces cas représentent la grande majorité des cas en Amérique du Sud, la fièvre jaune ayant été quasiment éradiquée des villes. La plus récente épidémie urbaine date de 1928 (Soper, 1965). En Afrique, au cycle sylvatique s'ajoutent les cycles rural et urbain. Les cycles urbains impliquent les humains et les moustiques domestiqués, principalement *Aedes aegypti*, et sont à l'origine des épidémies de fièvre jaune. Grâce à d'importantes campagnes de vaccination, l'OMS et l'Organisation panaméricaine de la santé, ont permis de diminuer drastiquement le nombre de cas de fièvre jaune dans le monde. En 2015, l'Afrique de l'Ouest ne présentait plus d'épidémie, alors qu'elle était la région historique de la majorité des cas (Barrett, 2018). En 2013, l'OMS estimait à 80 000 – 200 000 le nombre de cas de fièvre jaune et à 30 000 – 60 000 le nombre de morts par an (WHO, 2018c). Cependant des

épidémies importantes ont été enregistrées depuis 2016 dans des zones déclarées sans fièvre jaune auparavant au Brésil et en Afrique.

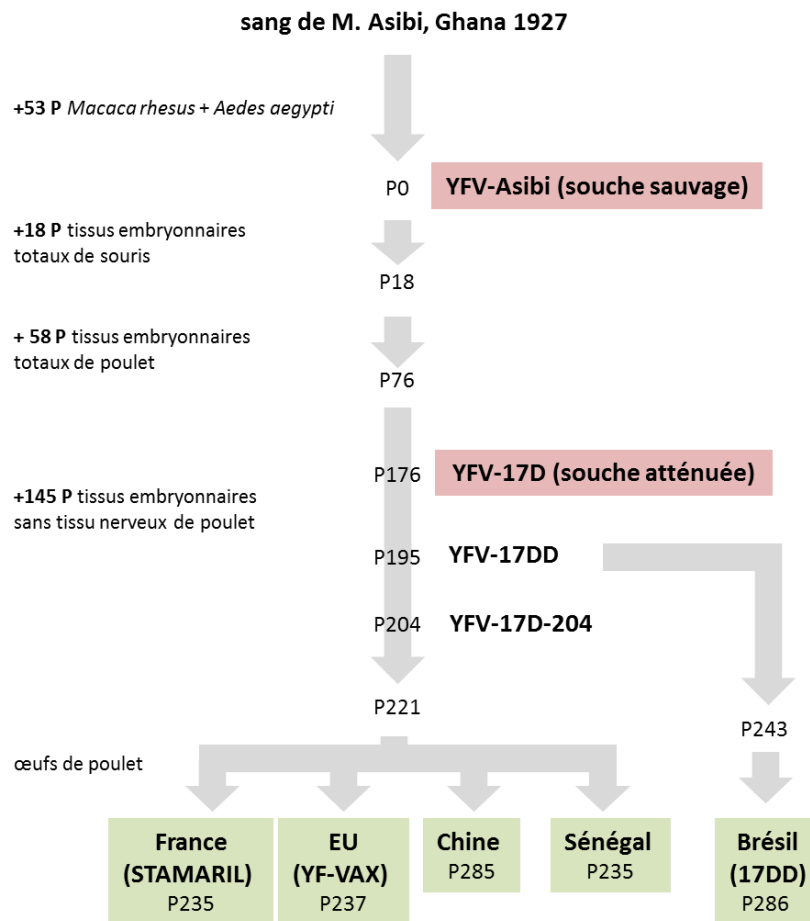


Figure 9: Historique simplifié des passages des vaccins YFV-17D et YFV-17DD.

La souche sauvage YFV-Asibi est issue du passage du sang d'un patient atteint d'un cas non-sévère de fièvre jaune dans des singes (*Macaca rhesus*) et moustiques (*Aedes aegypti*). La souche atténuée YFV-17D est obtenue par 176 passages dans des tissus embryonnaires de souris et de poulet. Les vaccins produits en France, EU, Chine et Sénégal sont issus de la souche YFV-17D-204 (P204), passée de nouveau sur tissus embryonnaires puis œufs embryonnés de poulet pour la production. P, passage. Sources : (Monath, 2005; M Theiler and Smith, 1937; M. Theiler and Smith, 1937).

Une épidémie s'est déclarée en Angola en décembre 2015 et s'est étendue en République Démocratique du Congo (RDC). 4 000 cas sont suspectés, dont 900 sont confirmés provoquant 400 morts (WHO, 2016b, 2013a). L'Ouganda rapporte également une épidémie en 2016 (WHO, 2013b), plus restreinte et due à un génotype différent de celui d'Angola (Hughes et al., 2018). Les différentes introductions dans de nouveaux territoires sont inquiétantes car elles laissent présager de nouvelles épidémies. En 2017, le Nigeria, pourtant zone bénéficiant d'un programme vaccinal, rapporte également une épidémie : 341 cas sont suspectés et 45 décès sont rapportés (WHO, 2017).

Au Brésil, des épidémies importantes ont eu lieu en 2016-2017 et 2017-2018 : 576 cas confirmés dont 184 morts pour la période 2016-2017 et 1257 cas confirmés dont 394 morts pour la période 2017-2018 (Possas et al., 2018). Les analyses épidémiologiques suggèrent une propagation de l'épidémie (2016-2017) sur un axe Nord-Sud, probablement dans le cycle sylvatique, avec de multiples introductions créant les cas humains, sans mise en jeu d'un réel cycle urbain. La menace de ré-urbanisation de la maladie, due à la mauvaise couverture vaccinale et à la présence de vecteurs compétents est cependant bien présente (Faria et al., 2018).

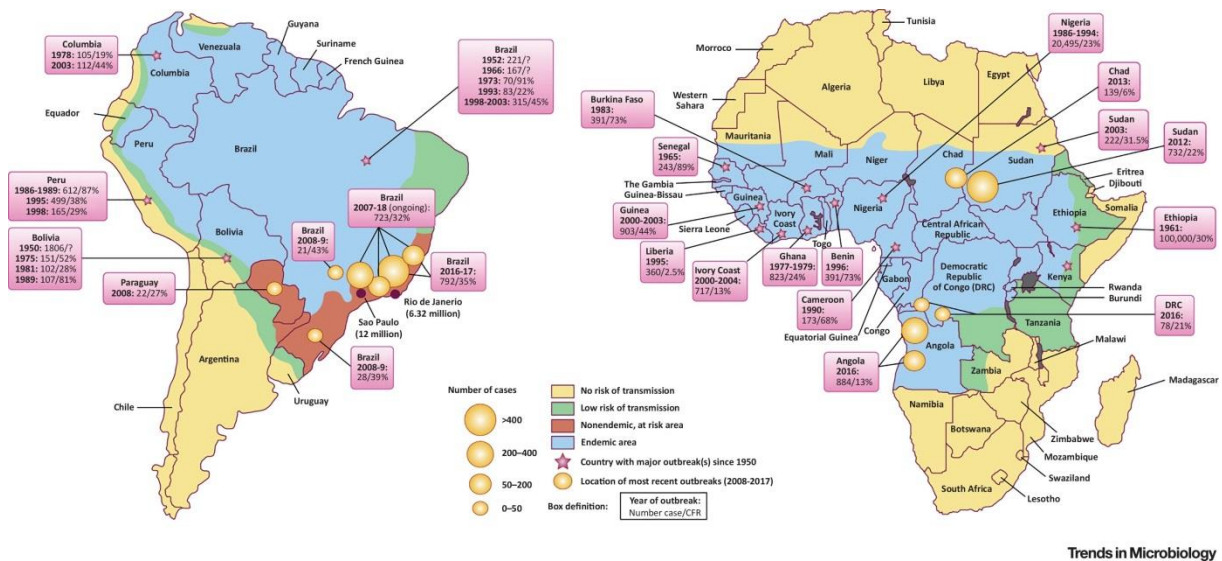


Figure 10: Régions endémiques de YFV et distribution des principales épidémies depuis 1950.

En bleu, région endémiques ; en rouge, les régions à risque de transmission ; en vert les régions à faible risque; en jaune, les régions sans risque de transmission. Les pays ayant rapporté des épidémies majeures de fièvre jaune sont indiqués avec une étoile rose, informations épidémiologiques : Pays, date, nombre de cas/taux de mortalité. Pour certaines épidémies, la taille des ronds jaunes est proportionnelle au nombre de cas rapportés. Image adaptée de (Douam and Ploss, 2018) (Kwagonza et al., 2018)

Au Brésil et en Afrique Centrale, ces épidémies ont eu lieu dans des zones où la vaccination n'était pas recommandée auparavant, dû à l'absence de fièvre jaune endémique (Song et al., 2018) (Possas et al., 2018). La très grande quantité de vaccin qui a été utilisée pour ces épidémies a causé des ruptures de stock en 2016 à trois reprises (Barrett, 2016), suggérant une réorganisation du système de production et une meilleure anticipation des épidémies à venir. L'administration d'une fraction de dose (1/5^{ème}) au lieu d'une dose complète a pu permettre de vacciner d'avantage de personnes, tout en apportant la protection nécessaire. Une dose vaccinale serait encore efficace jusqu'à une dilution de 1/50^{ème} (Campi-Azevedo et al., 2014).

Le nombre de cas importés dans des pays étrangers lors de ces épidémies est aussi inquiétant. Huit cas d'importation par des voyageurs ont été rapportés en Europe en 3 ans (**Figure 2**). Le risque de

développement d'épidémies est faible compte tenu de l'absence d'*Aedes aegypti* et de la faible densité d'*Aedes albopictus* (dont certaines souches ont cependant été montrées compétentes pour YFV (Johnson et al., 2002; Barry R. Miller et al., 1989)). La Chine a récemment dénombré 11 cas de fièvre jaune, importés par des travailleurs chinois revenant d'Angola (Song et al., 2018). C'est la première fois que des cas sont déclarés en Asie, terrain où la fièvre jaune ne s'est jamais installée, pour des raisons encore mal comprises (Barrett and Higgs, 2007).

L'OMS a mis en place un programme qui vise à éliminer la maladie de la fièvre jaune d'ici 2026 (EYE, *Eliminate Yellow Fever Epidemics*) (WHO, 2018d).

3.2 Biologie moléculaire et cellulaire du virus de la fièvre jaune

3.2.1 Structure

Virion. Les virions possèdent une structure sphérique, de 50 nm de diamètre (Knipe and Howley, 2013). YFV est un virus enveloppé, présentant sa glycoprotéine d'enveloppe (E) et la protéine de membrane (M) enchâssées dans une bicouche lipidique riche en phosphatidylsérine. Le génome est protégé dans la capsid. Le virion et la capsid possèdent une structure icosaédrique (pseudo-icosaédrique pour le virion) avec 180 protéines E et 180 protéines C pour un nombre de triangulation $T = 3$. (**Figure 11**).

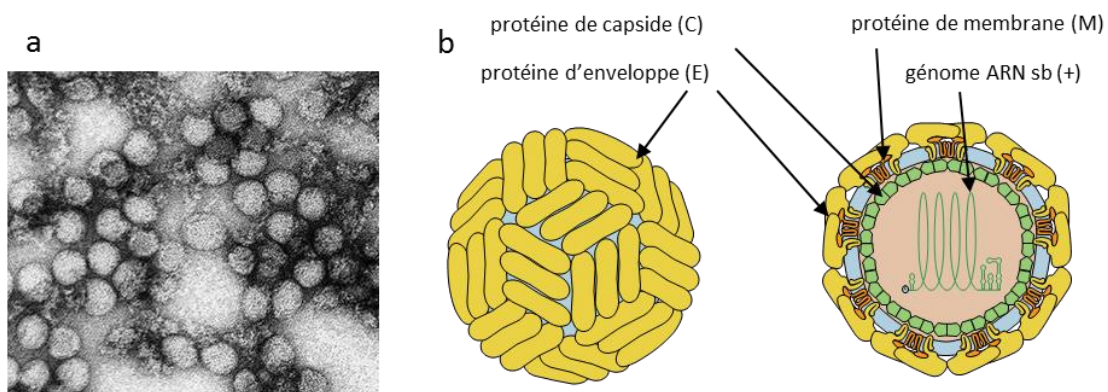


Figure 11: structure de la particule virale de YFV.

a) microscopie électronique en transmission (MET) de particules virales de YFV (image CDC, Erskine Palmer, 1981). b) structure du virion des *Flavivirus*. Les dimères d'enveloppe sont arrangés en trimères. Les protéines E et M sont enchâssées dans la bicouche lipidique. Les protéines C forment une capsid de symétrie icosaédrique ($T=3$) qui renferme le génome virale ARN simple brin de polarité positive (image adaptée de ViralZone).

Génome. Le génome de YFV est un ARN simple brin de polarité positive (ARN sb +), d'environ 10.8 kilobases, présentant une coiffe de type I (m7Gppp) à son extrémité 5' (Zhou et al., 2007) mais pas de queue polyA à son extrémité 3' (Wengler et al., 1978). La coiffe est importante pour l'initiation de la traduction et la protection du génome des exonucléases 5'-3' cellulaires (Cleaves and Dubin,

1979). Cet ARN correspond à un seul cadre ouvert de lecture, encadré en 5' et 3' par des régions non-traduites de respectivement 118 et 508 bases (Rice et al., 1985). Ces régions, riches en structures secondaires, sont nécessaires pour la réplication de l'ARN et pour la traduction de la polyprotéine (Corver et al., 2003; Ng et al., 2017). Cette polyprotéine virale est clivée de manière co- et post-traductionnelle en 10 protéines virales. Les 3 protéines structurales sont localisées dans la partie 5' : protéine de capsid (C), protéine précurseur de la protéine de membrane (prM) et la protéine d'enveloppe (E). Les protéines non-structurales (NS), localisées en 3', sont au nombre de sept : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 (**Figure 12**).

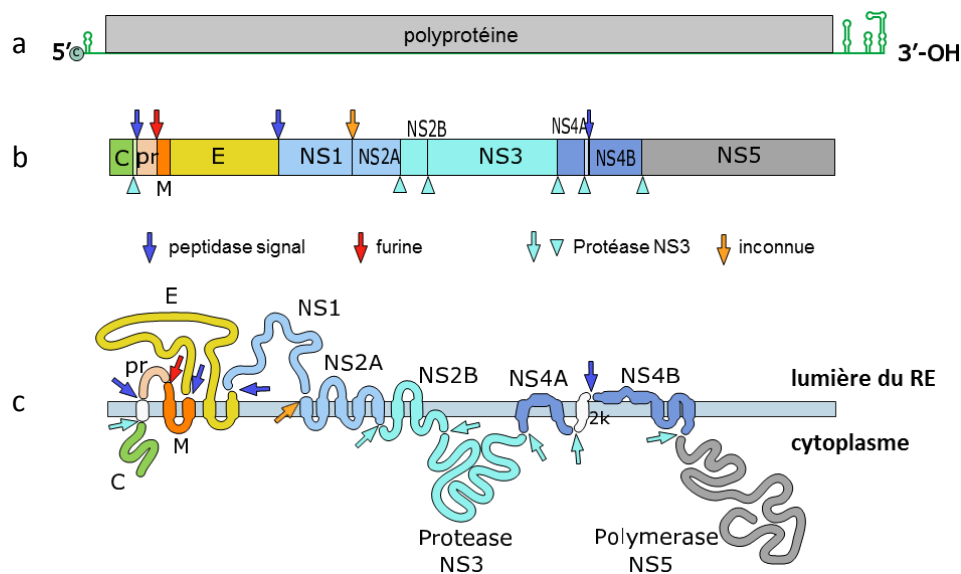


Figure 12: Structure génomique de YFV.

a) structure du génome. b) clivage de la polyprotéine grâce à la protéase virale NS3 et son co-facteur NS2B, et aux protéases cellulaires peptidase signal et furine. c) organisation des protéines dans la membrane du RE et sites de clivage (image adaptée de ViralZone).

3.2.2 Phylogénie

Un seul sérotype existe pour YFV, permettant probablement la protection à vie d'un individu contre l'ensemble des souches. Les souches sauvages ont été classées en 7 génotypes, différents de plus de 9 % à l'échelle nucléotidique (Mutebi et al., 2001) (**Figure 13**). Les génotypes sont associés à des zones géographiques : 3 génotypes circulent dans la région Centrale/Est de l'Afrique, 2 génotypes dans la région Centrale/Ouest de l'Afrique et 2 génotypes en Amérique du Sud. Toutes ces souches sont homologues mais présentent jusqu'à 25 % de divergence nucléotidique. Les liens phylogénétiques entre les différentes lignées confortent l'origine ouest-africaine des souches ayant colonisé le continent américain, pendant le commerce triangulaire des esclaves (Lepiniec et al., 1994). Ces études ont également permis d'estimer que l'ancêtre commun de toutes ces lignées aurait émergé en Afrique

Centrale entre 700 et 1 200 avant le premier génotype (Beck et al., 2013; Sall et al., 2010). Aujourd'hui, l'étude phylogénétique des souches de YFV permet de mieux comprendre l'origine des ré-émergences observées depuis 2016, en Afrique du Sud-Ouest et au Brésil. Dans les deux cas, les sources épidémiques semblent multiples : 2 génotypes différents ont été identifiés en Afrique (Hughes et al., 2018) et plusieurs signatures génétiques différentes traduisant plusieurs cycles sylvatiques ont été identifiées au Brésil (Gómez et al., 2018; Mir et al., 2017; Moreira-Soto et al., 2018).

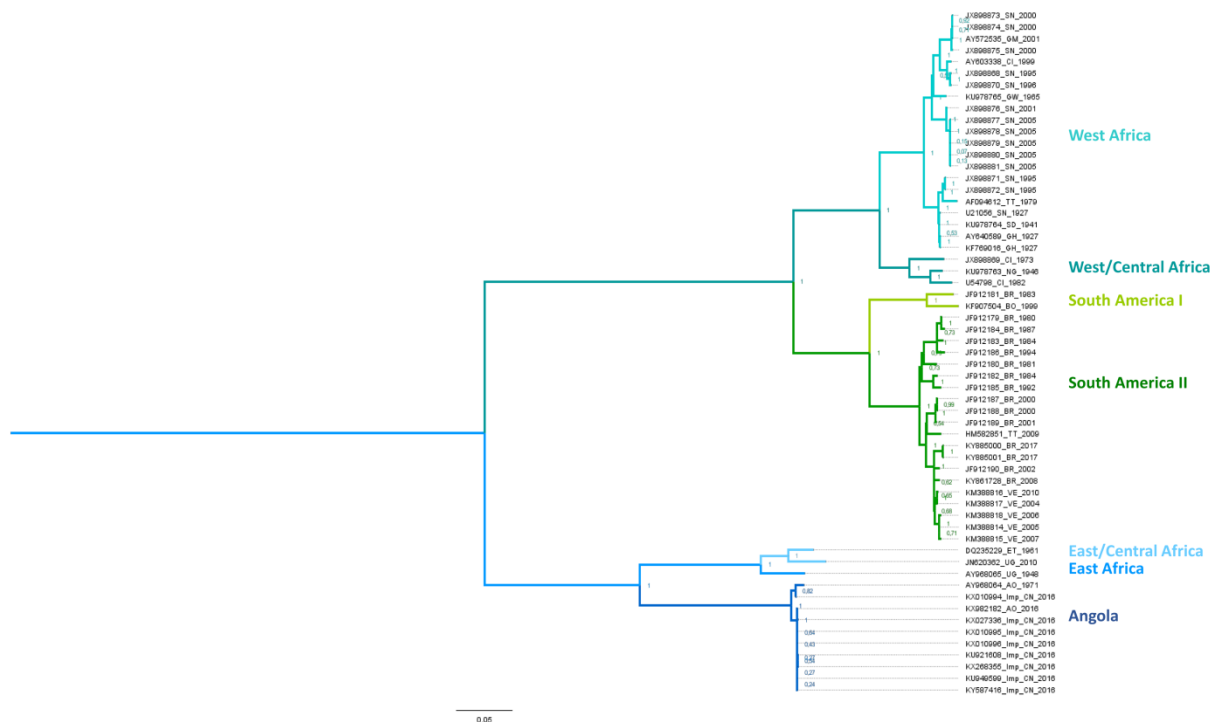


Figure 13: Relations phylogénétiques entre les souches de YFV.

Arbre construit avec 59 séquences codantes (acides aminés) de YFV. Les 7 génotypes sont identifiés avec différentes couleurs. Le regroupement entre les 3 génotypes d'Afrique Centrale/Ouest et les 2 génotypes d'Amérique du Sud indique bien la provenance des souches américaines. Séquences de souches ré-émergentes : le génotype Angola contient des séquences isolées en Angola en 2016 et le génotype Amérique du Sud II contient des séquences isolées au Brésil en 2017. Source : (Klitting et al., 2018).

3.2.3 Cycle viral

Les *Flavivirus* partagent des stratégies de réplication similaires. Les observations faites chez un virus sont communément extrapolées à l'ensemble des virus du genre *Flavivirus*. Il y a cependant des différences observées entre les virus, voir même les souches, comme l'illustrent les différents mécanismes d'entrée utilisés par les souches YFV-Asibi et YFV-17D (Fernandez-Garcia et al., 2016). Les différentes étapes de la réplication virale dans les cellules de mammifère sont illustrées sur la **Figure 14**.

Attachement. L'entrée de YFV dans la cellule hôte se fait, dans un premier temps par la reconnaissance des glycoprotéines d'enveloppe par des facteurs d'attachement non-spécifiques, tels

que les glycosaminoglycanes de type héparane sulfate (Germi et al., 2002; Kim et al., 2017) et le récepteur CD300a aux phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines (Carnec et al., 2016). Ces molécules participent probablement à la concentration des virions à la membrane avant l'attachement aux récepteurs spécifiques. Les récepteurs aux phosphatidylsérines des familles TIM (*T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing proteins*) et TAM (TYRO3, AXL et MER) (Jemielity et al., 2013; Meertens et al., 2012) ainsi que des récepteurs kinases couplées aux protéines G (GRKs) (Le Sommer et al., 2012) interviennent dans l'entrée de YFV-17D *via* la reconnaissance des phosphatidylsérines exposés à la surface du virion.

Entrée par endocytose, fusion et décapsidation. Après l'attachement, les virions de la souche Asibi sont internalisés par endocytose *via* un mécanisme classique dépendant de la clathrine tandis que les virions de la souche YFV-17D sont endocytés par une voie mal caractérisée indépendante de la clathrine (Fernandez-Garcia et al., 2016). La maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs s'accompagne d'une acidification des vésicules, ce qui provoque un réarrangement des protéines E et une fusion entre la membrane virale et cellulaire. La glycoprotéine d'enveloppe des *Flavivirus* est une protéine de fusion de classe II : le changement de conformation expose à l'extérieur la boucle de fusion située sur le domaine II qui était auparavant dissimulée au centre du dimère de protéine E. Les protéines E ne sont plus assemblées en dimères mais en trimères (Smit et al., 2011). Cette fusion permet la libération de la capsidie dans le cytoplasme. Les mécanismes conduisant à la dissociation des protéines de capsidie et à la libération du génome dans le cytoplasme sont mal connus.

Traduction. La traduction de l'ARN viral se fait dès la décapsidation, grâce à la coiffe en 5', reconnue par le facteur d'initiation eucaryote 4E (eIF4E) qui recrute par la suite les ribosomes. Ce système pourrait ne pas être l'unique moyen d'initier la traduction pour les *Flavivirus*. En effet, le virus de la dengue a été montré capable d'initier la traduction en absence du facteur eIF4E, de manière indépendante d'un site d'entrée interne du ribosome (IRES, *internal ribosome entry site*) (Edgil et al., 2006). L'unique cadre de lecture est traduit en une polyprotéine de 3 411 acides aminés (Rice et al., 1985) enchâssée dans la membrane du RE. Au cours de sa synthèse, elle est clivée en 10 protéines virales par la protéase virale NS3 et des protéases cellulaires. La peptidase signal cellulaire agit dans la lumière du RE tandis que la protéase virale NS3 et son cofacteur NS2B agissent du côté cytoplasmique (**Figure 12**).

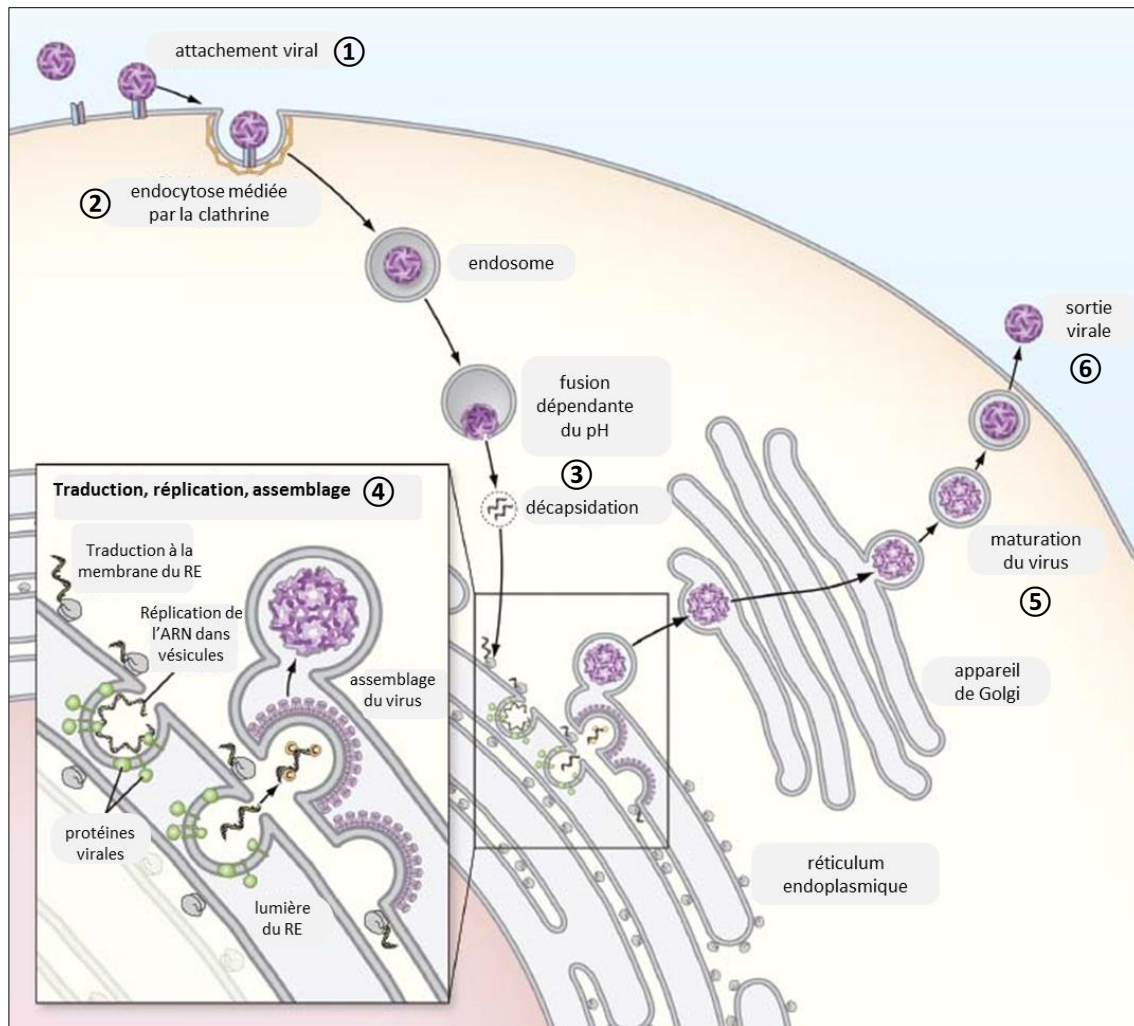


Figure 14: Cycle viral des *Flavivirus*.

① Attachement du virus à la cellule par des facteurs d'attachement généraux et liaison à des récepteurs spécifiques de la famille TIM-TAM. ② Endocytose médiée par la clathrine (Asibi) ou non (YFV-17D) ③ fusion dépendante du pH dans les endosomes tardifs, libération de la capsid dans le cytoplasme et décapsidation. ④ Dans des vésicules issues d'invaginations de la membrane du réticulum endoplasmique (RE), processus couplés de traduction de l'ARN génomique ARN sb (+), réplication *via* un intermédiaire de réplication ARN sb (-), assemblage du virion et encapsidation. ⑤ Maturation du virion par augmentation du pH dans l'appareil de Golgi et par le clivage de prM en M par la protéase furine. ⑥ Sortie virale du virion mature par exocytose. Libération de NS1 soluble. (image adaptée de Fields, sixth edition, 2013)

Vésicules de réplication. Les protéines virales néo-synthétisées induisent des invaginations de la membrane du RE, en forme de vésicules d'un diamètre de 80 à 150 nm. Ces structures ont été observées sur les biopsies de singes et sur des cellules hépatocytaires Huh7.5 infectés respectivement avec YFV-Asibi et YFV-17D (Hanners et al., 2016; McGavran and White, 1964). Ces vésicules de réplication ou VP (*vesicle packets*) permettent à la fois de concentrer les facteurs cellulaires et viraux assurant la traduction et la réplication, et également d'isoler les composants viraux qui pourraient être détectés par les senseurs cytoplasmiques du système immunitaire.

Réplication et encapsidation. La réplication a lieu dans ces vésicules dérivées du RE grâce au complexe de réplication combinant l'ARN génomique viral, l'ARN polymérase virale ARN dépendante NS5, l'hélicase virale NS3 ainsi que les autres protéines non-structurales et probablement des facteurs cellulaires. La NS5 reconnaît la structure tige-boucle SLA située dans le 5'UTR du génome qui agit comme un promoteur. La circularisation du génome par reconnaissance de séquences complémentaires entre l'extrémité 5' et le 3'UTR permet à la NS5 d'interagir avec l'extrémité 3' et d'initier la synthèse du brin complémentaire de polarité négative ARN sb (-) (Ng et al., 2017). L'ARN db produit est dissocié par la NS3. L'ARN sb (-) sert de matrice pour la production de nouveaux ARN sb (+) (Clyde et al., 2006). La réplication est un processus asymétrique, la majorité des ARN synthétisés dans la cellule infectée sont des ARN sb (+), qui servent à la réplication, mais surtout à la traduction de nouvelles protéines et à l'encapsidation dans les virions. L'encapsidation du génome est mal décrite à ce jour pour tous les *Flavivirus*, mais se produit probablement de manière concomitante à la réplication (Khromykh et al., 2001). L'interaction entre la capsid, protéine basique et les acides nucléiques chargés négativement doit favoriser l'encapsidation (Ma et al., 2004). Les protéines de capsides joueraient par ailleurs un rôle de chaperonne dans l'acquisition de la structure secondaire de l'ARN sb (+) (Ivanyi-Nagy et al., 2008; Pong et al., 2011). Des études de mutagenèse sur les protéines NS2A et NS3 (sans toucher à la fonction protéolytique de cette dernière) ont pu montrer leur implication dans l'encapsidation (Murray et al., 2008).

Assemblage, maturation et exocytose des virions. La nucléocapside bourgeonne dans la lumière du RE et acquiert par ce processus son enveloppe lipidique dans laquelle sont enchâssées prM et E. A ce stade les virions sont immatures et non-infectieux. La protéine prM agit comme une chaperonne pour E, l'empêchant de subir le changement de conformation à pH acide qui provoque la fusion membranaire dans l'endosome (Mackenzie and Westaway, 2001). La maturation a lieu pendant le transit des virions dans l'appareil de Golgi par deux phénomènes : l'augmentation du pH et clivage protéolytique de prM en M mature par la protéase furine. La maturation entraîne la dissociation des hétérodimères prM-E et la formation des homodimères de E. Les virions sont alors matures et infectieux (Mukhopadhyay et al., 2005). Ils présentent une surface lisse (*smooth*) à l'inverse de la surface hérissée de pointes (*spiky*) des virions immatures (**Figure 15**, images de DENV).

Les virions sortent de la cellule par un mécanisme d'exocytose, donc non lytique (Mukhopadhyay et al., 2005). Cependant, certaines cellules comme les cellules Vero meurent de l'infection par YFV, permettant un titrage de stocks viraux par la technique de plaque de lyse. L'exocytose des virions s'accompagne de la libération dans le milieu extérieur des peptides pr clivés ainsi que de la protéine NS1 soluble (Amorim et al., 2014).

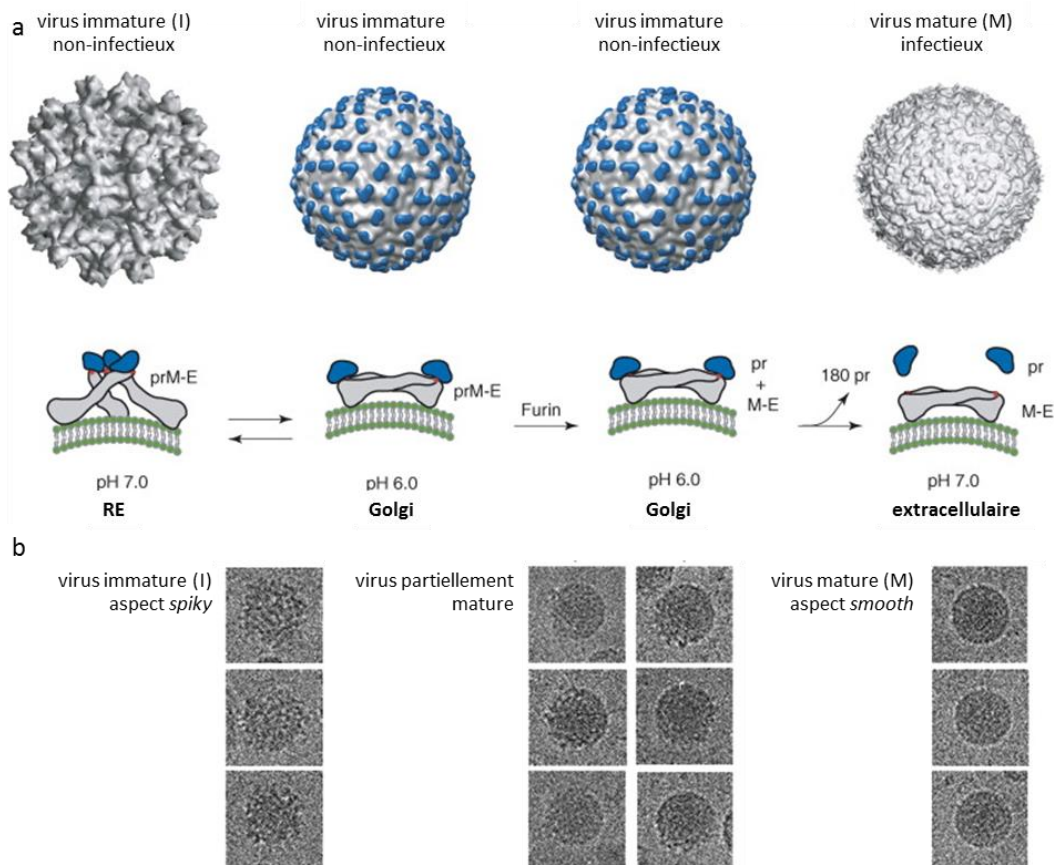


Figure 15: Maturation des particules de *Flavivirus*.

Les documents présentés proviennent d'études réalisées sur le virus de la dengue. a) processus de maturation des virions. En bleu le peptide pr, en gris les protéines E et M. Dans le réticulum endoplasmique (RE) se trouvent les particules immatures (I), qui subissent un premier réarrangement avec le changement de pH dans l'appareil de Golgi, puis un second suite au clivage du peptide pr par la protéase furine. Les particules matures (M) sont relâchées dans le milieu extracellulaire. Source : (Junjhon et al., 2010) b) La maturation n'est pas un processus à 100 % efficace. Des virions avec différentes structures peuvent être observés : virions immatures (I) à l'aspect *spiky*, virions matures à l'aspect lisse ou *smooth*, et des virions partiellement matures avec une surface partiellement lisse. Source : (Perera and Kuhn, 2008).

3.3 Transmission des souches vaccinale et clinique par le moustique *Aedes aegypti*

3.3.1 Les moustiques vecteurs de la fièvre jaune

Le virus de la fièvre jaune est transmis dans 3 types de cycles différents, correspondant à des écosystèmes particuliers (Douam and Ploss, 2018) (**Figure 16**).

Le cycle sylvatique. Il se déroule dans la forêt tropicale. Les moustiques zoophiles vivant dans la canopée transmettent le virus aux primates non-humains (PNH). Ce cycle existe en Afrique et en Amérique du Sud. Le virus est transmis par les moustiques *Aedes africanus* (Afrique) et les moustiques du genre *Haemagogus* et *Sabethes* (Amérique du Sud) (**Figure 17**).

Le cycle rural. Ce cycle n'existe qu'en Afrique, dans des écosystèmes de savane humide, proches de la forêt. Des moustiques zooanthrophiles du genre *Aedes* piquent à la fois des PHN et des humains, créant une zone d'émergence pour le virus de la fièvre jaune.

Le cycle urbain. Ce cycle existe en Afrique et en Amérique du Sud, donnant lieu aux épidémies. Le moustique anthropophile *Aedes aegypti* (et *Ae. bromeliae* en Afrique de l'Est) est responsable de la transmission du virus aux humains (**Figure 16**). Le programme d'éradication pan-américain d'*Aedes aegypti* a permis de déclarer le Brésil libre de ce vecteur en 1957 (Soper, 1965). La fièvre jaune avait alors été quasiment éliminée des cycles urbains et seuls les cycles sylvatiques demeuraient (Amaku et al., 2011). Depuis, le moustique *Aedes aegypti* s'est progressivement ré-installé (Câmara et al., 2011) et serait un facteur favorisant les nouvelles épidémies. La colonisation de l'Amérique du Sud par *Aedes albopictus* dès les années 80 (Carvalho et al., 2014) et sa compétence démontrée en laboratoire (Barry R. Miller et al., 1989) (Johnson et al., 2002) en ferait également un facteur aggravant pour la survenue d'épidémies (Couto-Lima et al., 2017).

Transmission verticale. Le virus de la fièvre jaune est par ailleurs maintenu dans l'environnement par sa transmission verticale de la femelle à la progéniture (Fontenille et al., 1997).

Dans notre projet de recherche, la dissémination des deux souches de YFV est étudiée dans le vecteur principal responsable des cycles urbains : *Aedes aegypti*. Nous disposons au laboratoire de la souche *Aedes aegypti* Paea, isolée en Polynésie Française en 1960. Cette région n'est pas endémique pour la fièvre jaune, mais la souche Paea s'est révélée être un bon modèle de dissémination pour les *Flavivirus* et en particulier pour YFV, pour lequel elle a été utilisée comme témoin positif de dissémination (Lourenço-de-Oliveira et al., 2002)

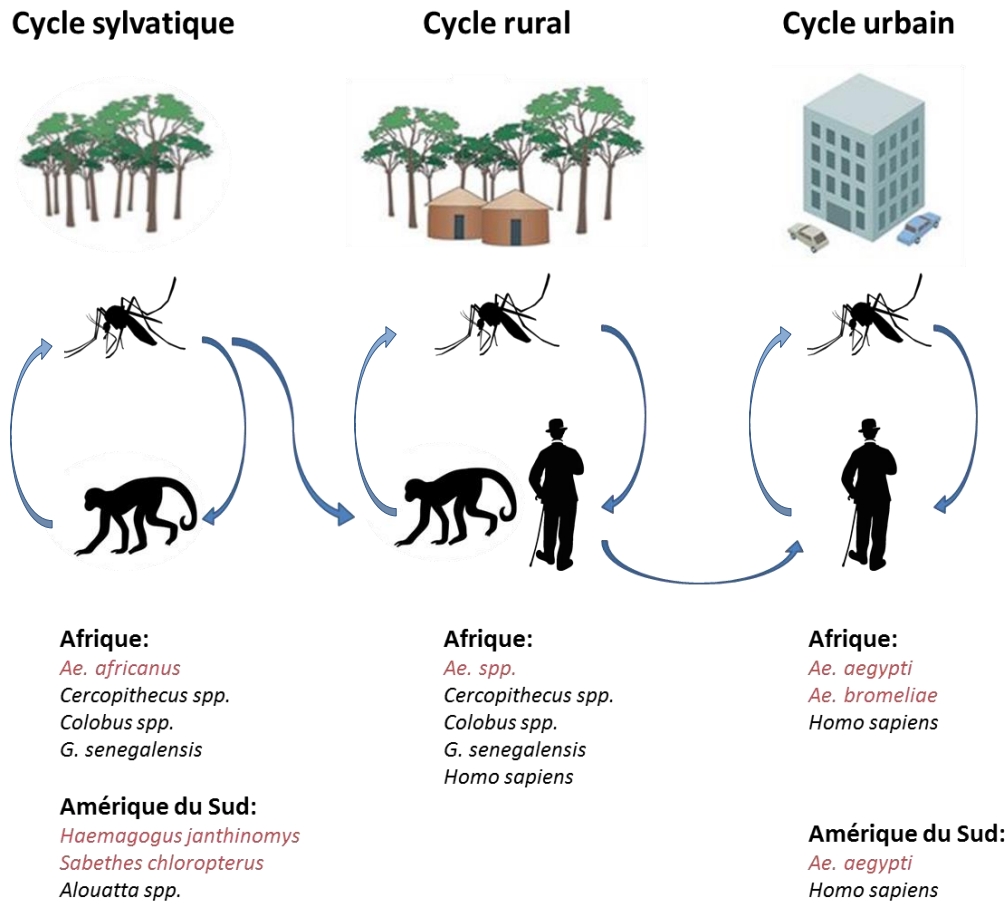


Figure 16: Cycles de transmission de YFV.

Les cycles sylvatique et urbain sont retrouvés en Afrique et en Amérique du Sud. Le cycle rural n'existe qu'en Afrique. En rouge, les espèces de moustiques impliquées dans la transmission aux hôtes mammifères, indiqués en noir. Spp. signifie plusieurs espèces. Précision des espèces d'*Aedes* impliquées dans les cycles ruraux d'Afrique : *Ae. bromeliae*, *Ae. taylori*, *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. metallicus*, *Ae. opok*, *Ae. vittalus*, *Ae. simpsoni complex*. Sources : (Vasilakis et al., 2011; Vasilakis and Weaver, 2017).



Figure 17: Principaux vecteurs de YFV.

a et b) Vecteurs de YFV dans les cycles sylvatiques d'Amérique du Sud : *Haemagogus janthinomys*, Source : (Da Costa Vasconcelos, 2003) et *Sabethes Chloropterus*. Source : www.flickr.com/pbertner. c) Vecteur principal dans les cycles urbains, *Aedes aegypti*. Source : VectorBase James Gathany, CDC)

3.3.2 Dissémination des souches cliniques et vaccinales de YFV dans *Aedes aegypti*

La souche clinique de référence est la souche YFV-Asibi. En isolant cette souche par inoculation sur singe, Stokes et ses collaborateurs l'ont également « cultivée » par passages successifs sur des moustiques *Aedes aegypti*, utilisant ainsi leur capacité de transmission et à être infecté de manière permanente (Stokes et al., 1928a). Suite au développement du vaccin YFV-17D par Max Theiler en 1937, des tests de transmission de cette souche vaccinale ont été réalisés, révélant une compétence vectorielle nulle des moustiques (Whitman, 1939). La dissémination de la souche vaccinale YFV-FNV a également été testée dans les moustiques *Aedes*. Leur compétence vectorielle est fortement diminuée, sans être nulle pour autant (Davis et al., 1932).

Ces différences de dissémination ont été reproduites des décennies plus tard sur la souche *Ae. aegypti* Rexville (isolée à San Juan, Puerto Rico). La transmission n'était plus vérifiée de manière expérimentale par l'apparition de la maladie chez le singe piqué par les moustiques mais par détection des antigènes viraux par immunofluorescence sur des broyats de tête (Miller and Adkins, 1988). Ces auteurs rapportent des taux de dissémination de 94 % pour YFV-Asibi et de 3 % pour YFV-17D, et de transmission de 71 % pour YFV-Asibi et de 0 % pour YFV-17D. Ces résultats seront confirmés plus tard dans cette même souche Rexville avec 45 % d'infection et 0 % de transmission pour la souche YFV-17D (Jennings et al., 1994).

Ces différences de dissémination nous ont poussé à étudier les phénotypes de dissémination des deux souches YFV-Asibi et YFV-17D dans notre modèle moustique, la souche Paea. La souche YFV-Asibi n'ayant pas le profil de dissémination attendu, nous avons choisi d'utiliser une autre souche clinique, la souche YFV-Dakar HD 1279 (YFV-Dakar). Cette souche a été isolée depuis un patient au Sénégal en 1965. La dissémination de la souche YFV-Dakar a été testée sur des population d'*Aedes aegypti* isolées dans différents endroits du Sénégal (Dickson et al., 2014). Les taux d'infection varient de 11 à 57 % et des taux de dissémination sont souvent nuls, atteignant 3 et 17 % pour deux populations seulement. Cette souche semble se disséminer plutôt mal dans les souches de moustiques du Sénégal, bien que la souche Dakar fût isolée à un endroit proche. Cette souche YFV-Dakar n'a notamment jamais été testée dans la souche Rexville utilisée par beaucoup de laboratoires américains, ni sur la souche Paea utilisée dans ce projet de thèse. Elle a en revanche été très bien caractérisée en tant que modèle de souche de YFV pathogène chez le macaque (Engelmann et al., 2014).

3.3.3 Première analyses des facteurs de dissémination de YFV

Virémie de l'hôte au moment du repas sanguin. La virémie des humains contractant un virus de la fièvre jaune sauvage ou étant vacciné est très différente. La charge virale ne dépasse pas

10^2 PFU/mL chez les personnes vaccinées, alors qu'elle peut atteindre 10^6 - 10^9 PFU/mL chez une personne infectée par une souche clinique (Barrett and Teuwen, 2009; Martins et al., 2013; Slifka, 2014). Le phénomène de barrière intestinale est dépendant de la quantité de virus ingéré comme décrit plus haut (§ 2.3.1). Ce phénomène pourrait donc expliquer que les souches vaccinales ne soient pas transmises par les moustiques dans des conditions réelles de vaccination sur le terrain. Ce qui est intéressant, c'est que, lorsqu'on augmente artificiellement le titre viral des repas sanguins des moustiques, les mêmes profils de dissémination sont obtenus (McElroy et al., 2006a, 2006b), indiquant que les déterminants moléculaires viraux ont bien un rôle dans la mise en place ou non de la barrière intestinale.

Déterminants viraux. Le développement de clones infectieux à la fois pour YFV-17D (Bredenbeek et al., 2003) et pour YFV-Asibi (McElroy et al., 2005) a facilité la maîtrise des gorgements de moustique au laboratoire. Afin d'identifier les gènes qui sont impliqués dans la dissémination des virus hors de l'intestin moyen, l'équipe de S. Higgs a mis au point des clones infectieux chimériques entre les souches YFV-Asibi et -17D (McElroy et al., 2006a, 2006b). L'infection de la souche de moustiques *Ae. aegypti* Rexville avec ces chimères suggèrent une implication dans la dissémination hors de l'intestin moyen des protéines structurales E et C, et plus particulièrement du domaine DIII de la protéine E (McElroy et al., 2006b). Les protéines structurales NS2A et NS4B joueraient aussi probablement un rôle (McElroy et al., 2006a). Ces résultats sont cependant à prendre avec précaution sachant que les flavivirus chimères se répliquent moins bien que les virus non modifiés (Mason et al., 2006).

Déterminants du moustique. Les interactions entre les protéines virales et les protéines de la machinerie cellulaire sont multiples. Si les protéines non-structurales jouent un rôle dans la dissémination du virus vers la cavité de l'hémocoèle, on peut émettre l'hypothèse les protéines non-structurales des deux souches virales interagissent avec des partenaires protéiques cellulaires qui leur sont spécifiques. Les déterminants génétiques du moustique affectant la dissémination de YFV ont été étudiés *via* la sélection à partir de la souche *Ae. aegypti* Rexville, d'une souche de moustique réfractaire à YFV (0 % dissémination), et d'une souche très susceptible (RexD, 83 % dissémination). Les croisements ultérieurs de ces souches de moustiques montrent que les allèles qui définissent la susceptibilité ou la résistance sont co-dominants (Miller and Mitchell, 1991).

Déterminants d'infection grâce aux études à haut débit. Les méthodes d'analyse à haut-débit ont pu permettre la mise en évidence de facteurs qui sont surexprimés ou sous-exprimés lors de l'infection par des arbovirus. Ces facteurs ont parfois pu être reliés au phénomène de passage de la barrière intestinale.

Beaucoup d'analyses de transcriptomique (par *microarray* ou séquençage RNA-Seq) ont été réalisées sur des échantillons (soit des moustiques entiers, soit des intestins moyens, soit des cellules) infectés par la DENV (Behura et al., 2011; Bonizzoni et al., 2011; Chauhan et al., 2012; Koh et al., 2018; Sánchez-Vargas et al., 2009; Xi et al., 2008), et récemment, par ZIKV (Etebari et al., 2017) et CHIKV (Dong et al., 2017). Cette dernière étude transcriptomique sur des intestins moyens a conduit à l'identification des métalloprotéases comme facteur potentiel favorisant la dissémination du virus du chikungunya hors de l'intestin moyen, peut-être *via* à la dégradation de la lame basale lors du repas sanguin (Kantor et al., 2018, 2017) (voir § 2.3.5).

Une étude transcriptomique par *microarray* sur des extraits de moustiques entiers infectés par injection intrathoracique avec les *Flavivirus* WNV, DENV ou YFV (Colpitts et al., 2011), a pu mettre en évidence des gènes régulés de manière similaire dans les trois infections : 20 gènes up-régulés et 15 gènes down-régulés. Pour le cas précis de l'infection par YFV, de nombreux gènes voient leur expression régulée de plus d'un facteur 10 : 63, 22 et 21 gènes respectivement aux jours 1, 2 et 7 post-gorgement. Tous ces gènes sont difficiles à caractériser, ils sont décrits comme faisant partie de processus tels que le transport, processus métabolique, et certains ont une capacité à se lier aux ions ou une activité protéase (Colpitts et al., 2011).

Une étude transcriptomique menée par Zhu et ses collaborateurs analyse la réponse de moustiques infectés par injection intrathoracique avec 6 virus de différentes familles : *Flavivirus*, *Alphavirus* et *Orthobunyavirus* (Zhu et al., 2017). La mise en évidence de 19 gènes up-régulés au jour 6 post-infection par tous les virus a permis de révéler l'importance de la voie du neurotransmetteur acide γ -aminobutyrique (GABA) pour l'infection par les arbovirus. Cette voie, activée lors du repas sanguin, semble inhiber la voie immunitaire IMD et favoriser la réplication de ces arbovirus (Zhu et al., 2017).

Certaines analyses protéomiques ont été réalisées sur des cellules infectées par des arbovirus, tels que CHIKV, DENV et ZIKV (Lee and Chu, 2015; Patramool et al., 2011; Xin et al., 2017), d'autres ont aussi analysé la réponse de l'intestin moyen et des glandes salivaires à l'infection par CHIKV (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2012, 2010). Ces deux dernières études ont utilisé une méthode de séparation des protéines par électrophorèse en 2 dimensions suivie de l'identification des protéines modulées par l'infection par spectrométrie de masse. L'infection des intestins moyens par le virus de la dengue ou du chikungunya au jour 7 post-gorgement provoque la modulation de 18 protéines pour la dengue et 12 pour le chikungunya. Pour les deux types d'infection, ces protéines sont impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène, le catabolisme des sucres et des lipides ainsi que la production d'énergie (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2010). L'infection par le virus du chikungunya provoque la modulation de 13 et 20 protéines aux jours 3 et 5 post-infection respectivement. Ces

protéines sont impliquées dans la prise du repas sanguin, l'immunité et plus généralement dans les voies de signalisation et les processus métaboliques (Tchankouo-Nguetcheu et al., 2012).

Aucun article n'a publié de résultats particulièrement sur la réponse de l'intestin moyen à l'infection par le virus de la fièvre jaune.

Objectifs du projet de recherche

Ce projet de recherche s'inscrit dans un but global d'approfondir les connaissances sur les interactions entre les arbovirus et leurs vecteurs. La détermination des facteurs viraux et du moustique qui contrôlent la transmission des virus pourra permettre à l'avenir de développer des outils pour empêcher la transmission d'un virus dans son vecteur et donc d'empêcher la propagation des arboviroses parmi la population humaine.

Nous avons choisi d'analyser particulièrement la barrière intestinale, grâce à deux souches du virus de la fièvre jaune qui n'ont pas le même profil de dissémination chez *Aedes aegypti* souche Paea: YFV-17D et YFV-Dakar.

Le premier objectif de ce travail est d'améliorer la caractérisation du profil de réplication et de dissémination de ces deux souches du virus de la fièvre jaune. Nous mettons à profit de nouvelles approches pour affiner les connaissances portant sur l'implication des barrières de l'intestin moyen sur la réplication de la souche vaccinale YFV-17D.

Le second objectif est d'analyser les réponses moléculaires des intestins moyens des moustiques *Aedes aegypti* infectés avec les deux souches de la fièvre jaune, et ce avec deux approches à haut-débit : la transcriptomique et la protéomique. Ces deux approches donneront des pistes pour mieux comprendre les voies de signalisation et les facteurs cellulaires de l'épithélium intestinal qui contrôlent la réplication de YFV.

Matériels et Méthodes

1 Biologie cellulaire

1.1 Cellules

Cellules de mammifère. La lignée cellulaire de rein de singe Vero E6 (singes vert africain) ainsi que la lignée hépatocytaire Huh7 (isolée en 1982 au Japon, à partir d'un carcinome du foie) sont cultivées en étuve humide à 37°C, 5 % de CO₂, en milieu Eagle modifié par Dubelcco (Gibco™ DMEM, Life Technologies) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, SIGMA), 100 µg/mL de streptomycine et 100 unités/mL de pénicilline (Life Technologies).

Cellules d'insecte. Les lignées cellulaires de moustique Aag2 (fournie par les équipes de M. Flamand et de L. Lambrechts, Institut Pasteur) et C6/36 (fournie par l'équipe de V. Choumet, Institut Pasteur) sont dérivées de broyats de larve respectivement de l'espèce *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Ces cellules sont cultivées en étuve humide à 28°C, 0 % de CO₂, en milieu Leibovitz (Gibco™ Leibovitz's L-15 Medium, Life Technologies) supplémenté avec 10 % de SVF, 2 % de tampon tryptose phosphate (Gibco™ Tryptose Phosphate Broth 1X, Life Technologies), 1 % d'Acides Aminés non essentiels (Gibco™ MEM NEAA 100X, Life Technologies) 100 µg/mL de streptomycine et 100 unités/mL de pénicilline.

1.2 Virus

Origine des virus La souche vaccinale YFV-17D provient d'une dose de vaccin STAMARIL® (Sanofi Pasteur, 17D-204). Cette souche est un agent pathogène de classe 2 et doit être manipulée dans un laboratoire de niveau de sécurité P2. La souche clinique YFV-Dakar HD 1279 provient du World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses (WRCEVA, Galveston, Texas, États-Unis). Cette souche a été initialement isolée d'un patient au Sénégal en 1965, puis passée 7 fois sur cerveau de souris et une fois sur les cellules de moustique *Aedes albopictus* C6/36 avant d'être lyophilisée. YFV-Dakar est un agent pathogène de classe 3, manipulée dans un laboratoire de niveau de sécurité P3. Ces virus ont été amplifiés deux fois sur cellules Vero E6 avant d'être utilisés pour les infections de cellules ou de moustiques.

Stocks viraux. Une monocouche de cellules Vero E6 est infectée à une multiplicité d'infection (MOI, pour *multiplicity of infection*) de 0.1 pour YFV-17D et MOI 0.05 pour YFV-Dakar dans du milieu DMEM 2 % SVF. Le surnageant est récolté lorsque d'un effet cytopathique est observé (à jour 3 pour YFV-Dakar et à jour 4 pour YFV-17D). Pour le premier passage, le surnageant est récolté, clarifié par centrifugation (10 min, 1500 g) et stocké à -80°C. Pour le second passage, après la clarification, les virus sont précipités par ajout de polyéthylène glycol (PEG 6000, SIGMA, #81255) utilisé à une concentration finale de 7 % (p/v). Le mélange est agité au moins 3 h à 4°C. Les virus sont culottés par centrifugation (1 h 15 min, 1600 g), re-suspendus dans du milieu DMEM 2 % SVF et conservés à -80°C.

Titration des virus par technique des plages de lyse en milieu semi-liquide. Des cellules Vero E6 sont ensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 10^5 cellules/puits en milieu DMEM 5 % SVF. Le lendemain, les solutions virales à titrer sont diluées en série au 1/10 dans du milieu DMEM 2 % SVF. Les cellules Vero E6 à confluence sont infectées 2 h avec 200 μ L de ces solutions virales, puis le milieu est remplacé par 800 μ L d'un mélange en proportion 3:1 de milieu DMEM 2 % SVF frais et de solution de carboxyméthylcellulose (CMC) contenant 1.6 % de CMC (m/v) (VWR, low viscosity #276494) et 4.25 mg/mL de NaCl. Après incubation pendant 5 jours dans une étuve humide, à 37°C et 5 % CO₂, les cellules sont lavées deux fois au PBS, incubées 20 min avec une solution de cristal violet, rincées à l'eau deux fois puis séchées. La solution de cristal violet est composée de 0.025 % (m/v) cristal violet, 4 % formaldéhyde et de 150 mM NaCl. Les plages de lyse peuvent être comptées dans chaque puits afin de déterminer le titre viral. Le titre viral est exprimé en nombre d'unité formant plaque par millilitre de surnageant ou PFU/mL (*Plaque Forming Unit*), selon la formule :

$$\text{Titre de la solution (PFU/mL)} = \text{Nombre moyen de plages dans 1 puits} \cdot 5 \cdot \text{dilution } 10^x$$

1.3 Infection

Les cellules sont ensemencées la veille de l'infection. Lors de l'infection, le milieu de culture est remplacé par du milieu 2 % SVF contenant le virus dilué pour atteindre la MOI voulue. Cette solution virale est incubée 2 h et remplacée par du milieu frais.

1.4 Transfection

Les cellules Aag-2 sont ensemencées à raison de $4 \cdot 10^5$ cellules/puits dans des plaques de 24 puits la veille de la transfection, dans du milieu L-15 10 % SVF. 500 ng d'ARN double-brin (ARNdb) sont transfectés par puits avec le réactif 'Lipofectamine® LTX with Plus™ Reagent' (Thermo Fisher Scientific) en utilisant 1 μ L de Lipofectamine et 0.5 μ L de réactif Plus™ par puits, en milieu L-15 2 %. Le milieu est changé le lendemain, lors de l'infection.

1.5 Cytométrie en flux

Les cellules Aag2 sont dissociées par traitement à la trypsine (4 min, 28°C) et lavées au PBS avant d'être fixées 30 min à 4°C avec la solution de fixation/perméabilisation du kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, #554714). Les cellules infectées sont marquées 1 h à 4°C avec l'anticorps primaire anti-enveloppe (pan-*Flavivirus*) 4G2 ou 2D12, dilué au 1/500^{ème} dans du tampon de lavage. Le marquage avec l'anticorps secondaire dilué au 1/1000^{ème} anti-souris est réalisé 1 h à 4°C. Trois lavages sont réalisés après la fixation/perméabilisation, et deux lavages après chaque marquage (centrifugation 5 min, 300 g pour cellule vivantes, 400 g pour cellules fixées).

2 Biologie moléculaire

2.1 Analyse de l'expression des gènes

Extraction des ARN. Le protocole de récolte et de lyse varie légèrement en fonction des éléments (cellules *versus* organes de moustiques) à analyser. Les surnageants sont clarifiés (10 min, 1500 g) pour éliminer les débris cellulaires. 100 µL de surnageant sont mélangés avec 350 µL du tampon de lyse RA1 du kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, #740955) complété avec 1 % de β-mercaptoéthanol (SIGMA). Les cellules sont lavées 2 fois avec 0.5 mL de PBS avant d'être lysées dans 350 µL de tampon de lyse tandis que les organes de moustique sont déposés directement dans 350 µL de tampon de lyse puis broyés (voir paragraphe sur la dissection des moustiques). L'extraction des ARN se fait avec le kit NucleoSpin® RNA, en éluant les ARN dans 40 µL d'eau sans RNase. Les ARN sont conservés à -80°C.

Transcription inverse. Les ADN complémentaires (ADNc) sont généralement synthétisés à partir de 1 µg d'ARN pour les extraits cellulaires (si les quantités d'ARN obtenues sont faibles, il est possible de travailler avec un minimum de 250 ng). Le kit RevertAid H Minus First strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific) est utilisé avec des amorces hexamériques randomisées. Les échantillons sont dilués au 1/10^{ème} ou 1/20^{ème} avant d'être conservés à -20°C.

Analyse par PCR quantitative des extraits cellulaires (qPCR SYBR® Green). Les ADNc sont analysés par qPCR avec le kit FastStart Universal SYBR® Green Master (Roche) et la machine QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems). 5 µL d'ADNc sont utilisés, en triplicat, avec le programme suivant: 1 cycle de 2 min à 50°C, 10 min à 95°C suivis de 40 cycles de 15 s à 95°C, 1 min à 60°C ; la courbe de fusion 1 cycle 15 s à 95°C, 1 min à 60°C et augmentation de température jusque 95°C avec gradient de 0.05°C/s. Les amorces utilisées sont listées dans le **Tableau 16**, en annexe (p141). Toutes

les amorces sont vérifiées pour permettre une amplification efficace à au moins 95 %. Le gène de ménage utilisé pour les cellules de moustique est le gène codant la protéine ribosomale 49 (RP49) et pour les cellules mammifères, le gène codant la D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les inductions de gènes sont calculées avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$. Une dilution en série du plasmide pACNR-YFRP-neo (contenant les séquences des protéines non-structurales de YFV-17D) est utilisée pour déterminer le nombre de copies de génomes viraux dans les échantillons. Les résultats de détection virale sont exprimés en génome équivalent pour 1 μg d'ARN total (GE/1 μg ARN total). La limite de détection est placée de manière théorique à 1 génome équivalent par réaction de qPCR.

Analyse par PCR quantitative de la réplication virale dans les organes de moustique (qPCR TaqMan®). Les échantillons d'organes de moustique (intestin moyen, pattes, glandes salivaires) sont analysés avec une méthode qui couple la transcription inverse et la qPCR avec le kit TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step (Thermo Fisher Scientific) et la machine QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems). Le génome viral est détecté dans 3 μL d'ARN, en duplicat, grâce à une sonde TaqMan® ciblant le gène de la protéine NS3. Une gamme est réalisée à partir d'une dilution en série d'ARN génomique transcrit *in vitro* à partir d'un plasmide contenant le génome de YFV-17D. Les résultats sont exprimés en génome équivalent par organe (GE/organe).

Sonde TaqMan® : Applied Biosystems, Custom TaqMan® Gene Expression Assay :

NS3-TaqManProbe-For CACGGCATGGTTCCTTCCA

NS3-TaqManProbe-MFAM CAGAGCTGCAAATGTC

NS3-TaqManProbe-Rev ACTCTTCCAGCCTTACGCAA

2.2 Analyse des protéines, Western Blot

Les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (SIGMA, #R0278), complété avec un inhibiteur de protéase (cOmplete, Roche), pendant 20 min à 4°C. Les échantillons sont dénaturés pendant 10 min à 70°C avec un tampon de charge (Thermo Fisher Scientific, Pierce™ LDS Sample Loading Buffer 4X), avec ou sans agent réducteur (Thermo Fisher Scientific, Sample Reducing Agent 10X). L'électrophorèse est réalisée avec le système NuPAGE® (Life Technologies) sur un gel à gradient 4-12% de polyacrylamide. Le transfert sur membrane de nitrocellulose est réalisé grâce au système Trans-Blot® Turbo™ (BIO-RAD). Les sites aspécifiques sont saturés 1 h à température ambiante, dans une solution de PBS contenant 0.1 % de Tween® 20 et 5 % (m/v) de lait écrémé (Régilait). Les anticorps utilisés pour les marquages sont dilués dans cette même solution. Le marquage avec l'anticorps primaire est réalisé sur une nuit à 4°C. Le marquage avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome est réalisé pendant 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Trois lavages

de 10 min dans une solution de PBS contenant 0.1 % de Tween® 20 sont effectués après chaque marquage. La révélation des membranes est faite avec le système Odyssey® CLx (LI-COR). L'expression relative des protéines est quantifiée avec le logiciel Image Studio Lite v5.2.

2.3 Synthèse des ARN double-brin

La conception des amorces. est réalisée avec l'outil informatique E-RNAi www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/. Les séquences utilisées sont récupérées dans NCBI, qui possède la version actualisée du génome d'*Aedes aegypti* (AaegL5.0). Une séquence spécifique de l'ARN messenger du gène à cibler est choisie, qui est commune à la totalité (ou le plus grand nombre) de ses variants d'épissage. Les paramètres suivants sont utilisés: une taille de siARN pour la prédiction de spécificité de 21 nucléotides (ntp) et une taille d'amplicon entre 250 et 500 pb. La séquence du promoteur T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) est ajoutée à l'extrémité 5' de chaque amorce. Les amorces sans hybridation aspécifique prédite sont sélectionnées. La liste des amorces utilisées et la taille attendue des amplicons sont présentées dans le **Tableau 17**, en annexes (p143).

Amplification de séquence cible. La séquence ciblée est amplifiée à partir de 500 ng d'un mélange d'ADNc issu de cellules Aag2 infectées ou non par la souche YFV-Dakar. Les amorces utilisées permettent d'ajouter le promoteur T7 (taatacactcactataggg) aux deux extrémités de la séquence. Une première PCR (PCR1) est réalisée avec l'ADN polymérase Phusion® High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific, #f530), en optimisant la température d'hybridation entre 58°C et 62°C afin d'avoir une amplification la plus spécifique possible. Les produits de PCR1 sont migrés sur un gel à 1.5 % d'agarose. Les bandes spécifiques sont extraites du gel à l'aide un banc à UV et purifiées avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR clean-Up (Macherey-Nagel, #740609). Une seconde PCR (PCR2) d'amplification est réalisée avec 40 ng de produit de PCR1, avec le même programme. Les produits de 2 réactions de PCR2 sont assemblés et purifiés au Phénol:Chloroforme et re-suspendus dans 20 µL d'eau.

La synthèse des ARN double-brin (ARNdb) se fait avec le kit MEGAScript® T7 (Life Technologies, #AM1333), à partir d'1 µg de produit de PCR2. La synthèse doit être conduite pendant 24 h. Les échantillons sont traités avec le kit TURBO DNA-free (Ambion, #AM1907), afin de dégrader la matrice ADN restante. Après avoir chauffé 15 min à 80°C, le thermocycleur est éteint pour que les ARN s'hybrident pendant le retour progressif à la température ambiante, pendant 2 h. Les ARNdb fraîchement synthétisés sont purifiés au Phénol:Chloroforme, et re-suspendus dans 20 µL d'eau sans RNase. Leur qualité et concentration sont évaluées avec le spectrophotomètre NanoDrop 2000c. Les ARNdb obtenus sont généralement concentrés à 2 500 - 5 000 ng/µL, ne présentent pas de trace de

phénol et sont prêts à être utilisés pour des expériences d'ARN interférence sur cellules ou *in vivo* dans les moustiques.

3 Méthodes spécifiques aux moustiques

3.1 Élevage des moustiques

La souche *Aedes aegypti* Paea, isolée en Polynésie française en 1960 (fournie à l'Institut Pasteur en 1994 par l'Institut Louis Malardé, Tahiti, Polynésie Française) a été utilisée pour toutes les expériences de moustique. Il faut compter en moyenne 4 semaines entre la mise en eau des larves et l'utilisation des femelles pour le gorgement. Les œufs, conservés secs sur du papier buvard 3 mois au maximum, sont réhydratés en eau claire. Les larves (stade 1 à 3) sont nourries à la levure de bière, à 25°C. Les nymphes sont transférées en cage avant émergence. Les adultes sont élevés en atmosphère à 80 % d'humidité, à 28°C, avec un régime lumineux alterné (12 h de lumière, 12 h d'obscurité), nourris *ad libitum* avec de l'eau contenant 10 % de sucre. La ponte d'œufs est provoquée par 2 gorgements sur souris espacés de quelques jours. Une souris anesthésiée est posée sur la cage pendant 15 min puis retirée (**Figure 18**). Le protocole de gorgement sur souris a fait l'objet d'une approbation du comité d'éthique C2EA n°89 (Institut Pasteur) n°2014-0068.

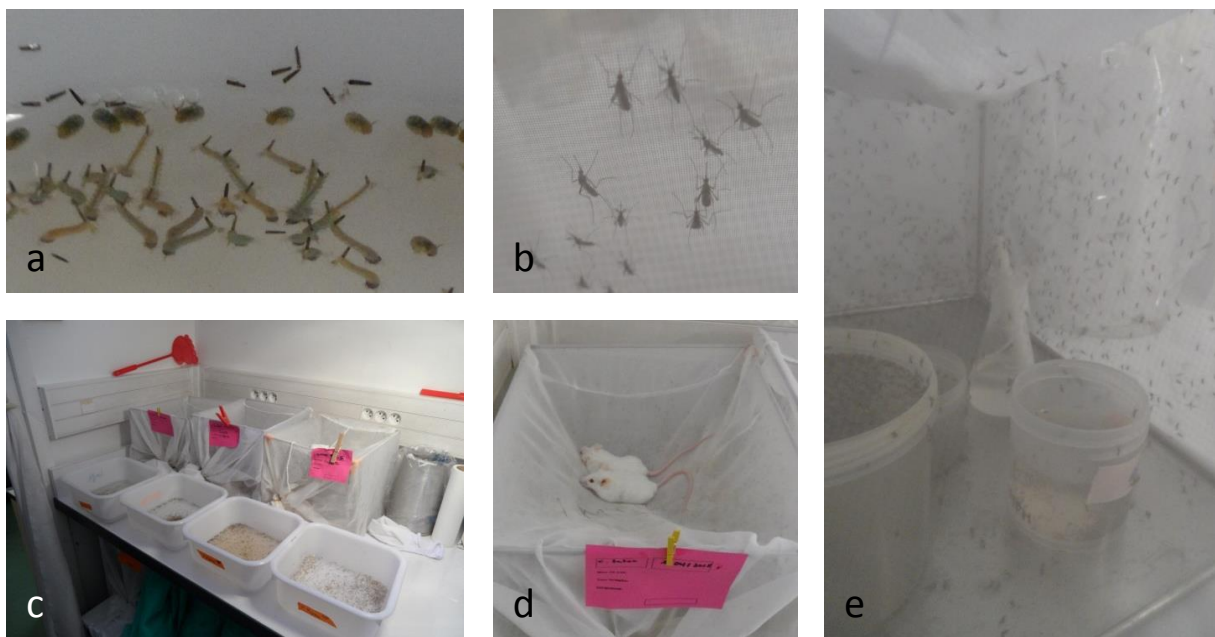


Figure 18: Élevage des moustiques.

a) larves et nymphes en eau. b) adultes en cage. c) cuvettes avec larves et nymphes et cages en tissu avec adultes. d) gorgement sur souris pour stimuler la ponte d'œufs. e) intérieur de cage en tissu. Les nymphes sont placées dans les pots, afin que les adultes émergent directement dans la cage. Les adultes peuvent se nourrir sur un coton imbibé d'eau sucrée.

3.2 Gorgement des moustiques

La veille du repas sanguin, les moustiques sont anesthésiés sur glace, triés et placés dans des boîtes à piston, à raison de 60 femelles et 2 mâles par boîte. Ils sont privés d'eau sucrée afin de favoriser le repas sanguin du lendemain. Le sang de donateurs anonymes provient de l'Etablissement Français du Sang de Cabanel. Il est fourni en tube EDTA 6 mL la veille du gorgement. Le jour-même, le sang est lavé au PBS (3 centrifugations 530 g pendant 10 min). Le repas sanguin est constitué d'1.5 mL de sang lavé, d'un volume de stock viral suffisant pour atteindre un titre final de 4.10^7 PFU/mL, de l'ATP 10 mM final, volume complété avec du milieu DMEM 2 % SVF pH basique. Le système utilisé est un système Hemotek (Hemotek, #SP6W1-3), avec membrane artificielle de collagène (les photos de la **Figure 19** sont prises avec des intestins de porc, non-utilisés pour notre projet). Chaque réservoir est rempli avec 3 mL de repas sanguin, puis fixé sur les cylindres chauffant pour atteindre 37°C. Le piston des boîtes est remonté pour confiner les moustiques dans un petit volume, et le gorgeur est accolé au-dessus de la boîte pendant 20 min. Après le repas sanguin, les moustiques sont anesthésiés à 4°C, puis les moustiques gorgés sont triés, placés dans de nouvelles boîtes dans un incubateur (28°C, atmosphère humide, cycle lumière/obscurité 12h/12h) et nourris *ad libitum* avec de l'eau contenant 10 % de sucre (**Figure 19**).

3.3 Injection dans le thorax des moustiques

Après anesthésie sur glace, les moustiques sont injectés sous loupe binoculaire à l'aide d'un micro-injecteur (Drummond, Nanoject II, #3-000-205A). Deux fois 69 nL de liquide (solution virale ou solution d'ARNdb) sont injectés dans le thorax (Figure 20). Les moustiques sont alors placés dans de nouvelles boîtes dans un incubateur (28°C, atmosphère humide, cycle lumière/obscurité 12h/12h) et nourris *ad libitum* avec de l'eau sucrée à 10 %.

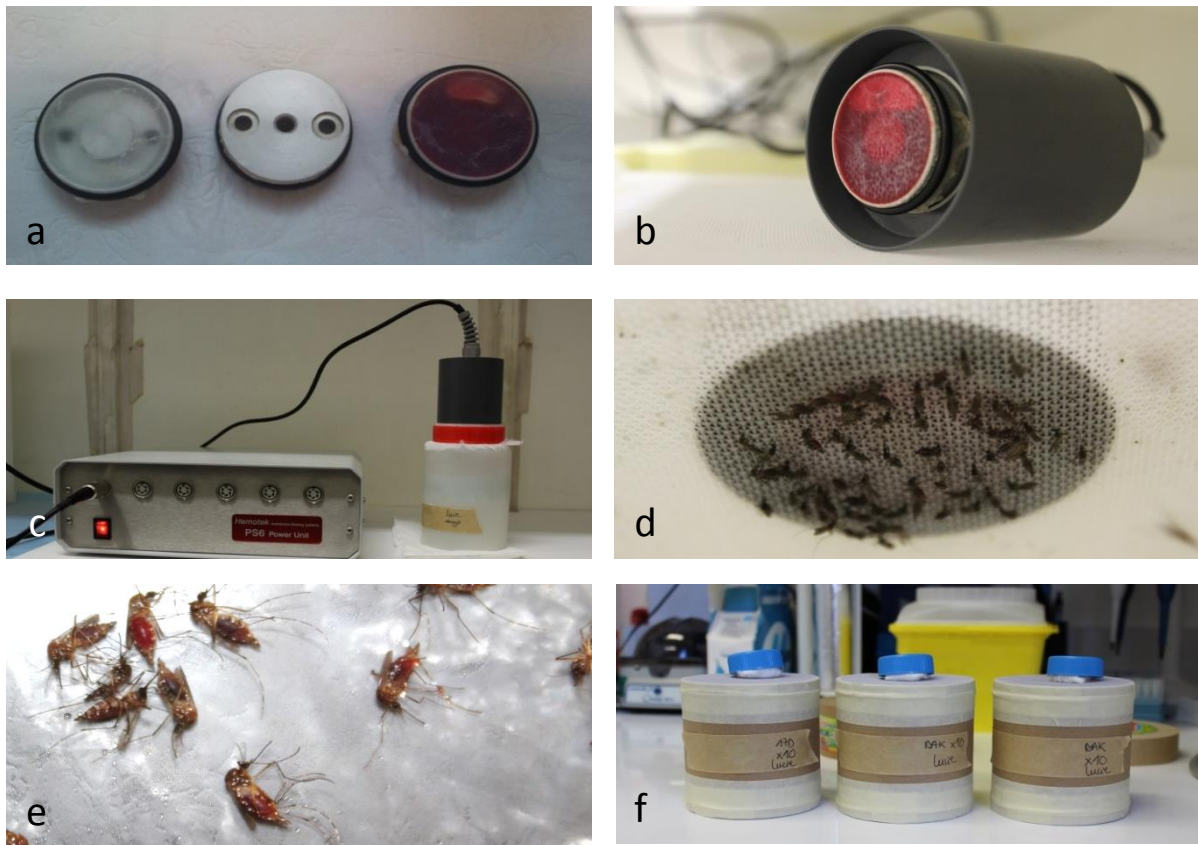


Figure 19: Gorgement des moustiques *Aedes aegypti*.

a) gorgeur vide recouvert d'un morceau d'intestin de porc, face à visser du gorgeur, gorgeur rempli de sang. b) gorgeur vissé sur l'appareil chauffant. c) système complet Hemotek. Le gorgeur est placé contre le tissu de la boîte à piston contenant les moustiques. d) moustiques se gorgeant à travers le tissu de la boîte à piston. e) moustiques gorgés et anesthésiés. f) boîtes en carton avec coton imbibés d'eau sucrée protégés par un capuchon pour éviter l'évaporation. Les moustiques sont placés dans ces boîtes, dans un incubateur.

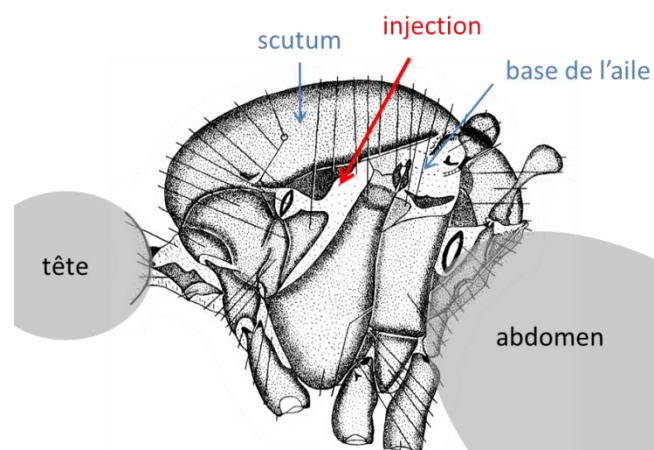


Figure 20: le site d'injection se situe dans la partie non rigide sous le scutum, en avant de la base de l'aile. Adaptée de (Owen, 1977)

3.4 Dissection des moustiques

Les moustiques sont anesthésiés sur glace, passés dans un bain d'éthanol 70 % puis dans un bain de PBS avant d'être disséqués dans une goutte de PBS sous la loupe binoculaire. Des pinces fines (Fine Science Tools, Pinces Drummond#5 Biology tip, #11252-23) et des minuties (Fine Science Tools, porte aiguilles Moria, #26016-12) sont utilisés pour la dissection. Les intestins moyens, les pattes et les glandes salivaires sont prélevés et déposés dans un tube contenant des billes de verre stérilisées (\varnothing 0.5 mm, Dutscher #152018) et le tampon de lyse ou le milieu adapté à l'analyse suivante. Les organes sont broyés à l'aide d'un homogénéisateur tissulaire (Ozyme, Precellys Evolution) pendant 2 fois 15 s à 10000 g suivi d'une pause de 10 s.

3.5 Immunofluorescence sur intestin moyen de moustique

Après dissection, les organes sont déposés sur des lames de verre Superfrost® Plus. Les intestins moyens sont fixés 15 min dans un bain d'acétone à -20°C . Tous les traitements et lavages sont réalisés dans une cuve ou bien en chambre humide pour éviter toute évaporation. Après 1 h de perméabilisation dans une solution de PBS, 0.2 % Triton 100-X, les sites aspécifiques sont saturés avec une solution de PBS, 1 % BSA et 0.1 % de Tween® 20 (SIGMA), pendant 30 min à température ambiante. Les marquages sont faits en solution de PBS, 1 % BSA. L'ADN des cellules est marqué au DAPI. Les virus YFV sont marqués avec l'anticorps reconnaissant la protéine non structurale NS4B (C. Rice, The Rockefeller University). L'actine est marquée à la phalloïdine conjuguée au fluorophore California Red (ATT Bioquest®). Les intestins moyens sont montés entre lame et lamelle avec 5 μL de Prolong® Gold Antifade (Life Technologies), scellées avec du vernis et conservées à 4°C . Les images sont acquises avec un microscope confocal (LSM 700 inverted) et le logiciel ZEN.

3.6 DotBlot sur intestin moyen de moustique

Après avoir quadrillé la membrane ImmunoBlot™ PVDF (Biorad, #162.0177) avec un crayon à papier, 1 μL des extraits protéiques en tampon Label-Free destinés à la protéomique mélangés avec 1 μL de tampon RIPA 2X sont déposés sur la membrane. La membrane est séchée pendant 10 min. Le marquage réalisé avec l'anticorps anti-NS4B en utilisant la même procédure que celle présentée plus haut pour les WesternBlot (§ 2.2).

4 Analyses à haut-débit

4.1 Séquençage des virus

Obtention des fragments de génome viral. L'extraction des ARN viraux est faite à partir de 20 μ L de stock viral avec une méthode Trizol (Ambion, TRIzol™ Reagent, #15596026) selon les recommandations du fabricant. Les ARN sont re-suspendus dans 20 μ L d'eau sans RNase et traités à la DNase avec le kit DNA-free (Ambion, #AM1906). Les échantillons sont dosés au spectrophotomètre NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) et conservés à -80°C .

La synthèse des brins complémentaires (ADNc) aux ARN viraux est réalisée avec le kit Maxima H Minus First Strand (Thermo Fisher Scientific, #K1652), à partir de 250 ng d'ARN viral. Trois fragments du génome viral sont amplifiés par PCR: fragment a, b et c (**Figure 21**). Les amorces utilisées (**Tableau 18** en annexe, p145) sont, pour la plupart, celles décrites dans la publication de (Beck et al., 2014). De nouvelles amorces ciblant l'extrémité 3' non traduite (3'-UTR, 3' *untranslated region*) du génome ont été conçues pour une amplification optimale des différentes souches. Les fragments sont amplifiés par PCR avec le kit Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, #M0530), avec le programme suivant : 1 cycle de 30 s à 98°C ; 25 cycles avec 10 s à 98°C puis 30 s à température d'hybridation variable (58°C à 64°C) et 3 min à 72°C ; 1 cycle de 10 min à 72°C . La température d'hybridation et la quantité d'ADNc utilisée sont ajustées pour avoir une amplification d'un unique fragment à la taille attendue. Les produits de PCR sont analysés par migration sur un gel d'agarose à 0.6 % puis stockés à -20°C . Les produits de PCR sont purifiés avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up (Macherey-Nagel) et re-suspendus dans 40 μ L d'eau sans RNase. Leur concentration est mesurée au spectrophotomètre NanoDrop Lite et ils sont conservés à -20°C .

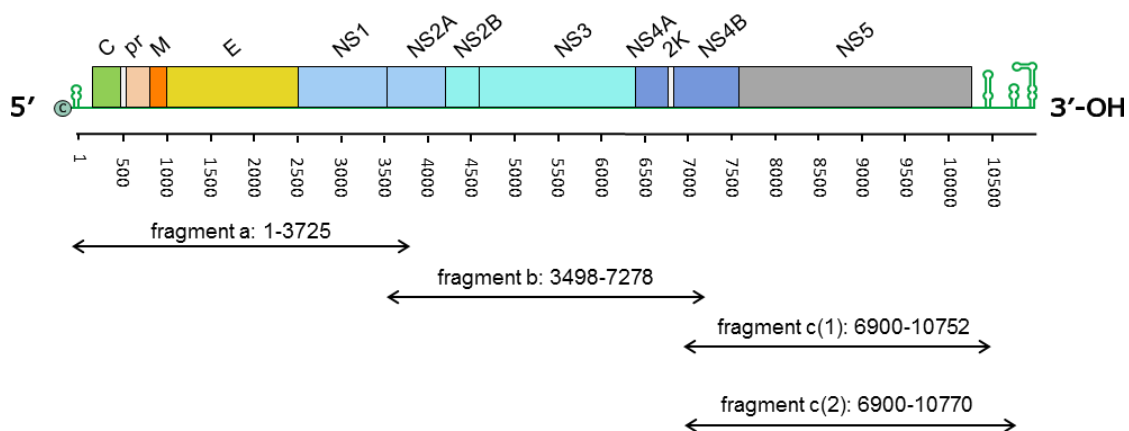


Figure 21: organisation du génome de YFV et localisation et taille des 3 fragments amplifiés utilisés pour le séquençage.

Préparation de la librairie et séquençage. La librairie et le séquençage ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire de Marco Vignuzzi, Institut Pasteur. La librairie est réalisée à partir de 100 ng de matériel pour 1 kb de génome à séquencer. Les produits de PCR sont fragmentés de manière aléatoire avec le kit NEBNext® dsDNA fragmentase (NEB, #M0348) puis purifiés avec le kit AMPure® XP Beads (Beckman Coulter, Inc. #A63881). La librairie pour le séquençage Illumina est préparée avec le kit NEBNext® Ultra DNA Library Prep (NEB, #E7370) en sélectionnant les fragments de 400 pb. Les amorces NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (NEB, #E7335) sont utilisées. La purification est réalisée avec le kit AMPure® XP Beads et la quantification grâce au kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific, #Q32850). Les échantillons de la librairie, dilués à 4 nM sont séquencés sur une machine NextSeq® 500 sequencer (Illumina) avec le kit NextSeq® 500 Mid Output kit v2 (150 cycles) (Illumina, #FC-404-2002), pour avoir des fragments lus (appelés *reads* pour la suite du manuscrit) de 150 pb.

Analyse bioinformatique. Les adaptateurs sont enlevés et les *reads* de bonne qualité sont sélectionnés avec l'outil Trim Galore www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/, en utilisant les paramètres suivants: qualité 30, longueur 100, stringence 4. La qualité des *reads* a été analysée avec l'outil FastQC www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/. L'outil Trim Galore compile les deux outils Cutadapt cutadapt.readthedocs.io/en/stable/ et FasQC. Les *reads* sont mappés sur la séquence de référence YFV-Asibi AY640589.1 avec les outils BWA (Li and Durbin, 2009) et SAMtools (Li et al., 2009). Picard Tools MarkDuplicates est un outil qui permet de détecter et d'éliminer les duplicats de PCR introduits pendant la préparation des librairies. Une première séquence consensus est produite avec les logiciels SAMtools mpileup, VarScan mpileup2cns (min-var-freq 0.5). L'identité d'un nucléotide est déterminée quand il a une fréquence de plus de 0.5. Un nouvel alignement est réalisé contre la première séquence consensus. La détermination des variants est faite avec VarScan mpileup2snp (min-var-freq 0.01, strand-filter 0). L'index de diversité 'Shannon entropy' est calculé avec DiversiTools josephhughes.github.io/DiversiTools/ et l'index de diversité Simpson (1-D) calculé d'après la méthode décrite par (Hunter and Gaston, 1988). Les graphiques ont été générés avec des programmes R script and R Studio www.rstudio.com/. ggplot2 (Wickham, 2009), readr CRAN.R-project.org/package=readr, Seqinr (Charif and Lobry, 2007) et gridExtra CRAN.R-project.org/package=gridExtra.

L'index 'Shannon entropy' est calculé comme décrit précédemment (Nishijima et al., 2012) avec : SE l'index d'entropie pour une position du génome donnée, f_i la fréquence des nucléotides $i=A,T,C,G$ à la position donnée, C la couverture du séquençage.

$$SE = -\frac{1}{C} \sum_{i=A,T,C,G} f_i \cdot \ln f_i$$

L'index de diversité de Simpson est calculé comme décrit précédemment (Hunter and Gaston, 1988) avec : D l'index de diversité pour une position du génome donnée et, de la même manière, f_i la fréquence des nucléotides $i=A,T,C,G$ à la position donnée, C la couverture du séquençage.

$$D = 1 - \frac{1}{C(C-1)} \sum_{i=A,T,C,G} f_i \cdot (f_i - 1)$$

4.2 Analyse des échantillons d'intestin moyen de moustique par Spectrométrie de Masse

Préparation des échantillons. Les demi-intestins moyens sont déposés dans 15 μ L de tampon Label-Free de composition finale suivante : urée 8 M, Tris HCl pH 7.5 50 mM et inhibiteur de protéase 1X (cOmplete, Roche). Les échantillons sont lysés par sonication (Fischer, Bioblock Scientific Vibran Cell 75043, modèle 750W, sonde Cuphorn) pendant 10 min avec des cycles de 2.2 s ON/ 2.2 s OFF, intensité maximale. Les échantillons sont maintenus sur glace pendant toute la phase de sonication. Les homogénats sont ensuite centrifugés (1 h, 16 000 g) puis les surnageants contenant les extraits protéiques sont transférés dans un nouveau tube et conservés à -80°C . Les demi-intestins moyens correspondant à ceux détectés positifs pour l'infection par RT-qPCR sont rassemblés (8 demi-intestins moyens par échantillon) pour être préparés et analysés en spectrométrie de masse.

Analyse des échantillons. Les ponts disulfures sont réduits par l'ajout de 5 mM de dithiothréitol (DTT) pendant 30 min à température ambiante. Une étape d'alkylation est ensuite réalisée avec 20 mM d'iodoacétamide pendant 30 min, à l'obscurité et à température ambiante. La solution protéique est diluée dans 50 mM de bicarbonate d'ammonium, jusqu'à ce que la concentration en urée devienne inférieure à 1 M. 1 μ g de trypsine (Promega) est ajouté à chaque échantillon pour une étape de digestion toute la nuit à 37°C . La digestion est stoppée par addition d'acide formique 0.5 %. Les peptides issus de cette digestion sont purifiés à l'aide du système Sep-Pack C18 (Waters) selon les instructions du fabricant. Les peptides sont analysés par nano LCMS/MS à l'aide de l'appareil de chromatographie EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) couplé à un spectromètre de masse Q Exactive Orbitrap. Les données sont acquises à l'aide du logiciel XCalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific) et comparées à la base de données d'*Aedes aegypti* issue de VectorBase (téléchargée en mars 2017) et aux protéines structurales et non-structurales du virus de la fièvre jaune grâce au logiciel MaxQuant (version 1.5.3.8). La quantification des protéines est faite avec l'algorithme de quantification Label-Free du logiciel MaxQuant, calculant une intensité LFQ (*Label Free Quantification*) pour chaque protéine dans chaque échantillon.

Analyse statistiques des résultats de protéomique. La matrice de corrélation représente les coefficients de corrélation de Pearson entre chaque paire d'échantillons. Les coefficients sont calculés grâce à toutes les paires d'intensités LFQ mesurées dans ces échantillons. L'analyse statistique de l'expression différentielle des protéines permet d'évaluer l'abondance relative de chaque protéine entre deux conditions. Les protéines présentant au moins 3 valeurs d'intensité LFQ sur 6 (2 conditions, 3 réplicats) sont sélectionnées. Cela permet d'écarter de l'analyse les protéines avec une mauvaise identification. Les protéines écartées de cette analyse sont considérées comme présentes dans une condition et absentes dans l'autre. Les intensités LFQ sont transformées en \log_2 et normalisées en centrant sur la médiane avec la fonction `normalized` du package R DAPAR (Wieczorek et al., 2017). Les valeurs LFQ manquantes sont recrées artificiellement en utilisant la fonction `imp.norm` du package R `norm`. Les protéines ayant une différence d'intensité LFQ de moins d'un facteur 4 ($\log_2 = 2$) sont considérées comme des protéines sans différence d'abondance significative. La robustesse statistique des protéines sélectionnées est testé avec un t-test `limma` (Gentleman et al., 2005) du package R `limma` (Ritchie et al., 2015), avec une correction de Benjamini-Hochberg appliquée aux p-value avec la fonction `adjust.p` du package R `cp4p` (Giai Gianetto et al., 2016), en utilisant la méthode décrite par (Pounds and Cheng, 2006). Les protéines possédant une p-value ajustée inférieur à un taux de fausse découverte (FDR, *false discovery rate*) de 1 % sont considérées comme des protéines avec une différence d'abondance significative. Les protéines d'intérêt sont les protéines validant ces deux critères.

Ontologie génique. Les outils du site `g:profiler` (Reimand et al., 2016) sont utilisés. Les protéines identifiées sont converties en leurs homologues chez *Drosophila melanogaster* avec `g:Orth`, et un seul des orthologues est conservé dans la liste afin de ne pas biaiser l'analyse statistique suivante. Les ontologies enrichies sont identifiées avec `g:GOST`.

4.3 Analyse des intestins moyens de moustique par transcriptomique

Préparation des échantillons pour séquençage. Les demi-intestins moyens sont déposés dans 100 μL de Trizol (Ambion, TRIzol™ Reagent, #15596026). Les ARN sont extraits selon les recommandations du fabricant, en ajoutant du glycogène (RNA-free glycogen, Ambion) pour faciliter la précipitation, re-suspendus dans 10 μL , traités à la DNase avec le kit DNA-free (Ambion, #AM1906) et conservés à -80°C . La présence de virus est testée dans 1 μL de tous les échantillons par RT-qPCR avec les sondes TaqMan, et le kit TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step. Les échantillons infectés sont sélectionnés et la qualité des ARN est vérifiée grâce à une puce RNA 6000 Nano (Agilent, #5067-1511), lue sur une machine 2100 Bioanalyzer (Agilent). Il est à noter que l'ARN des insectes possède un profil atypique. Lorsqu'il est dénaturé il présente un important triple pic de fluorescence autour de 2000 nt

contenant les ARN 18S, 28S α et 28S β , et un petit pic à 150 nt contenant les ARN 5.8S (Winnebeck et al., 2010). Les échantillons sont rassemblés à raison de 8 demi-intestins moyens par *pool*, avec des quantités équivalentes d'ARN pour chaque échantillon.

La préparation des librairies se fait à partir de 200 ng de chaque *pool* avec le kit TruSeq® Stranded mRNA LT Sample Prep (Illumina, #RS-122-2101 et #RS-122-2102) complété des billes AMPure® XP Beads (Beckman Coulter, Inc. #A63881) et de la SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, #18064-014). La qualité des librairies est vérifiée avec une puce DNA 1 000 (Agilent, #5067-4626) sur une machine 2100 BioAnalyzer (Agilent), les fragments doivent avoir une taille d'environ 280 pb pour un insert à séquencer de 150 pb. L'ADN de la librairie est quantifié avec le kit QuBit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific, #Q32854), sur un fluorimètre Qubit 3.0 (Invitrogen). Le kit *stranded* est utilisé pour faire un séquençage directionnel des ARNm. Le brin d'ADNc est synthétisé de manière normale, mais le brin complémentaire à cet ADNc (qui est la copie conforme de l'ARNm) est lui synthétisé avec des dUTP à la place des dTTP. Des adaptateurs différents sont liés aux extrémités 5' et 3'. Les PCR d'enrichissement impliquent à la fois une polymérase qui ne peut pas reconnaître les dUTP, et des amorces ne reconnaissant que les adaptateurs en 5'. Ainsi, seuls les fragments « copie conforme de l'ARNm » sont copiés et seront séquencés par la suite (**Figure 22**).

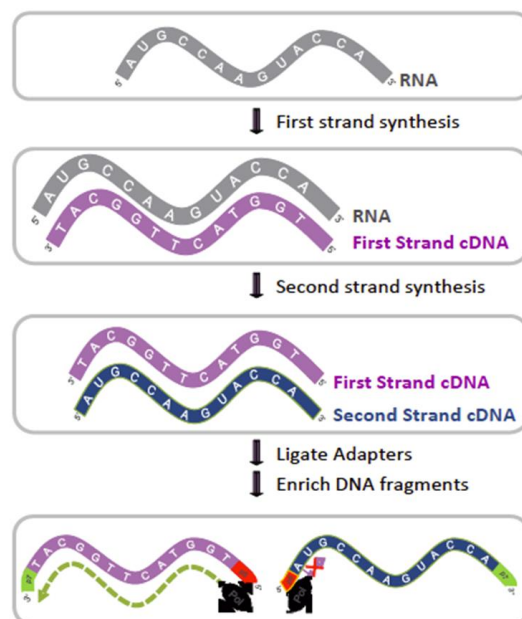


Figure 22: principe de la librairie directionnelle

Séquençage des échantillons. Les échantillons de la librairie sont dénaturés avec une solution à 0.1 M NaOH final, et finalement dilués à 10 pM pour être séquencés sur une machine HiSeq 2500 (Illumina) avec les kits HiSeq v4 (Illumina, kit pour les clusters #GD-401-4001 et kit pour séquençage #FC-401-4002), 65 cycles, afin de récupérer des *reads* de 65 pb en single-end. Les échantillons sont répartis à raison de 6 échantillons par canal, sur 3 canaux de la puce de séquençage (FlowCell), qui en contient 8 au total. A raison de 250 millions de *reads* par canal, on s'attend à récupérer 40 millions de *reads* par échantillon.

L'analyse bioinformatique est réalisée avec le *pipeline* Sequana RNA-seq (Cokelaer et al., 2017). Les séquences des adaptateurs et les lectures de basse qualité ont été éliminées en utilisant cutadapt version 1.11 (Martin, 2011). Seuls les *reads* d'au moins 25 pb ont été gardés pour la suite de l'analyse. L'outil STAR v2.5.0a (Dobin et al., 2013), a été utilisé avec les paramètres par défaut pour aligner les séquences contre le génome de référence d'*Aedes aegypti*. L'assemblage utilisé est AaegL5.0 (GCA_002204515.1), issu du séquençage de la souche *Aedes aegypti* Liverpool AGWG (LVP_AGWG) (Matthews et al., 2018). Le génome généré avec la technologie PacBio contient 2 310 *scaffolds*, totalisant 1.278 Gb. Ce génome a été annoté avec 14 626 gènes codant pour des protéines, 4 704 gènes non codants et 34 403 transcrits (VectorBase). L'outil featureCounts version 1.4.6-p3 (Liao et al., 2014), a été utilisé pour compter les *reads* assignés sur les gènes du moustique (paramètres: -t CDS -s 0 -O).

Les analyses biostatistiques effectuées sur les données de comptage sont réalisées avec R v3.4.1 www.r-project.org/ et le package DESeq2 v1.16.0 (Love et al., 2014). La normalisation et l'estimation de la dispersion des échantillons sont effectuées avec DESeq2 (paramètres par défaut), et la différence d'expression est testée en activant l'algorithme d'*independent filtering*. Un modèle linéaire généralisé prenant en compte l'effet réplicat, le statut d'infection, l'effet jour et l'interaction jour/infection est mis en place pour tester les expressions différentielles des gènes entre les différentes conditions biologiques : réplicat + jour + infection + jour:infection. Pour chaque comparaison, la p-value est ajustée grâce à la méthode de Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995). Les gènes possédant une p-value ajustée inférieure à 0.05 sont considérés comme différentiellement exprimés entre les conditions. L'analyse en composantes principales (ACP ou PCA en anglais) est réalisée après une transformation VST (*Variance Stabilizing Transformation*) des données qui permet de les rendre homoscedastiques (variance indépendante de l'intensité).

Résultats Axe 1 : Restriction de la souche vaccinale du virus de la fièvre jaune dans l'intestin moyen du moustique par les barrières d'infection et d'échappement

1 La souche YFV-Dakar, mais pas la souche YFV-17D, est capable de franchir la barrière de l'intestin moyen d'*Ae. aegypti* pour se disséminer

1.1 Caractérisation de la dissémination par titration en plage de lyse

La réplication et la dissémination du virus YFV-17D ont été étudiées chez la souche Paea d'*Ae. aegypti*. L'isolat clinique YFV-Dakar, dont la réplication chez le macaque rhésus est bien caractérisée (Engelmann et al., 2014), a été utilisé comme contrôle positif pour ces expériences. Les virus produits sur les cellules Vero ont été mélangés avec du sang humain pour former un repas contenant 4.10^7 PFU/mL de YFV-17D ou de YFV-Dakar. Cinq à dix moustiques ont été collectés tous les 2-3 jours jusqu'à 14 jours post-gorgement (jpg). Les moustiques ont été disséqués pour analyser les intestins moyens, les pattes et les glandes salivaires. La production de virus infectieux dans ces organes a d'abord été analysée en calculant le titre viral par la technique de plages de lyse sur cellules Vero. Plusieurs moustiques entiers ont été disséqués 20 minutes après le repas sanguin pour s'assurer qu'ils avaient bien ingéré une quantité similaire de particules des 2 souches virales.

Environ 10^3 particules infectieuses de YFV-Dakar ont été détectées dans les intestins moyens 3 jours après le repas sanguin. Les titres viraux sont restés élevés dans les intestins moyens jusqu'à 14 jpg. Les particules infectieuses YFV-Dakar étaient présentes dès 5 jpg dans les pattes et dès 7 jpg dans les glandes salivaires (**Figure 23.A**). Cette cinétique de réplication est comparable à celle des isolats de YFV sud-américains et africains dans la souche AE-GOI d'*Ae. aegypti* (Couto-Lima et al., 2017).

Les intestins moyens des moustiques infectés par la souche YFV-17D contiennent 10 à 20 fois moins de particules infectieuses que ceux infectés par la souche YFV-Dakar à 3 jpg (**Figure 23.B**). Des particules infectieuses ont été détectées dans les pattes d'un moustique unique à 14 jpg. Une très

faible dissémination de YFV-17D est aussi rapportée dans la souche Rexville d'*Ae. aegypti* (Miller and Adkins, 1988). Aucune particule virale infectieuse n'a été détectée dans les glandes salivaires de moustiques infectés par le virus YFV-17D.

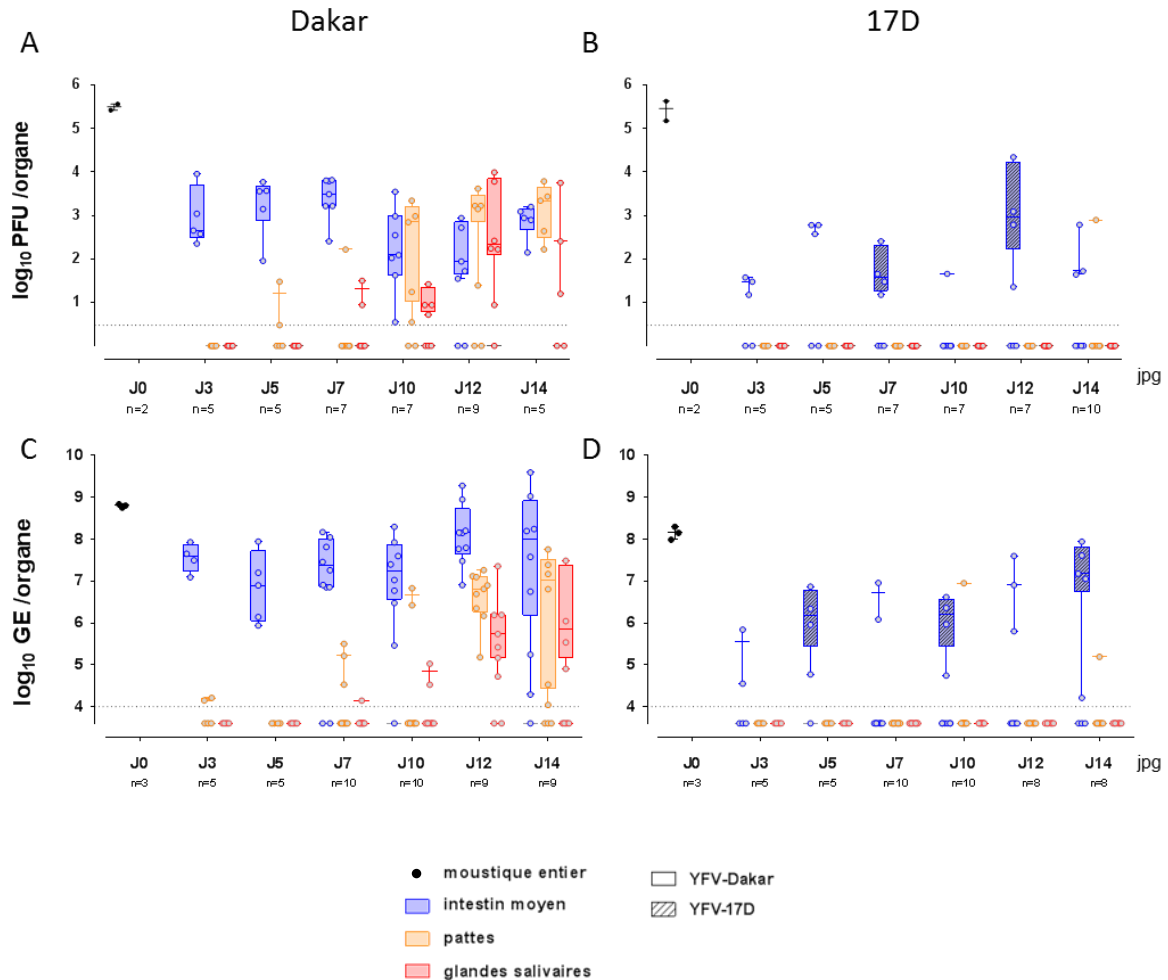


Figure 23: La souche YFV-Dakar, mais pas la souche YFV-17D, est capable de franchir la barrière de l'intestin moyen d'*Ae. aegypti* pour se disséminer.

Les moustiques ont été infectés par voie orale avec $4 \cdot 10^7$ PFU/mL de YFV-Dakar (A et C) ou de YFV-17D (B et D). Les analyses ont été effectuées à 3, 5, 7, 10, 12 et 14 jpg. Plusieurs moustiques entiers ont également été disséqués 20 minutes après le repas sanguin (points noirs). A et B Les virus infectieux présents dans l'intestin moyen, les pattes et les glandes salivaires ont été titrés par la technique de plaque de lyse sur cellules Vero. Chaque point représente les titres viraux d'un seul organe. C et D) Les quantités relatives d'ARN viral associées à un organe ont été déterminées par analyse qPCR. Les données sont exprimées en 'équivalent génome (GE)' par organe. La ligne à l'intérieur des boîtes indique la médiane. Le bas de la boîte correspond au premier quartile et le haut, au troisième quartile. Les moustaches représentent les valeurs minimales et maximales. Une expérience représentative de 3 expériences indépendantes est présentée. Le nombre d'organes (n) analysés est indiqué. Les lignes en pointillées indiquent la limite de détection.

Ainsi, contrairement à la souche YFV-Dakar, la souche vaccinale YFV-17D se dissémine peu dans la souche Paea d'*Ae. aegypti*. Ces données sont en accord avec des études antérieures réalisées avec les souches Rexville et RexD d'*Ae. aegypti* (Jennings et al., 1994; McElroy et al., 2006b, 2006a; Miller and Adkins, 1988).

1.2 Caractérisation de la dissémination par RT-qPCR

La réplication virale a ensuite été évaluée en mesurant la quantité d'ARN viral par RT-qPCR à différents temps après le repas sanguin dans l'intestin moyen, les pattes et les glandes salivaires. Comme dans les expériences précédentes, plusieurs moustiques entiers ont été disséqués 20 minutes après le repas sanguin pour s'assurer que les moustiques avaient bien ingéré une quantité similaire d'ARN des deux souches virales. Les données présentées proviennent d'une expérience représentative de trois expériences biologiques indépendantes. Environ 10^7 copies d'ARN viral ont été détectées dans l'intestin moyen des moustiques infectés par le virus YFV-Dakar 3 jours après gorgement (**Figure 23.C**). Le nombre de copies d'ARN viral par l'intestin moyen est resté élevé jusqu'à 14 jgg, indiquant que la réplication virale avait déjà atteint un plateau à des temps précoces. En accord avec les titrations par plage de lyse (**Figure 23.A**), l'ARN de YFV-Dakar a été détecté dans les pattes et les glandes salivaires de moustiques autour de 7 jgg. La quantité d'ARN viral détectée dans ces organes secondaires augmente avec le temps pour atteindre en moyenne 2.10^7 copies d'ARN dans les pattes et 10^6 copies dans les glandes salivaires. A 3 jgg, environ 5.10^5 copies d'ARN du virus YFV-17D ont été détectées dans 2 intestins moyens sur 5 (**Figure 23.D**). À 12 jgg, environ 10^7 copies de l'ARN de la souche YFV-17D ont été détectées chez 4 des 8 moustiques testés, soit 10 fois moins que chez les moustiques infectés par la souche YFV-Dakar. L'ARN de YFV-17D a été trouvé dans les pattes de 2 moustiques parmi le total de 46 moustiques gorgés prélevés 14 jours après le repas sanguin. Aucun virus n'a été détecté dans les glandes salivaires de ces 46 moustiques.

Ainsi, en accord avec nos titrations par plage de lyse (Figure 23A.B), les données de RT-qPCR confirment que le virus YFV-17D se dissémine mal dans la souche Paea. L'analyse RT-qPCR a également révélé que la souche vaccinale se répliquait moins efficacement que la souche YFV-Dakar dans les intestins moyens, suggérant l'existence d'une barrière d'infection en amont de la barrière d'échappement.

1.3 Evaluation des taux d'infection, de dissémination et de transmission

Nous avons analysé les taux d'infection, de dissémination et de transmission en compilant les données de RT-qPCR de trois expériences indépendantes. Le taux d'infection est la proportion de moustiques positifs pour l'ARN viral parmi les moustiques gorgés. Une proportion significativement plus faible d'intestins moyens étaient positifs pour l'ARN de la souche YFV-17D par rapport à la souche YFV-Dakar aux 7^{ème} et 14^{ème} jours après le repas sanguin (**Figure 24.A**). Cela suggère que la souche vaccinale est limitée par la barrière d'infection de l'intestin moyen. La dissémination virale est définie par la présence d'ARN viral dans les pattes de moustiques dont l'intestin était infecté. La souche YFV-Dakar se dissémine chez environ 40 % des moustiques infectés à 7 jpg et chez environ 90 % des moustiques à 14 jpg. A ce même moment, la souche YFV-17D s'est disséminée dans environ 10 % seulement des moustiques (**Figure 24.B**). Les taux de dissémination du virus YFV-Dakar sont conformes à ceux rapportés pour la souche YFV-Asibi (McElroy et al., 2006a) ou les isolats cliniques du Pérou (Miller and Adkins, 1988) chez les moustiques de la souche RexD. L'ARN de YFV-Dakar a été détecté dans les glandes salivaires d'environ 75 % des moustiques dont les pattes étaient infectées, révélant ainsi une transmission virale possible (**Figure 24.C**). En revanche, la transmission de la souche YFV-17D est nulle.

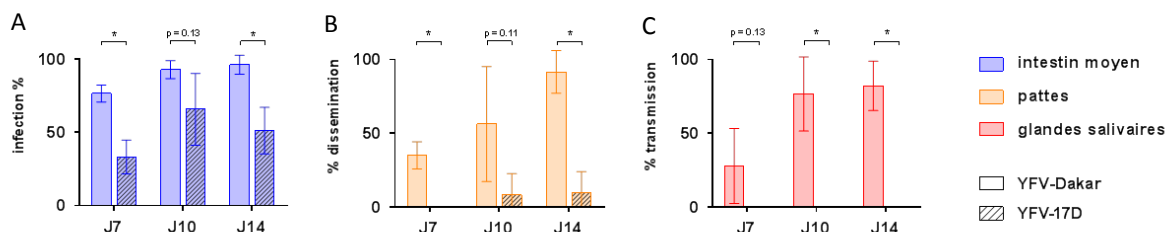


Figure 24: Taux d'infection, de dissémination et de transmission du virus YFV dans son vecteur *Aedes aegypti*.

Les taux d'infection (A), de dissémination (B) et de transmission (C) de YFV dans l'intestin moyen, les pattes et les glandes salivaires 7, 10 et 14 jours post-gorgement (jpg) ont été déterminés par analyse qPCR. Les données ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreur indiquent les moyennes \pm la déviation standard. Les analyses statistiques ont été effectuées par des t-tests multiples (* $p < 0.05$).

1.4 Détection des protéines virales par Western-Blot

Pour étudier plus en détail la capacité de réplication des 2 souches virales dans leur vecteur, la présence d'antigènes viraux dans les intestins moyens et les glandes salivaires de moustiques nourris avec du sang contenant 4.10^7 PFU/ml de virus, a été analysée par Western blot. Des anticorps dirigés contre les protéines virales E, NS1 et NS4B ont été utilisés. Les moustiques ont été disséqués 7 jours après le repas sanguin. En condition dénaturante, la protéine E est détectée dans les intestins moyens de moustiques infectés avec la souche YFV-Dakar, sous une forme majoritaire de poids moléculaire d'environ 45 kDa et une forme minoritaire de poids moléculaire d'environ 30 kDa (**Figure 25.A**). La protéine E n'est pas détectée dans les glandes salivaires 7 jours après le repas sanguin contenant YFV-Dakar, ce qui est conforme aux données de titration et de RT-qPCR présentées dans la **Figure 23**. La protéine E n'est pas non plus détectée dans les organes des moustiques infectés par la souche YFV-17D (**Figure 25.A**). Comme la protéine E, la protéine NS1 est uniquement détectée dans les intestins moyens de moustiques infectés avec la souche YFV-Dakar (**Figure 25.B**). Elle est présente sous une forme majoritaire de 45 kDa, correspondant à la taille attendue de NS1 (Knipe and Howley, 2013) et sous deux autres formes de poids moléculaire plus élevé, correspondant probablement à des formes non clivées des protéines NS1-NS2A (Chambers et al., 1990) ou bien une forme dimérique de NS1 (Lindenbach and Rice, 1999). Il est intéressant de noter que les formes de poids moléculaire plus élevé présentent deux bandes dans le cas des extraits d'intestins moyens (**Figure 25.B**), et une seule bande dans le cas d'extrait cellulaire de Aag2 (**Figure 26.B**). Ceci correspondrait peut-être à des formes N-glycosylées sécrétées (Post et al., 1991) dans les intestins moyens qu'on ne retrouve pas dans les extraits cellulaires. Il est toutefois surprenant de ne pas observer de forme monomérique N-glycosylée. Le signal détecté par les anticorps anti-NS4B n'est pas interprétable pour les échantillons d'intestin moyen alors qu'il détecte bien la protéine dans les extraits cellulaires (**Figure 26.B**). Les anticorps dirigés contre la tubuline humaine, qui sont utilisés en témoin de charge, reconnaissent la tubuline d'*Ae. aegypti*, mais, d'une manière inattendue, uniquement dans les glandes salivaires.

Afin de nous assurer que les anticorps dirigés contre les protéines virales NS1, NS4B et E reconnaissent bien les protéines de YFV-17D, des expériences contrôles ont été réalisées avec les cellules d'*Ae. aegypti* Aag2 infectées pendant 24 ou 48 h à une MOI de 0.1 avec les 2 souches virales. Les anticorps dirigés contre la tubuline humaine sont utilisés en témoin de charge. Les protéines NS1, NS4B et E sont bien détectées dans les cellules infectées, indépendamment de la souche virale utilisée (**Figure 26.A et B**).

L'absence de détection des protéines de YFV-17D dans les intestins moyens de moustiques 7 jours après le repas sanguin n'est pas due à une mauvaise reconnaissance des antigènes viraux par

les anticorps utilisés, mais traduit bien une réplication peu efficace de la souche vaccinale dans le vecteur. Ces données confirment les précédentes, obtenues par titrage et analyse en RT-qPCR (Figure 23). D'une manière intéressante, les analyses de Western blot réalisées dans les cellules Aag2 révèlent également que, comme dans le moustique, la réplication de la souche YFV-17D est moins efficace que celle de YFV-Dakar. Enfin, les profils de migration des protéines d'enveloppe des deux souches sont différents.

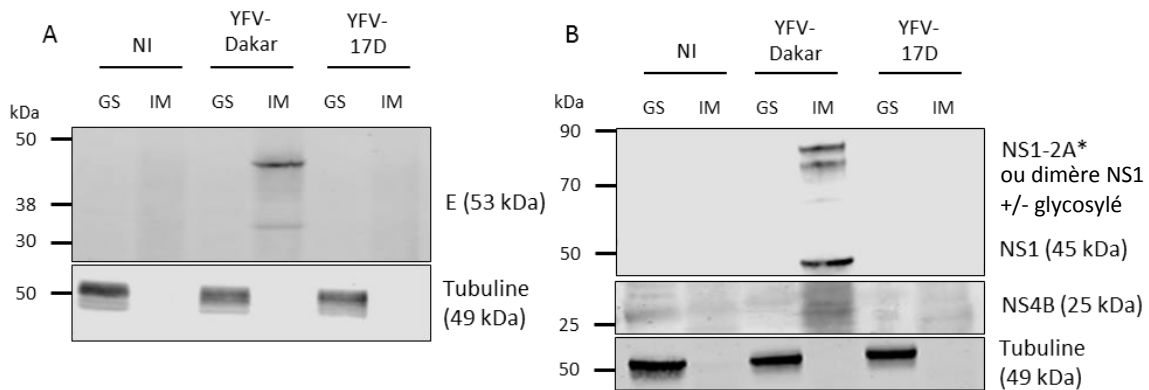


Figure 25: Les protéines virales E et NS1 sont détectées dans les intestins moyens infectés par YFV-Dakar pendant 7 jours.

Les moustiques ont été nourris avec du sang humain contenant 4.10^7 PFU/ml de YFV-Dakar, de YFV-17D ou non-infecté (NI). La présence d'antigènes viraux dans les intestins moyens et les glandes salivaires de 10 moustiques a été analysée par Western Blot à 7 jpg en utilisant des anticorps reconnaissant la tubuline ou les protéines virales NS1, NS4B et E. Des conditions non-dénaturantes ont été utilisées pour détecter les protéines E (A), dénaturantes pour l'autre membrane (B). NS1-2A* : forme non clivée des protéines NS1 et NS2A. Les marqueurs de taille de protéines sont indiqués en kDa. Les tailles attendues des protéines sont indiquées entre parenthèses. Les résultats d'une expérience sont présentés, sur trois expériences indépendantes réalisées.

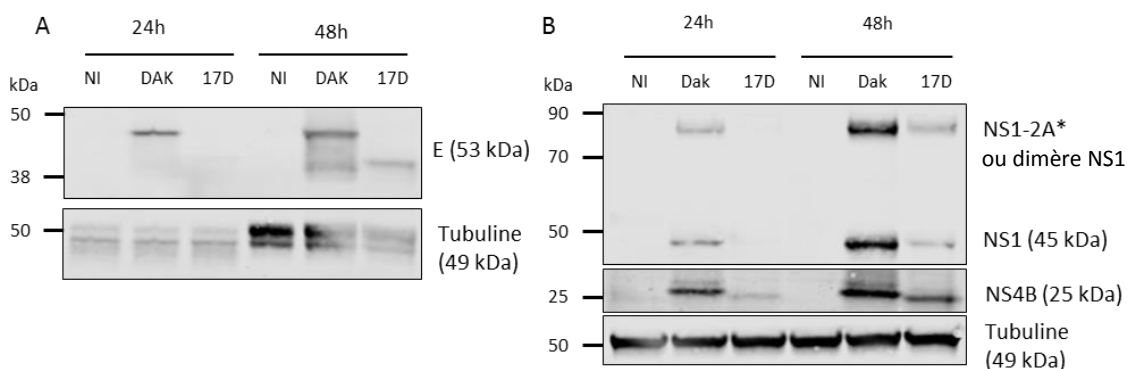


Figure 26: Reconnaissance des protéines virales E, NS1 et NS4B dans les cellules Aag2.

Les infections ont été effectuées à une MOI de 0.1. Les lysats de cellules ont été analysés par Western Blot 24 ou 48 h après l'infection en utilisant des anticorps reconnaissant la tubuline ou les protéines virales NS1, NS4B ou E. Des conditions non-dénaturantes ont été utilisées pour détecter les protéines E (A), dénaturantes pour l'autre membrane (B). NS1-2A* : forme non clivée des protéines NS1 et NS2A. Les marqueurs de taille de protéines sont indiqués en kDa. Les tailles attendues des protéines sont indiquées entre parenthèses. Les résultats d'une expérience sont présentés, sur trois expériences indépendantes réalisées.

1.5 Détection des foyers d'infection par immunofluorescence

Enfin, pour compléter les données de titrage, de RT-qPCR et de Western blot, des analyses d'immunofluorescence ont été effectuées sur des intestins moyens de moustiques 7 jours après le repas sanguin. Des anticorps dirigés contre la protéine virale NS4B ont été utilisés pour cette analyse. Des foyers de réplication sont détectés sur toute la surface des intestins moyens des moustiques infectés par la souche YFV-Dakar. Seulement un ou deux foyers de réplication de la souche YFV-17D sont observés dans les intestins moyens infectés (**Figure 27.A**).

Dans le but de quantifier la restriction de la localisation des foyers de réplication de la souche YFV-17D dans les intestins moyens et de la comparer à celle de la souche YFV-Dakar, les intestins moyens des moustiques infectés par les deux souches virales pendant 3 à 7 jours ont été coupés longitudinalement en deux. La présence d'ARN viral a été déterminée par une analyse RT-qPCR effectuée sur des demi-intestins moyens individuels (**Figure 27.B**). Parmi les moustiques qui ont ingéré le repas sanguin contenant la souche YFV-17D, 3 demi-intestins moyens sur 10 étaient positifs pour l'ARN du virus trois jours plus tard et seulement 2 sur 8 l'étaient sept jours plus tard. Ceci est en accord avec nos résultats précédents (**Figure 24.A**). Parmi ces 5 intestins moyens positifs pour l'ARN de la souche YFV-17D, un seul contenait de l'ARN viral dans ses deux moitiés (soit 20 %). D'une manière attendue (**Figure 24.A**), il a été plus facile d'obtenir des intestins moyens positifs pour l'ARN de YFV-Dakar. Douze des 15 intestins moyens (soit 80 %) contenaient de l'ARN viral dans leurs deux moitiés.

Ces expériences révèlent que la réplication de YFV-17D dans l'intestin moyen d'*Aedes* est plus confinée que celle de YFV-Dakar.

Nos analyses de titrage, de RT-qPCR, de Western blot et d'immunofluorescence montrent que la souche vaccinale se réplique faiblement dans les intestins moyens d'*Aedes aegypti* et qu'elle ne se dissémine pas, au contraire de l'isolat clinique YFV-Dakar. Nos analyses valident l'existence d'une barrière d'infection de l'intestin moyen, en amont de la barrière d'échappement dans les organes secondaires.

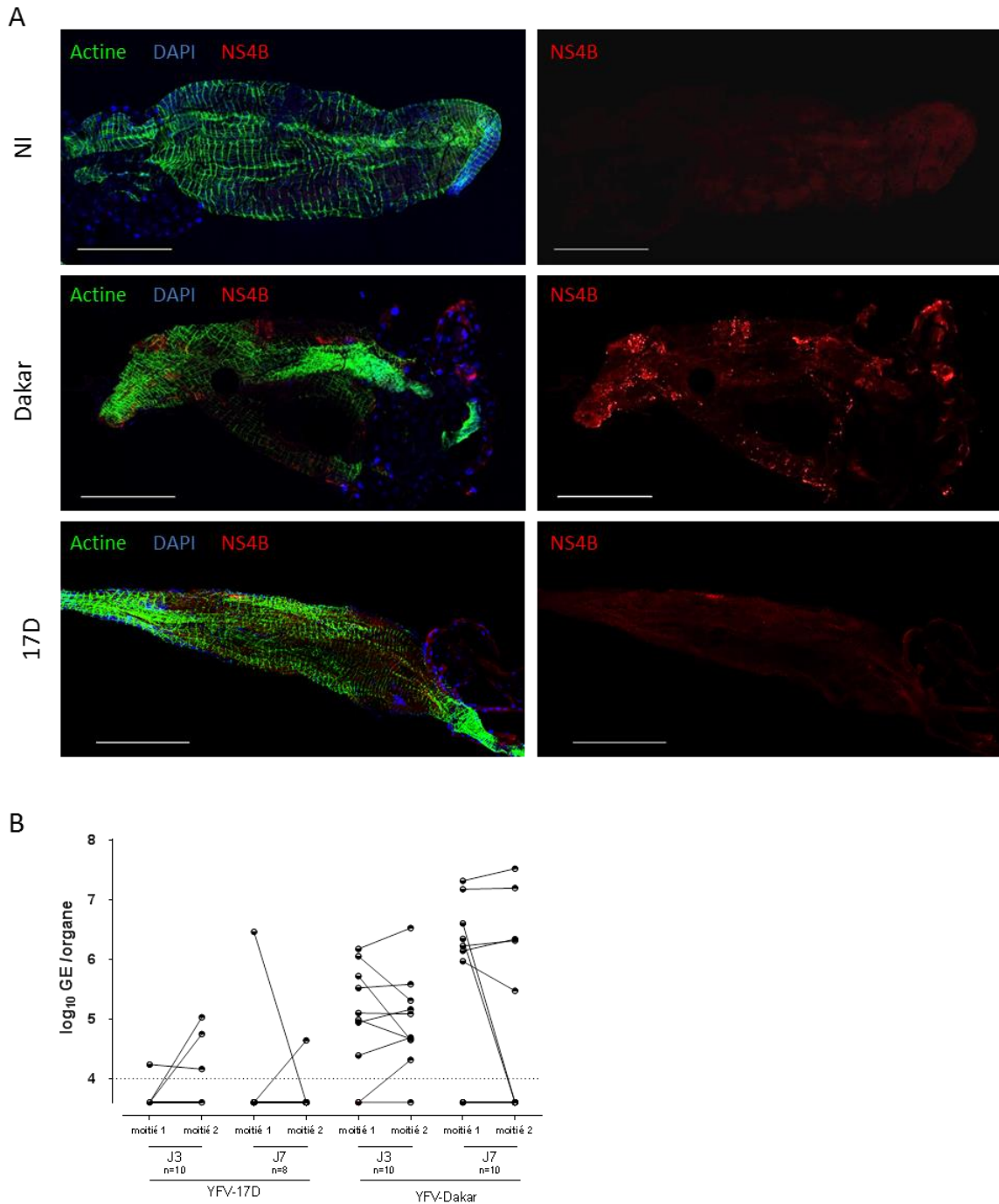


Figure 27: La réplication du YFV-17D dans les intestins est localisée dans une zone confinée.

Les moustiques ont été gorgés avec du sang humain contenant 4.107 PFU/ml de YFV-Dakar, de YFV-17D ou non infecté (NI). (A) Les intestins moyens ont été disséqués à 7 jdg, puis colorés avec du DAPI pour visualiser les noyaux (bleu), de la phalloïdine TexasRed pour visualiser l'actine (vert) et avec des anticorps spécifiques de la protéine virale NS4B (rouge). Les images ont été acquises avec un microscope confocal Zeiss LSM 720 équipé d'un objectif x40. Les barres d'échelle représentent 0.5 mm. (B) Les intestins moyens des moustiques infectés ont été coupés longitudinalement en deux parties égales. La présence d'ARN viral a été déterminée par une analyse RT-qPCR effectuée sur des demi-intestins individuels à 3 ou 7 dpj. Les données sont exprimées en équivalent génome (GE) par organe. La ligne pointillée indique la limite de détection. Ces expériences ont été réalisées une fois.

2 Les souches YFV-17D et YFV-Dakar se répliquent efficacement dans les intestins moyens d'*Ae. aegypti* lorsque les virus sont injectés dans le thorax

Nous avons voulu déterminer si les virus YFV-17D sont capables de se répliquer dans les organes d'*Ae. aegypti* lorsqu'ils sont administrés par voie non-orale. Des quantités similaires de virus YFV-17D ou YFV-Dakar ($2,5 \cdot 10^4$ PFU) ont été injectées dans le thorax de deux lots de 18 moustiques. La présence d'ARN viral a été analysée par RT-qPCR 10 jours après l'injection. Les moustiques infectés *via* un repas de sang ont servi de témoins positifs. Plusieurs moustiques entiers ont été analysés 20 minutes après le repas ou l'injection afin de s'assurer que les moustiques avaient reçu une quantité similaire d'ARN viral.

En accord avec nos expériences précédentes (**Figure 23.C et D**), environ 35 % des intestins moyens (8 sur 22) étaient positifs pour l'ARN de YFV-17D, tandis que 81 % (18 sur 22) étaient positifs pour l'ARN de YFV-Dakar 10 jours après l'administration par voie orale (**Figure 28.A**). De plus, environ 10 fois moins d'ARN viral a été détecté dans les intestins moyens infectés par la souche YFV-17D que par la souche YFV-Dakar (**Figure 28.A**). L'ARN de la souche YFV-Dakar a été détecté dans les pattes et les glandes salivaires d'environ 50 % de ces moustiques, ce qui est conforme à nos expériences précédentes. De manière également attendue (**Figure 23.C et D**), la souche YFV-17D a été détectée dans les pattes d'un moustique unique et n'a pas été détectée dans les glandes salivaires (**Figure 28.A**). Ces expériences confirment que la souche vaccinale est incapable de se propager dans les organes secondaires suite à un repas sanguin.

Lorsque les virus sont injectés dans les thorax, 100 % des intestins moyens, des pattes et des glandes salivaires sont positifs pour les deux souches virales (**Figure 28.B**). Le profil est similaire à celui décrit dans une étude précédente avec la souche d'*Aedes aegypti* RexD et analysées par titration en plage de lyse (McElroy et al., 2006b). Des quantités similaires d'ARN des souches YFV-17D et YFV-Dakar sont détectées dans les intestins moyens. Une quantité plus importante d'ARN de la souche YFV-17D que de la souche YFV-Dakar est détectée dans les pattes (**Figure 28.B**). A l'inverse, une quantité significativement plus importante d'ARN de la souche YFV-Dakar que de la souche 17D est détectée dans les glandes salivaires (**Figure 28.B**). Ceci suggère la présence d'une barrière d'infection des glandes salivaires (SGIB) plus importante pour YFV-17D que pour YFV-Dakar.

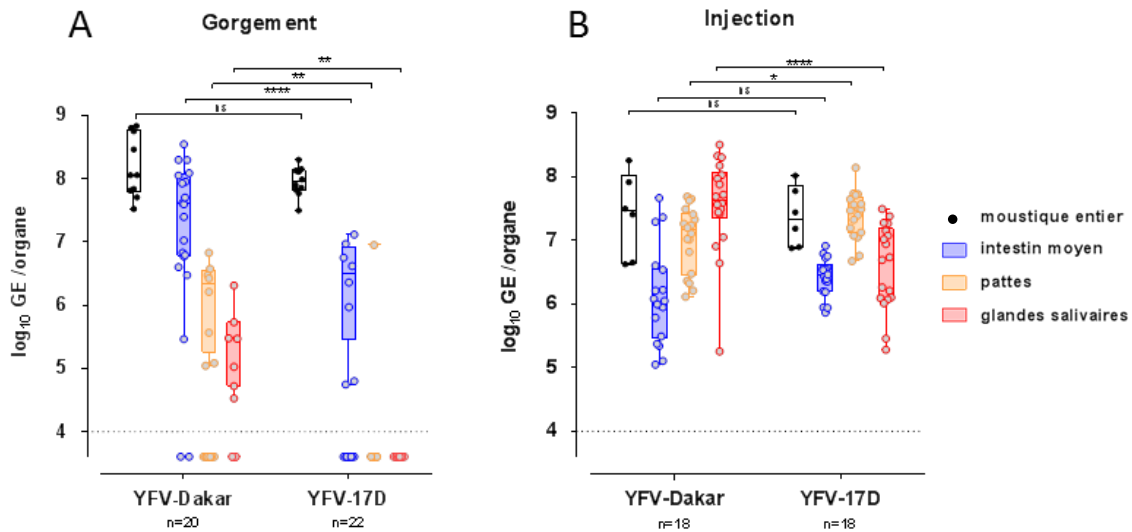


Figure 28: Les souches YFV-17D et YFV-Dakar se répliquent dans tous les organes secondaires et même les tissus de l'intestin lorsqu'ils sont injectés dans le thorax.

(A) Les moustiques ont été infectés par voie orale *via* un repas de sang contenant 4.10^7 PFU/mL de YFV-Dakar ou de YFV-17D. (B) Alternativement, les moustiques ont été inoculés par voie intrathoracique avec $2,5.10^4$ PFU de YFV-17D ou YFV-Dakar, soit 10 fois moins que la quantité prise en moyenne par les moustiques lors du repas sanguin (A). Plusieurs moustiques entiers ont également été analysés 20 minutes après l'alimentation ou l'injection afin de s'assurer qu'une quantité similaire de particules virales des deux souches virales étaient délivrées dans les moustiques. La présence d'ARN viral a été analysée par RT-qPCR 10 jours post-gorgement ou injection. Les quantités relatives d'ARN viral associées à un organe ont été déterminées par analyse qPCR et sont exprimées en équivalent génome (GE) par organe. La ligne à l'intérieur des boîtes indique la médiane. Le bas de la boîte correspond au premier quartile et le haut, au troisième quartile. Les moustaches représentent les valeurs minimales et maximales. Le nombre d'organes (n) analysés est indiqué. Les lignes en pointillées indiquent la limite de détection. Les données ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'un test de Mann-Whitney (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001).

Lors de la dissection des intestins moyens, des tissus restent associés à l'épithélium intestinal : les trachées et les muscles. Lors de l'injection intrathoracique, il est probable que les virus infectent les muscles ou les trachées, sans toutefois entrer dans les cellules épithéliales intestinales (Romoser et al., 2004). Nous ne pouvons donc pas conclure que, lors de l'injection intrathoracique, le virus atteint les cellules épithéliales de l'intestin en franchissant la barrière intestinale en 'sens inverse'.

Ces expériences indiquent que les deux souches virales se répliquent efficacement dans les organes secondaires qui sont donc permissifs pour les deux souches. La souche YFV-17D semble se répliquer aussi efficacement que la souche YFV-Dakar dans les tissus associés à l'intestin moyen lorsque le virus y pénètre *via* l'hémocœle. Ceci confirme bien le rôle de la barrière de l'intestin moyen pour la souche YFV-17D lorsqu'elle est délivrée par voie orale.

3 Comparaison de la diversité des deux souches virales

Les virus à ARN sont constitués d'une population de virus apparentés appelée quasi-espèce virale (Lauring and Andino, 2010; Rozen-Gagnon et al., 2014). Ce phénomène est une conséquence de la faible fidélité de la polymérase virale, qui est dépourvue d'activité correctrice exonucléase, ce qui entraîne un taux d'erreur élevé. Cette diversité génétique confère peut-être aux arbovirus la capacité d'adaptation qui leur permet de se répliquer à la fois chez les insectes et chez les vertébrés. Le séquençage en profondeur de la souche vaccinale YFV-17D a révélé qu'elle était peu diversifiée par rapport à la souche YFV-Asibi dont elle est dérivée (Beck et al., 2014). Cette faible diversité génétique pourrait expliquer une répllication peu efficace du YFV-17D chez les patients vaccinés. De plus, des études récentes réalisées avec le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV), qui appartient au genre *Alphavirus*, ont révélé que la diversité des virus qui se disséminent chez les moustiques est supérieure à celle des virus qui ne se disséminent pas (Patterson et al., 2018). Ces observations nous ont incité à comparer la diversité des virus YFV-17D et YFV-Dakar.

Une analyse de séquençage à haut-débit sur les stocks utilisés pour infecter les moustiques lors de notre étude a permis de déterminer une séquence consensus des virus mais aussi d'analyser leur variabilité. La comparaison des deux séquences consensus a permis d'identifier 372 mutations, dont 317 synonymes (**Figure 29.C**, barres bleues) et 55 non-synonymes (**Figure 29.C**, barres rouges). Ces différences sont dispersées le long du génome. Certaines de ces mutations non-synonymes, ainsi que les 8 présentes dans la région 3' non traduite (UTR) du génome pourraient avoir des conséquences fonctionnelles (**Figure 29.D**). Les **Figure 29.A et B** représentent les variants nucléotidiques (SNV, *single nucleotid variant*) présents et leur fréquence tout le long des génomes. Les SNV considérés représentent au moins 1 % des nucléotides séquencés à une position. Le génome de YFV-17D semble présenter d'avantage de SNV que celui de YFV-Dakar, 50 contre 18. Un SNV de YFV-17D représenté dans 44 % de la population, se trouve dans la protéine NS2A mais n'induit pas de changement d'acide aminé. Ces observations ne donnent cependant pas d'information sur la variabilité générale des génomes puisque ne concernent qu'un petit nombre de nucléotides.

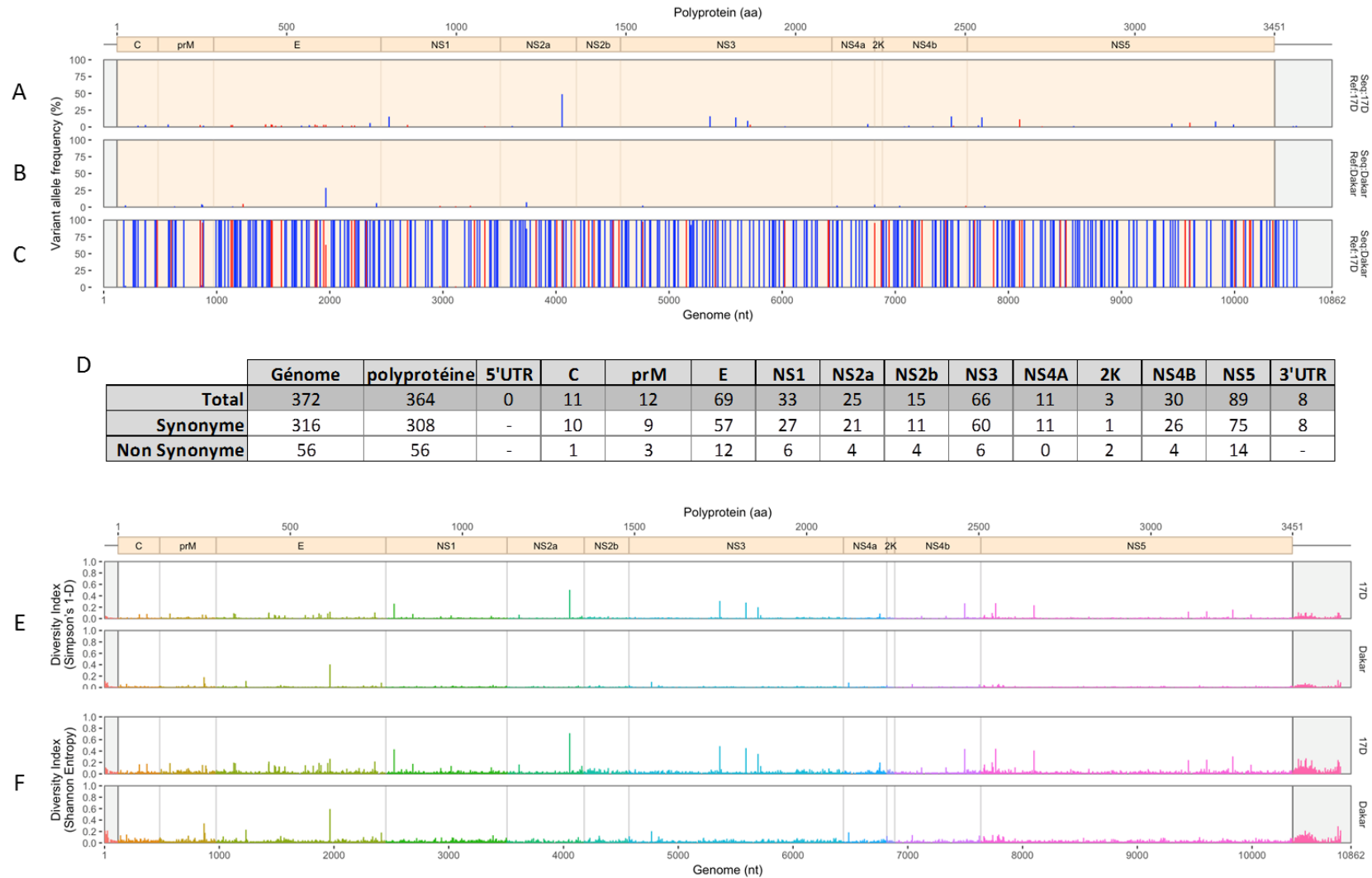


Figure 29: Séquençage des souches YFV-17D et YFV-Dakar et analyse de la diversité des génomes.

Les variants nucléotidiques (SNV) sont représentés tout le long des génomes de A) YFV-17D et B) YFV-Dakar, avec leur fréquence. Ces SNV sont synonymes (en bleu) ou non-synonyme (en rouge). Seuls les SNV de plus de 1 % sont pris en compte. C) Mutations synonymes (en bleu) ou non-synonymes (en rouge) entre les séquences consensus de YFV-17D et de YFV-Dakar, et D) leur décompte sur chaque gène. L'indice de diversité E) Simpson's 1-D et F) Shannon entropy est calculé pour chaque position du génome, pour les deux souches.

Nous avons donc estimé la diversité de chaque nucléotide des génomes viraux à l'aide des indices de diversité 1-D de Simpson (Hunter and Gaston, 1988) et de Shannon (Nishijima et al., 2012). Cette diversité est représentée sur les **Figure 29.E et F**. Afin de comparer la diversité générale, la totalité des valeurs d'indice de diversité a été comparée entre les deux génomes, puis pour chaque gène, avec une analyse statistique (test de Wilcoxon). La souche YFV-Dakar présente une diversité significativement supérieure à celle de YFV-17D (**Tableau 3**) ($p = 1,77e-03$ et $U = 56\ 957\ 560$; $p = 6,92e-08$, et $U = 56\ 180\ 896$, respectivement pour les deux indices).

Tableau 3: Comparaison de la diversité entre les génomes et pour chaque gène.

Le test statistique de Wilcoxon est utilisé pour comparer les valeurs d'indice de diversité (ID), sur le génome entier, puis pour chaque gène. * Il est à noter que les régions non couvertes n'ont pas été utilisées pour le test statistique. En vert clair les p-values significatives, $p < 0.05$. En vert foncé, les gènes dont la diversité est significativement différente pour les deux indices de diversité : C, E et NS1. Ces gènes sont plus divers dans le génome de YFV-Dakar.

échantillon	taille gène* (ntp)	Indice de Diversité : Simpson's 1-D			Indice de Diversité : Shannon Entropy		
		p-value	Wilcoxon U	ID plus fort	p-value	Wilcoxon U	ID plus fort
Genome	10862	1,77E-03	56 957 560,0	YFV-Dakar	6,92E-08	56 180 896,0	YFV-Dakar
5'UTR	118	8,30E-01	6 872,5	-	8,23E-01	6 886,5	-
C	363	1,26E-12	48 951,5	YFV-Dakar	4,74E-09	52 448,5	YFV-Dakar
prM	492	4,71E-03	110 288,0	YFV-Dakar	9,09E-02	114 760,0	-
E	1479	1,46E-07	993 520,5	YFV-Dakar	1,81E-08	987 253,5	YFV-Dakar
NS1	1056	1,33E-06	502 726,0	YFV-Dakar	8,66E-06	507 386,0	YFV-Dakar
NS2A	672	5,58E-02	215 175,5	-	1,32E-01	217 501,0	-
NS2B	390	3,84E-01	73 784,5	-	2,18E-01	72 883,5	-
NS3	1869	1,25E-01	1 706 003,0	-	1,25E-02	1 682 948,0	YFV-Dakar
NS4A	378	5,93E-01	70 222,5	-	5,08E-01	69 940,5	-
2K	69	9,39E-01	2 364,5	-	9,43E-01	2 365,5	-
NS4B	750	8,73E-05	253 052,0	YFV-17D	5,37E-01	277 304,5	-
NS5	2715	4,26E-01	3 648 291,5	-	5,33E-05	3 503 319,5	YFV-Dakar
3'UTR	511	1,33E-01	87 959,5	-	7,56E-02	87 587,0	-
Genome w/o C/E/NS1	7964	2,47E-01	30 810 751,0	-	8,28E-02	30 699 020,5	-

Lors de la comparaison de la diversité de chaque gène, trois gènes de la souche YFV-Dakar, codant pour les protéines C, E et NS1, présentent une diversité significativement plus élevée que les gènes C, E et NS1 du YFV-17D pour les deux indices (en vert foncé dans le **Tableau 3**). Ces analyses suggèrent que ces trois protéines contribuent largement à la diversité de YFV-Dakar. Comme on pouvait s'y attendre, une fois soustraits de ces trois gènes, les deux génomes viraux ne sont plus différents en termes de diversité génétique (**Tableau 3**).

Ainsi, bien que contenant un nombre inférieur de SNV à celui du YFV-17D, le génome de YFV-Dakar est plus diversifié que celui de la souche vaccinale. Cette divergence entre l'analyse de la fréquence des variantes et celle de la diversité génétique suggère que la variabilité de YFV-Dakar résulte d'un grand nombre de mutations présentes à une fréquence inférieure à 1 %.

La diversité génétique accrue de la souche clinique YFV-Dakar pourrait contribuer à sa capacité à infecter et à se disséminer efficacement chez *Ae. aegypti*.

Résultats Axe 2: La réponse de l'intestin moyen à l'infection analysée par techniques à haut débit

L'objectif de cette analyse est d'améliorer la connaissance que nous avons de la réponse du moustique à l'infection par les deux souches de YFV.

Il a déjà été démontré que certaines protéines structurales, notamment l'enveloppe (McElroy et al., 2006b) jouaient un rôle sur la dissémination du virus hors de l'intestin moyen. Les interactions entre les protéines virales et les acteurs cellulaires sont multiples. Nous nous intéressons ici aux réponses de l'hôte face à l'infection. L'hypothèse est que le moustique serait capable de mettre en place une réponse bloquante dans le cas de YFV-17D mais pas dans le cas d'une infection à YFV-Dakar. Nous avons choisi de mener en parallèle deux analyses à haut-débit d'intestins moyens infectés par les 2 souches de YFV : une analyse transcriptomique et une analyse de spectrométrie de masse.

1 Mise en place de l'étude

Statut d'infection comparés : non infecté (NI) versus YFV-17D versus YFV-Dakar. Le but est ici de comparer les réponses de l'intestin moyen face à l'infection par l'une ou l'autre des souches. Cependant, il est connu que le repas sanguin lui-même implique de très grands changements dans l'expression des gènes et des protéines présentes au cours du temps dans l'intestin moyen (Bonizzoni et al., 2011; Dissanayake et al., 2010). Nous avons donc pris soin de comparer les intestins moyens de moustique infectés avec des intestins moyens de moustiques non infectés, mais également gorgés.

Temps d'infection : jour 3 et jour 7 post-gorgement. L'infection des intestins moyens est détectée dès le jour 3 après gorgement et la dissémination est détectée par la présence de virus dans les glandes salivaires à partir du jour 7 après gorgement (**Figure 23**, p74). Ne sachant pas quand sont mis en place les phénomènes qui régulent la dissémination des virus, nous avons choisi un temps précoce (jour 3) et un temps tardif (jour 7) pour faire les prélèvements d'intestin moyen. Le temps précoce permettrait d'avantage de détecter des réponses de l'hôte en réaction à l'infection telle que des réponses immunitaires alors que le temps plus tardif, au moment où la dissémination a commencé, pourrait mettre en évidence un état cellulaire (métabolique par exemple) plus favorable au passage d'un virus ou de l'autre à travers la barrière de l'intestin moyen.

Echantillons identiques pour les études de transcriptomique et protéomique. Afin de pouvoir comparer les résultats des analyses transcriptomique et protéomique, il nous a paru important d'analyser les mêmes échantillons. Nous avons envisagé la possibilité de lyser les intestins moyens dans un tampon qui conserve à la fois les protéines et les ARN pour ensuite séparer l'homogénat en deux et extraire séparément protéines et ARN. Cependant, des études précédentes effectuées au laboratoire ont montré que cette technique donnait un rendement faible de matériel. Nous avons donc choisi de couper les intestins moyens en deux, en présumant la symétrie d'infection et de réponse à l'infection, et d'analyser les demi intestins moyens indépendamment.

Détection de l'infection. Pour étudier les phénomènes qui contrôlent la dissémination, il est primordial que les intestins moyens soient au préalable infectés. Autrement dit, afin d'étudier la barrière d'échappement (MEB), il faut que la première barrière d'infection (MIB) soit franchie. La fréquence de détection du virus dans les intestins moyens des moustiques n'atteint pas 100 %. Ceci est particulièrement vrai aux temps précoces d'infection, et dans le cas de l'infection par YFV-17D (**Figure 23**, p74). Nous avons donc vérifié la production d'ARN viral par RT-qPCR dans chaque demi-intestin moyen destiné au séquençage. Nous avons également vérifié la production de la protéine virale NS4B dans l'autre moitié de chaque demi-intestin correspondant par la technique de 'Dotblot' en utilisant des échantillons infectés soit par la souche YFV-17D soit par la souche YFV-Dakar (**Figure 30**). L'expérience présente beaucoup plus d'échantillons YFV-17D que YFV-Dakar car ces échantillons présentent moins d'infection et sont donc susceptibles d'être plus proches de la limite de détection. De manière surprenante, seulement 4 échantillons positifs en RT-qPCR sur 8 présentent un signal positif en DotBlot. De manière similaire, deux négatifs en RT-qPCR sur 6 échantillons présentent un signal positif en Dotblot. Il n'y a donc pas de corrélation entre les quantités d'ARN viral détectées en RT-qPCR et la quantité de protéine NS4B détectée par DotBlot. Nous avons conclu que la technique de DotBlot était moins sensible que la RT-qPCR et qu'elle ne pouvait pas être utilisée pour identifier les échantillons positifs. Nous avons donc rassemblé les demi-intestins moyens validés par RT-qPCR pour le séquençage, et rassemblés les demi-intestins moyens « frères » pour la protéomique (**Figure 31**).

Choix du nombre d'échantillons à analyser. Il est possible d'extraire environ 800 ng d'ARN total d'un seul intestin moyen de moustique. La quantité d'ARN nécessaire pour réaliser un séquençage RNA-Seq est bien en-deçà : des librairies TruSeq® Stranded mRNA LT Sample Prep (Illumina) ont déjà été préparées et séquencées par la plateforme de séquençage de l'Institut Pasteur à partir de 120 ng d'ARN. La quantité d'ARN contenue dans un demi-intestin moyen n'est donc pas limitante. Il est possible de réaliser une analyse protéomique sur un intestin moyen unique. Nous avons réalisé des tests préliminaires qui montrent que l'on peut détecter jusque 2000 protéines différentes dans un intestin moyen unique. Mais l'identité des protéines détectées est très variable, rendant la

comparaison des échantillons impossible. Il faut augmenter la quantité de matériel pour pouvoir comparer les échantillons. La quantité d'intestin moyens infectés dans tous les réplicats expérimentaux nous a permis de rassembler 8 demi-intestins moyens par échantillon.

Choix du nombre de réplicats biologiques Afin de s'affranchir de l'effet éventuel d'un élevage de moustique particulier, ou d'une étape de gorgement particulière, nous avons répété le gorgement des moustiques, incubation et récolte des intestins moyens 3 fois, à environ 2 mois d'intervalle.

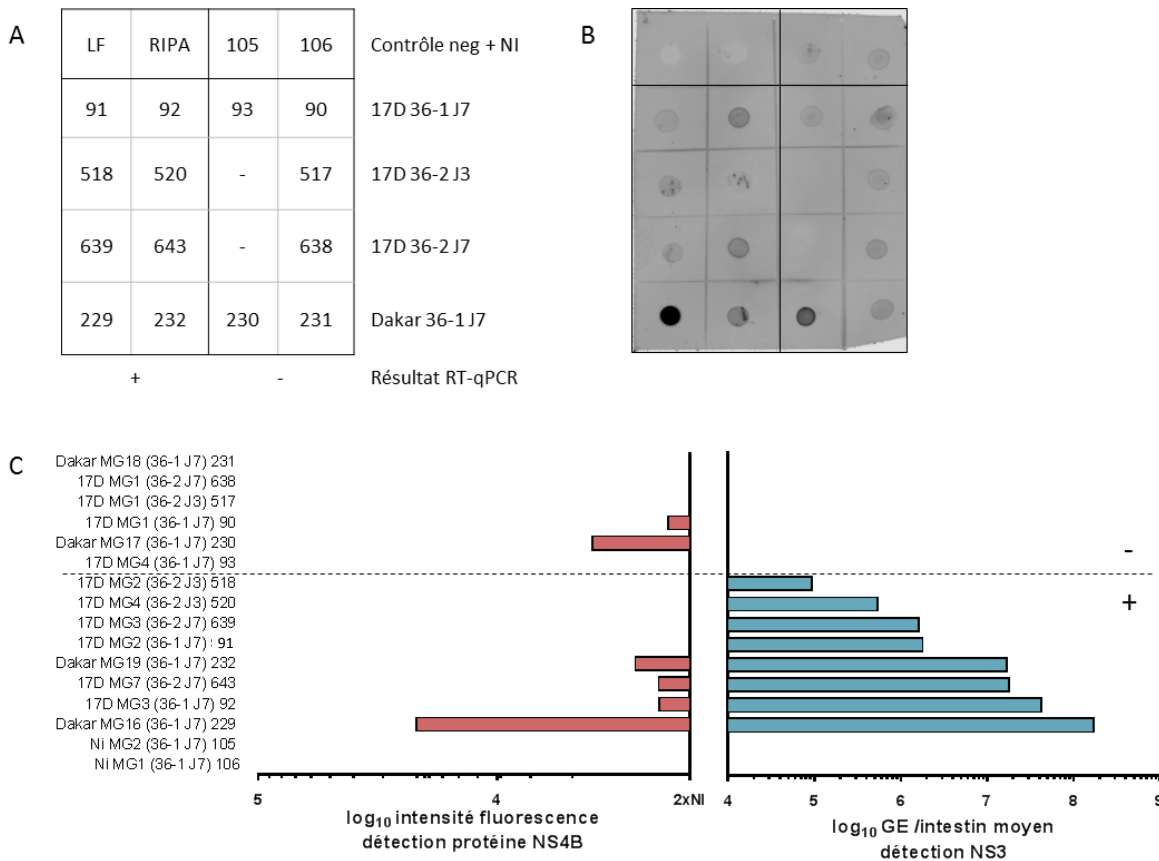


Figure 30: Détection de la réplication virale dans les deux moitiés d'intestin moyen par deux méthodes : DotBlot et RT-qPCR.

A) Plan de dépôt des échantillons pour le DotBlot. Les échantillons choisis réparti en fonction de leur charge virale détectée en RT-qPCR : (+) pour supérieur à 10⁴ GE/organe, (-) pour inférieur à 10⁴ GE/organe. Les chiffres indiquent l'identité de l'échantillon (retrouvées en C). Les contrôles sont les tampons utilisés pour lyser les échantillons (LF : Label-Free) et pour déposer les échantillons sur la membrane (RIPA). B) Membrane de DotBlot marquée avec un anticorps ciblant la protéine NS4B. L'intensité de fluorescence est mesurée avec un lecteur de fluorescence. Un échantillon est considéré comme positif s'il émet un signal supérieur à deux fois le signal des échantillons non-infectés. C) Comparaison des signaux de fluorescence de la détection protéique par DotBlot et de la détection du génome viral par RT-qPCR. L'ordonnée à l'origine est le seuil de positivité dans les deux cas.

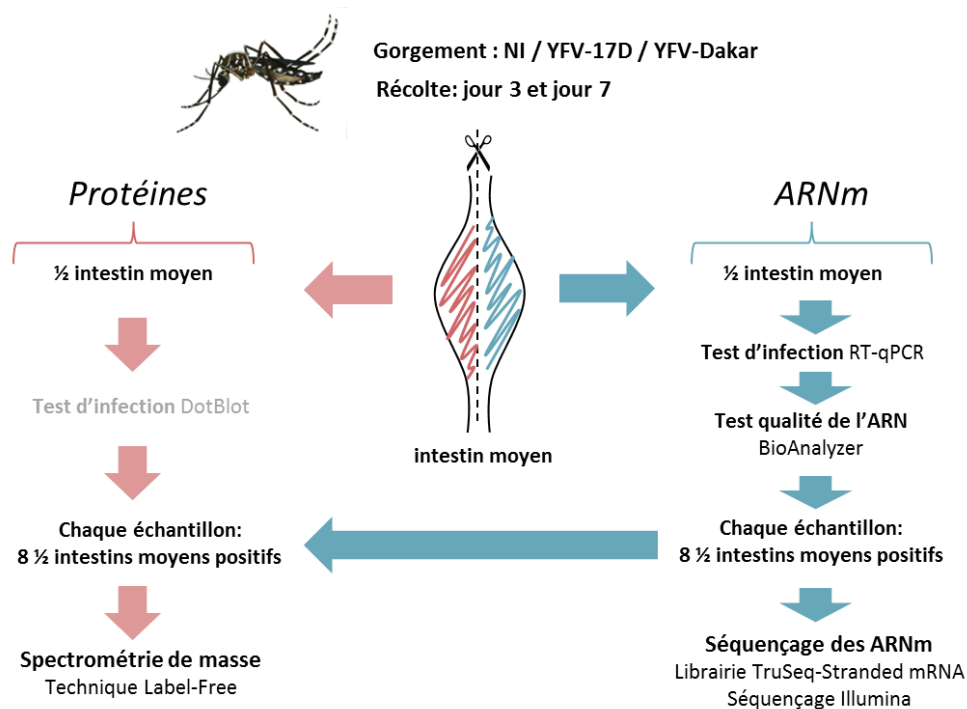


Figure 31: Méthode de récolte et préparation des échantillons pour les analyses de transcriptomique et protéomique.

2 Etude transcriptomique

Le projet de transcriptomique a été réalisé en collaboration avec la plateforme de séquençage Transcriptome et Epigénome de l'Institut Pasteur (pôle Biomics, Centre de Ressources et Recherches Technologiques), en tant que projet SLX153.

2.1 Rapport sur la production des données

2.1.1 Qualité de la préparation de la librairie

Les ARN des 8 demi-intestin moyens sont extraits avec une méthode Trizol, et leur qualité est vérifiée grâce à un BioAnalyzer avant d'être rassemblés pour former les échantillons à séquencer, soit 18 au total pour les 3 réplicats biologiques. La qualité de ces échantillons est également vérifiée. Tous les échantillons présentent un profil correct, typique des ARN dénaturés d'insecte: un grand pic de fluorescence à 2000 nt, contenant les ARN 18S, 28S α et 28S β , et un petit pic de fluorescence à 150 nt contenant les ARN 5.8S (Winnebeck et al., 2010). A titre d'exemple, la **Figure 32** présente les profils des échantillons NI/17D/Dakar, du jour 7, réplicat n°2.

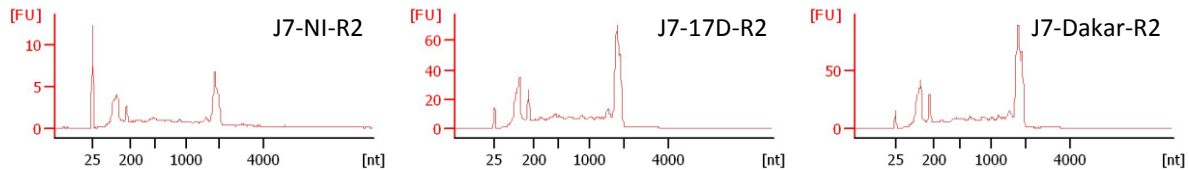


Figure 32: Qualité des échantillons d'ARN

Electrophérogamme de BioAnalyzer montrant le profil de 3 échantillons d'ARN (ARN de 8 demi-intestin moyens). La quantité d'ARN est mesurée par fluorescence (FU, fluorescence unit) en fonction de la taille des fragments (nt).

Une librairie directionnelle est préparée à partir de 200 ng de ces échantillons : les ARNm sont purifiés, sans déplétion des ARN ribosomaux, puis fragmentés et amplifiés pour obtenir une librairie de fragments de 280 nt. La **Figure 34** montre le profil BioAnalyzer des mêmes échantillons que précédemment: le pic de fluorescence en deçà de 300 pb signifie que nos librairies font la taille attendue. La concentration de l'échantillon J7-NI-R2 est faible mais suffisante pour être séquencée.

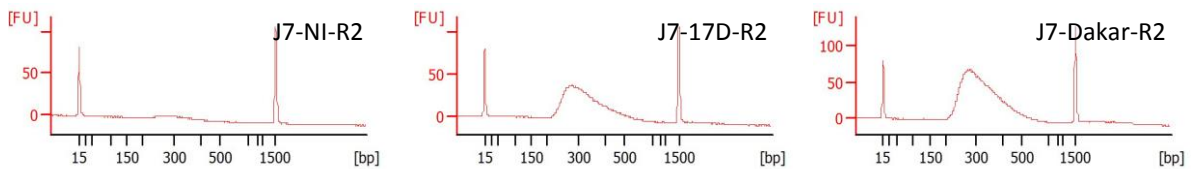


Figure 34: Qualité des librairies

Electrophérogamme de BioAnalyzer montrant le profil ADNdb des librairies produites pour 3 échantillons. la quantité d'ADN est mesurée par fluorescence (FU, fluorescence unit) en fonction de la taille des fragments (nt).

2.1.2 Qualité du séquençage

La densité de cluster identifié dans les canaux (*lanes*) est montrée sur la **Figure 33**. La quantité optimale est de 1 million +/- 100 reads/mm². Le filtrage sur la qualité des clusters a conservé entre 91.7 et 92.7 % des clusters. Il est considéré qu'en-deçà de 70 % de cluster conservés, il y a un défaut de qualité.

« Evaluation du Q score ». Une façon d'estimer la qualité du séquençage est d'évaluer le « Q score », ici à l'aide de l'outil FastQC. Plus Q est élevé, plus l'identité du nucléotide est certaine. Un score de 20 donne un taux d'erreur de 1 %, alors qu'un score de 30 donne

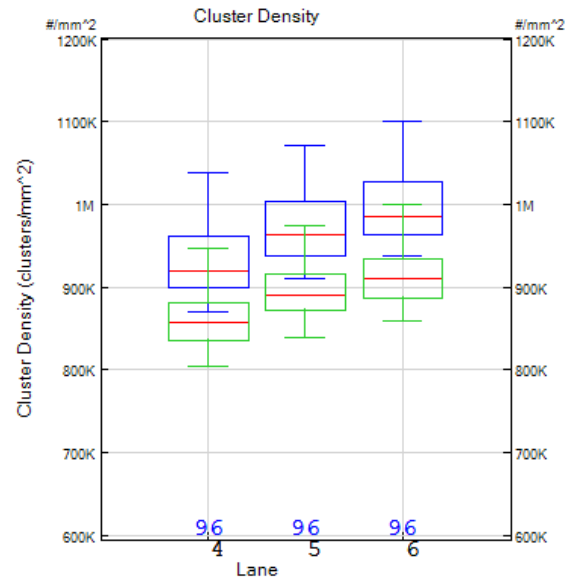


Figure 33: Densité de clusters détectés dans chaque canal.

En bleu: nombre brut. En vert: nombre après filtrage sur la qualité des clusters.

un taux d'erreur de 1 %. Le score de nos expériences est en moyenne égal à 36 pendant la quasi-totalité du séquençage, il diminue un peu à partir du cycle 60 (sur 65 cycles) mais reste au-dessus de 30. Ces scores nous confortent dans la qualité du séquençage.

Détection de PhiX dans les échantillons. Les échantillons ont été complétés (*spiking*) avec 1 % de génome de phage PhiX. Comptabiliser la quantité de *reads* attribués au PhiX après séquençage est une manière d'évaluer la qualité du séquençage. Il est considéré comme acceptable de détecter entre 0.5 et 2 % de PhiX. Nos valeurs rentrent bien dans cet intervalle : le **Tableau 4** montre que nos échantillons contenaient entre 1.01 et 1.20 % de *reads* alignés sur le génome du phage PhiX.

Tableau 4: vérification du pourcentage de PhiX détecté dans les échantillons.

	<i>Reads</i> alignés sur PhiX (%)	Taux d'erreur (%)
Canal 4	1.20 +/- 0.031	0.16 +/- 0.058
Canal 5	1.10 +/- 0.029	0.17 +/- 0.105
Canal 6	1.01 +/- 0.027	0.16 +/- 0.071

2.1.3 Alignement sur le génome du moustique

L'alignement des *reads* obtenus a été faite sur la dernière version disponible du génome du moustique *Aedes aegypti* (AaeL5.0) (Matthews et al., 2018). Les *reads* alignés sur 28 317 éléments du génome sont comptés. Ces éléments (*features*) peuvent être des gènes, des exons, des promoteurs, des régions intergéniques, ou une localisation chromosomique. Environ 75 % des *reads* ont pu être alignés sur le génome, et 50 % ont pu être affectés à un élément du génome. Les raisons de non affectation sont multiples: non alignement, une affectation à plusieurs éléments qui rendent l'identification impossible ou un alignement sur une zone non annotée. La détection d'ARN ribosomiaux est de 1 à 2 %, ce qui représente une proportion acceptable. Puisque le nombre de *reads* comptés n'est pas exactement le même dans tous les échantillons, une normalisation est appliquée : elle permet de comparer les comptages de *reads* pour un élément du génome entre les différents échantillons.

Les données produites par l'analyse transcriptomique répondent à tous les critères qualité. Elles semblent dignes de confiance.

2.2 Analyse des données

2.2.1 Analyse globale des données

L'analyse globale prend en considération le tableau complet avec les 18 échantillons et les *reads* comptés pour les 28 000 *features*, et cherche à savoir quels sont les échantillons qui se ressemblent le plus.

Dendrogramme. Une première façon de visualiser les données dans leur globalité est de représenter la distance entre les différents échantillons sur un dendrogramme. La **Figure 35** montre les distances (distance euclidienne) entre les échantillons sur un dendrogramme construit selon le critère de Ward. Un regroupement des échantillons par critère biologique, sans effet de réplicat biologique est attendu. Dans notre cas, les critères biologiques sont le statut d'infection (NI/17D/Dakar) et le jour d'infection (J3/J7).

Nous observons une répartition dans 3 groupes, annotés de 1 à 3 sur la **Figure 35**. La répartition des échantillons ne suit pas le profil attendu puisqu'il n'y a pas de séparation claire entre les états d'infection. Quelques regroupements en fonction du jour d'infection sont observés.

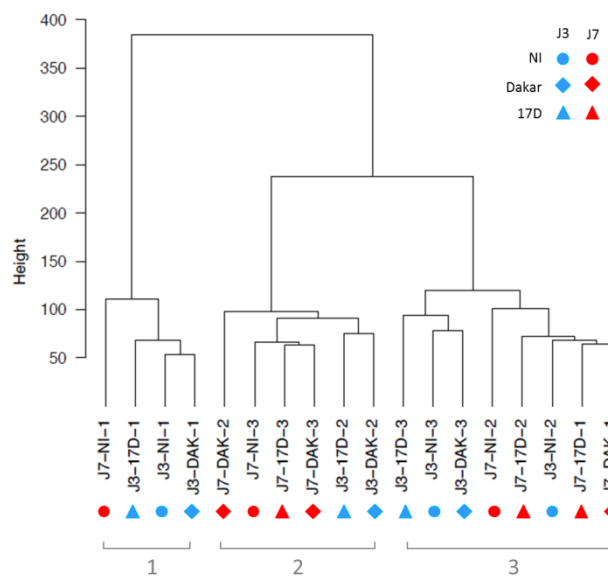


Figure 35: Dendrogramme regroupant les échantillons selon la distance euclidienne qui les sépare. Les trois principaux groupes sont notés 1, 2, 3.

Analyse par composantes principales. Une autre façon de visualiser les échantillons et leur diversité est de réaliser une analyse en composantes principales (ACP, PCA en anglais). Elle permet de projeter les informations de notre jeu de données qui possède plus de 28 000 dimensions correspondant aux *features* en un nombre restreint de dimensions, ici les composantes principales (PC), en conservant le maximum d'informations. La **Figure 36** représente les 3 principales composantes (PC1, PC2 et PC3), représentant respectivement 70.4, 8.01 et 5.08 % de la variabilité des échantillons. Nous ne détectons pas non plus de regroupement par état d'infection. Comme sur le dendrogramme, la composante PC1 met en évidence le regroupement des échantillons NI/17D/Dakar au jour 3, réplicat 1. La composante PC3 semble montrer un regroupement dépendant du jour d'infection des échantillons.

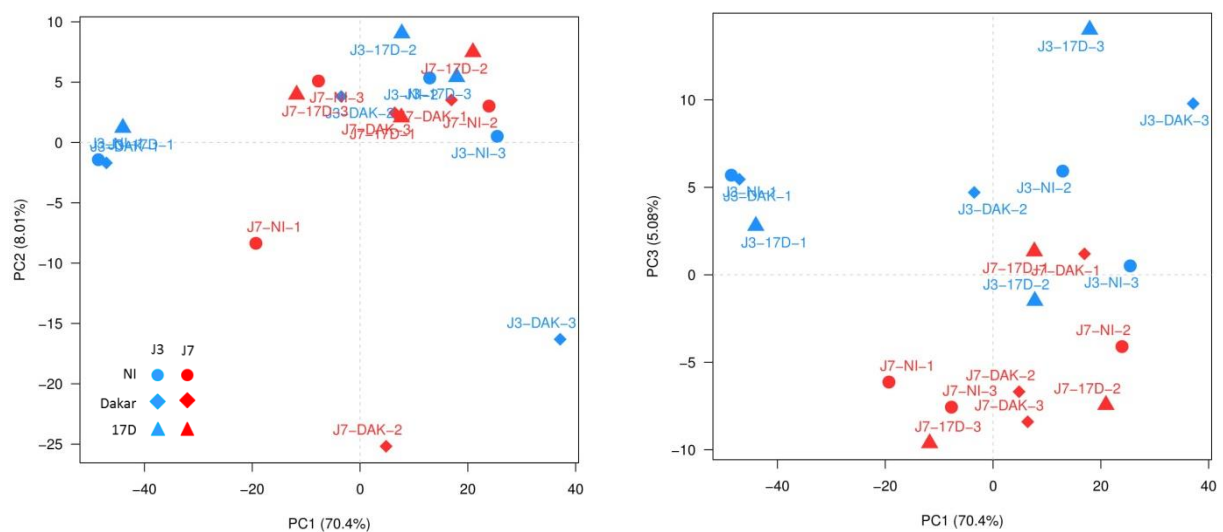


Figure 36: Analyse par composantes principales.

Les trois principales composantes sont représentées, avec le pourcentage de variance qu'elles représentent.

Les données globales semblent indiquer que l'état d'infection différencie peu les échantillons. Il semblerait que le jour de prélèvement des intestins moyens, et donc l'effet de la digestion du repas sanguin au cours du temps ait un effet plus visible que l'infection sur la transcription des gènes. De manière inattendue, un effet du réplicat biologique est aussi parfois observé.

Il a été montré que lors d'infection par virus du Chikungunya (CHIKV), qui se réplique efficacement dans les cellules du moustique, la présence de virus dans le repas sanguin n'affecte que très peu le profil transcriptomique (Dong et al., 2017). De manière similaire à notre étude, l'analyse globale des échantillons (ACP, dendrogramme) ne montre pas de rassemblement en fonction du statut d'infection (NI/CHIKV), mais plutôt en fonction du type de repas sanguin (salin/protéique) et du jour de prélèvement (J1/J2). L'analyse différentielle des échantillons révèle cependant quelques gènes dont l'expression est régulée en fonction de l'infection : aux jours 1 et 2 post-gorgement, moins de 80 gènes

voient leur expression régulée spécifiquement par la réplication du CHIKV, contre plus de 6000 gènes avec une expression régulée suite au repas sanguin.

Ainsi, dans notre cas, même si l'analyse globale ne montre pas de rassemblement en fonction de l'état d'infection, il semble possible d'observer une régulation spécifique de certains gènes en fonction de l'état d'infection en effectuant une analyse différentielle. Le fait que nos échantillons ne se rassemblent pas clairement en fonction du jour de prélèvement reste problématique.

2.2.2 Analyse différentielle de l'expression des gènes

La comparaison de l'expression des différents ARN messagers entre les conditions a été réalisée avec l'outil DESeq2. Elle est exprimée en coefficients d'expression différentielle en $\log_2(FC)$. La robustesse de l'information est testée par un test statistique. La p-value obtenue permet de sélectionner les ARN messagers dont l'expression est modifiée avec certitude (seuil : p-value < 0.04). Cette p-value a subi une correction de Benjamini-Hochberg, prenant en compte un taux de faux positif de 0.05 %.

Modulation des gènes au cours du temps. Le Tableau 5 résume le nombre de gènes dont l'expression est modulée au cours du temps, dans les différents états d'infection. 18 gènes sont régulés entre les jours 3 et 7 pour les conditions non infectées, et 35 gènes (qui n'ont pas la même identité) entre les jours 3 et 7 pour les conditions infectés 17D et DAK. Ces nombres sont particulièrement faibles par rapport aux 6000 gènes modulés dans des intestin moyens de moustique *Aedes aegypti* infectés par le CHIKV (Dong et al., 2017).

Tableau 5: Nombre d'éléments up-, down- régulés et total pour chaque comparaison entre les J3 et J7.

Test vs Référence	Nb up-régulé	Nb down-régulé	Total
J7-NI vs J3-NI	9	9	18
J7-17D vs J3-17D	19	16	35
J7-DAK vs J3-DAK	30	5	35

Modulation des gènes en fonction de l'infection. Le Tableau 6 résume le nombre de gènes dont l'expression est modulée en fonction de l'état d'infection, et ce, aux différents temps de prélèvement. Les nombres de gènes régulés identifiés sont très faibles, autant pour les comparaisons NI/YFV que pour les comparaisons DAK/17D (sur fond orange). Les identités des éléments régulés sont détaillées dans le Tableau 7. Elles ne concernent que des ARN qui codent pour des protéines dont la fonction est inconnue. Pour tous ces éléments, le nombre de *reads* comptés est toujours très faible, voire nul. Cela explique que les comparaisons peuvent aboutir à des valeurs de $\log_2(FC)$ importantes

et à des p-value ajustées significatives. Il ne faut donc pas les prendre en compte. Prenons par exemple 4 éléments surlignés en vert dans le Tableau 7. Ils ont été identifiés avec les mêmes *reads*, donc doivent correspondre à une même zone du génome, peut-être des variants d'un même transcrit. Ces éléments sont identifiés comme down-régulés pour la comparaison J3-DAK vs J3-17D et up-régulés pour la comparaison J7-DAK vs J7-17D. Voici le nombre de *reads* comptés (après normalisation) pour chaque condition :

J3-DAK vs J3-17D ; condition DAK : 0,9,1 ; condition 17D : 0,0,0

J7-DAK vs J7-17D ; condition DAK : 0,0,0 ; condition 17D : 0,2,0

Tableau 6: Nombre d'éléments up-, down- régulés et total pour chaque comparaison entre les états d'infection.

Test vs Référence	Nb up-régulé	Nb down-régulé	Total
J3-17D vs J3-NI	2	0	2
J3-DAK vs J3-NI	0	0	0
J3-DAK vs J3-17D	0	6	6
J7-17D vs J7-NI	0	0	0
J7-DAK vs J7-NI	0	0	0
J7-DAK vs J7-17D	6	1	7

Tableau 7: Identité des éléments up- ou down-régulés identifiés, selon l'annotation du génome d'*Aedes aegypti* (version AaeL5.0). Les éléments partageant la même case (rna10203-10206) ont été identifiés avec exactement les même *reads*. Il est intéressant de noter que ces 4 éléments sont identifiés up-régulés pour la comparaison DAK/17D au J3 et down-régulés au J7.

Test vs Référence	Régulation	Identité (AaeL5.0)	Gène
J3-17D vs J3-NI	Down	rna19554	Fonction inconnue
		rna4623	Fonction inconnue
J3-DAK vs J3-17D	Up	rna19554	Fonction inconnue
		rna10203	Fonction inconnue
		rna10204	
		rna10205	
rna10206			
J7-DAK vs J7-17D	Down	rna4623	Fonction inconnue
		rna10203	Fonction inconnue
		rna10204	
		rna10205	
	rna10206		
Up	rna8273	Fonction inconnue	
	rna9302	Fonction inconnue	
		rna22447	Fonction inconnue

Les données de ce séquençage sont malheureusement inexploitable. Il est surprenant de ne pas détecter de gènes différentiellement exprimés entre les échantillons d'intestin moyens infectés avec YFV et les intestin moyens non-infectés.

3 Etude protéomique (1)

Le projet de protéomique a été réalisé en collaboration avec l'unité de spectrométrie de masse structurale et protéomique de l'Institut Pasteur (CITECH, Centre d'Innovation et de Recherche Technologique).

La technique de spectrométrie de masse permet d'identifier les peptides. Leur identité est déterminée par comparaison avec une banque de donnée de peptides, ici les peptides du protéome d'*Aedes aegypti*. Seules les protéines pour lesquelles 1 peptide unique au moins a été détecté, et ce dans 3 conditions sur 6 pour une comparaison de 2 conditions sont incluses dans l'analyse.

Détection de peptides viraux dans les échantillons. Les virus YFV-17D et YFV-Dakar sont détectés en comptabilisant le nombre de peptides correspondant à la polyprotéine virale (**Figure 37**). De manière attendue, les échantillons non infectés ne présentent aucun peptide viral. Les quantités de virus détectées dans les différents échantillons sont très variables. La détection virale est plus faible au jour 3 qu'au jour 7, et la détection est plus faible pour YFV-17D que pour YFV-Dakar. Aucun peptide n'est détecté au jour 3 pour YFV-17D, alors qu'en moyenne, 16 peptides sont détectés au jour 7. Pour YFV-Dakar, 13 peptides en moyenne sont détectés au jour 3 contre 70 au jour 7.

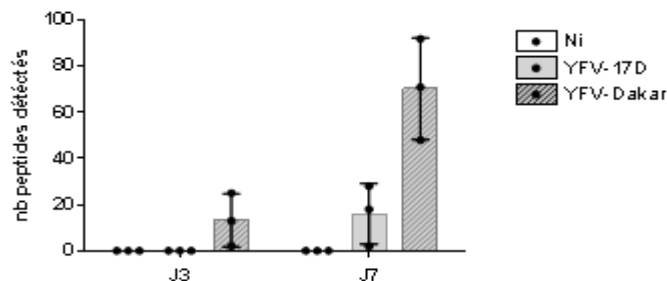


Figure 37: nombre de peptides viraux détectés dans chaque échantillon.

Quantification de l'infection impossible pour les conditions YFV-17D. Une intensité de détection (intensité LFQ pour *Label-Free Quantification*) est attribuée aux protéines détectées afin de comparer la présence de virus dans plusieurs échantillons. Il est possible de calculer une différence de présence seulement quand les deux protéines sont détectées dans les deux échantillons. Il n'est donc pas possible de chiffrer la présence du virus dans les échantillons par rapport aux échantillons NI. Pour les conditions YFV-17D, il n'y a pas assez de peptides détectés pour calculer de manière certaine des intensités, même dans le cas de J7 YFV-17D où respectivement 18, 28, 2 peptides différents sont

détectés. Pour les conditions YFV-Dakar, les intensités peuvent être calculées et peut affirmer qu'il y a 21 fois plus de virus au jour 7 qu'au jour 3 (p-value ajustée 0.00257).

Comparaison échantillons YFV-17D / YFV-Dakar abandonnée. La détection de YFV-17D est non quantifiable à J3 et à J7, alors que l'infection YFV-Dakar est détectable et quantifiable. Il ne semble pas possible de comparer les quantités de protéines présentes dans les échantillons alors que les quantités de virus sont aussi différentes.

Ces données suggèrent que la proportion de cellules d'intestin moyen infectées par YFV-17D doit être beaucoup plus faible que celle infectées par YFV-DAK, ce qui rend la comparaison d'expression protéique biaisée. Toutes les protéines dont la modulation est corrélée avec l'intensité d'infection ne peuvent pas être prises en compte. La possibilité de sélectionner des protéines autrement régulées est analysée dans la discussion.

Nous avons décidé de ne pas exploiter nos données pour comparer les réponses des intestins moyens à l'infection des 2 souches virales.

4 Etude protéomique (2)

Nous avons décidé d'exploiter nos données afin d'analyser la réponse du moustique à l'infection par le virus YFV-Dakar. Une analyse de ces résultats pourrait permettre de mettre en évidence des facteurs anti- ou pro-viraux importants dans la réplication du virus dans l'intestin moyen du moustique.

4.1 Analyse des données

Nous avons choisi de travailler au jour 7 post-gorgement. Ce temps de prélèvement correspond à un pic de réplication du virus dans l'intestin moyen (**Figure 23.A**, Axe 1 p74). Les réponses de l'intestin moyen peuvent être importantes au jour 3 également. Il est en effet envisageable qu'une réponse précoce à la présence du virus dans l'intestin moyen puisse jouer sur la réplication. Toutefois, le signal infectieux reste faible dans les intestins moyens de moustique à J3 (**Figure 37**), c'est pourquoi nous avons choisi d'exploiter les données du jour 7 pour identifier à plus forte chance une réponse cellulaire.

4.1.1 Nombre de protéines détectées

L'analyse des données par le logiciel MaxQuant permet de déterminer le nombre de protéines différentes identifiées dans les échantillons. La **Figure 38** montre que 2 746 protéines ont été identifiées dans les trois réplicats des échantillons infectés par YFV-Dakar, et 2 746 protéines identifiées dans les réplicats des échantillons NI. L'identité de ces protéines n'est cependant pas identique et le fait que leur nombre soit identique est un hasard. Les diagrammes de Ven montrent le nombre de protéines identifiées dans chaque réplicat et le nombre de protéines qu'ils partagent avec les autres réplicats. En moyenne, 3 017 protéines ont été détectées dans chaque réplicat, dont 91 % partagées avec les 2 autres réplicats, 3.2 % partagées avec un autre réplicat et 2.6 % uniques.

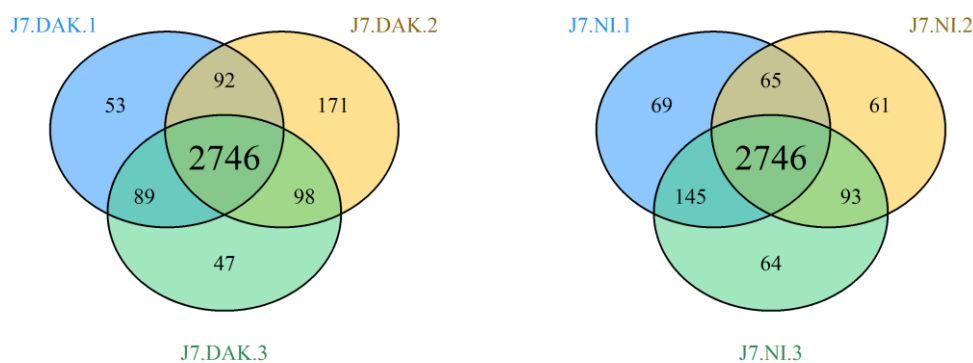


Figure 38: Diagrammes de Ven représentant le nombre de protéines identifiées dans chaque échantillon.

4.1.2 Analyse globale des données

Le **dendrogramme** de la **Figure 39** permet de regrouper les échantillons en fonction de leur distance. Un groupe d'échantillon avec tous les réplicats des conditions infectées est observé. Les conditions non infectées sont regroupées avec toutefois un échantillon proche des conditions infectées. De la même manière, la deuxième composante de l'analyse par composantes principales (**Figure 41**), qui explique seulement 1.73 % de la variabilité, regroupe les échantillons infectés entre eux. Cela conforte le fait que les réplicats se ressemblent beaucoup et que les protéines qui les différencient sont très peu nombreuses.

La **matrice de corrélation** (**Figure 40**) indique le taux de ressemblance entre les échantillons. Il y a des corrélations élevées entre les échantillons. Ces fortes corrélations sont également visibles sur la **Figure 41**, où la première composante explique l'essentiel de la variabilité des données et ne permet

pas de distinguer les échantillons. Les protéomes sont globalement similaires, une faible proportion des protéines varie entre les échantillons.

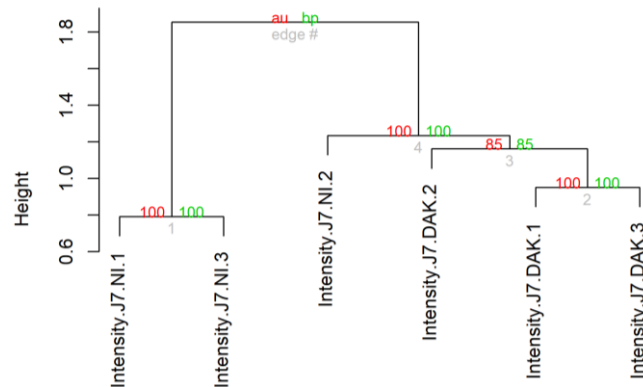


Figure 39: Dendrogramme regroupant les échantillons selon la distance euclidienne qui les sépare. Réalisé selon le critère de Ward.

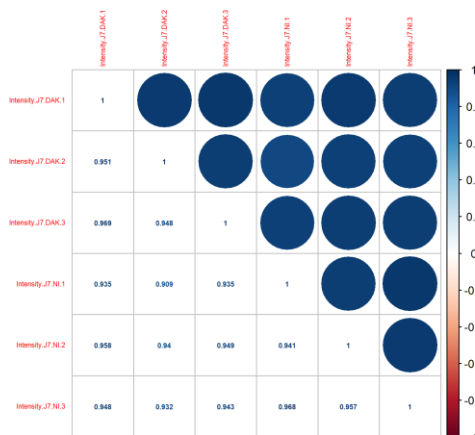


Figure 40: Matrice de corrélation décrivant le taux de ressemblance entre les échantillons. Ce taux est réparti entre 1 (identité complète) et 0 (différence complète). La partie basse de la matrice contient les taux chiffrés. La partie haute contient les taux codés par une échelle de couleur de bleu (1) à rouge (0).

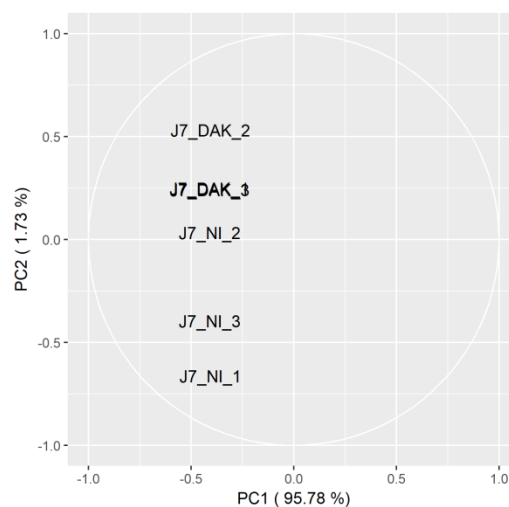


Figure 41: Analyse par composantes principales des échantillons analysés. Les deux principales composantes sont représentées, avec le pourcentage de variabilité qu'elles représentent.

Analyse différentielle de la détection des protéines. L'analyse différentielle permet de mettre en évidence les protéines qui ont une abondance différente (**Figure 42**). Si les protéines ont été détectées correctement dans tous les échantillons, leurs intensités LFQ et leur abondance sont comparables. Ce sont les protéines différentiellement exprimées. S'il manque des valeurs, les protéines sont considérées comme absentes/présentes. Nous avons identifié 98 protéines dont l'abondance est supérieure dans les échantillons NI : 35 qui ont une expression différentielle significative et 63 absentes/présentes. A l'opposé, 105 protéines ont une abondance supérieure dans les échantillons infectés par Dakar : 31 qui ont une expression différentielle significative et 74 absentes/présentes (**Figure 42.A**). La **Figure 42.B** représente toutes les protéines avec une abondance différentielle. Les protéines en bleu ont au moins une abondance modulée d'un facteur 4, avec un taux de fausse découverte (FDR) inférieur à 0.01. Le détail des protéines identifiées est donné en annexe, dans les tableaux suivants : **Tableau 12, Tableau 13, Tableau 14 et Tableau 15**.

Ces protéines représentent donc des protéines dont l'expression est régulée d'au moins un facteur 4 dans l'intestin moyen des moustiques, 7 jours après gorgement avec un repas sanguin contenant le virus YFV-Dakar. Ce sont potentiellement des facteurs pro- ou anti-viraux.

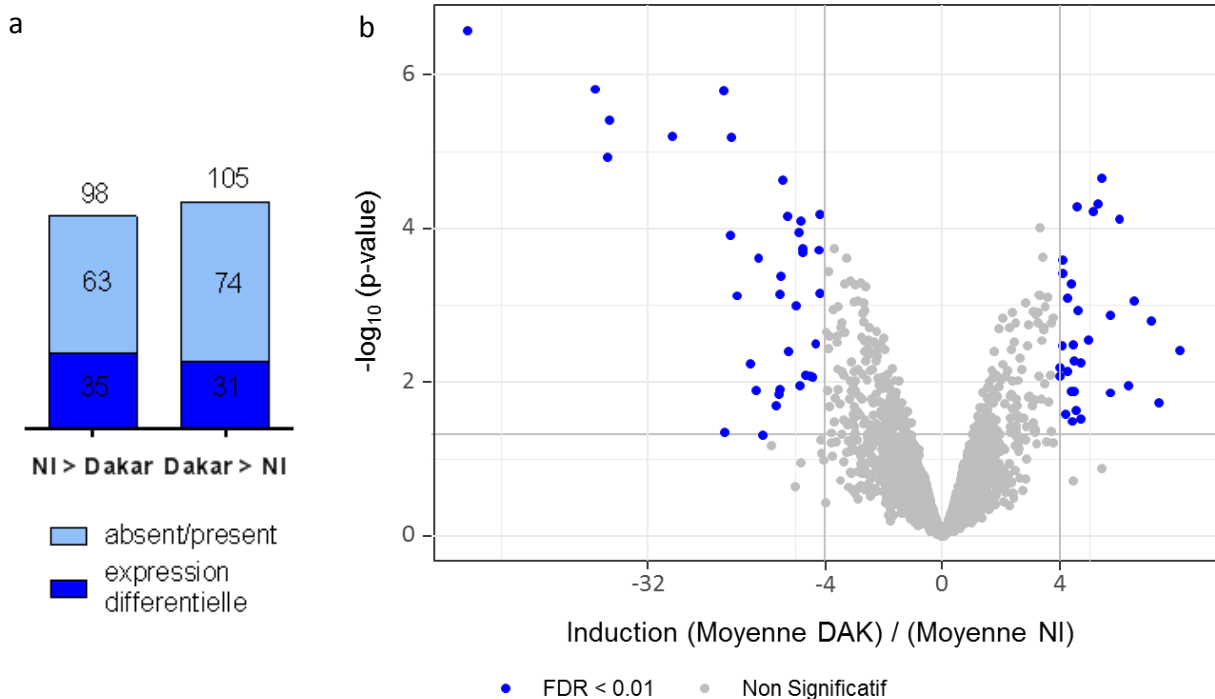


Figure 42: Analyse différentielle a) nombre de protéines régulées.

NI > Dakar : protéines détectées plus abondantes dans les échantillons NI ; Dakar > NI : protéines détectées plus abondantes dans les échantillons infectés par Dakar. b) Volcano Plot des protéines différentiellement détectées dans les échantillons J7-NI-DAK. Critères de sélection, protéines en bleu : expression régulée au moins un facteur 4, avec taux de fausse découverte inférieur à 0.01.

4.1.3 Caractérisation des listes de candidats

Afin de mieux caractériser les types de protéines qui sont régulés lors de l'infection nous avons réalisé une analyse d'ontologie de gènes. La caractérisation des protéines annotées chez *Aedes aegypti* n'est pas très avancée malgré l'amélioration du séquençage et de l'annotation du génome d'*Aedes aegypti* (Matthews et al., 2018). Nous avons donc choisi d'analyser les protéines candidates en les convertissant en leur orthologues chez *Drosophila melanogaster*, modèle pour lequel les connaissances des gènes et des protéines sont beaucoup plus avancées. Pour l'analyse, les protéines globalement up-régulées sont assemblées et les protéines globalement down-régulées sont assemblées comme présenté sur la **Figure 42.a**. Les outils du site g:Profiler sont utilisés pour déterminer les orthologues des protéines et pour analyser l'enrichissement dans une ontologie où dans une voie de signalisation. Ces outils utilisent les annotations d'ontologie génique des bases de données EMBL, et KEGG Pathway.

Les **Tableaux 8** présentent un résumé de toutes les ontologies significativement enrichies. Parmi les protéines up-régulées par l'infection à YFV-Dakar, le processus de métabolisme cellulaire est très représenté, ainsi que les protéines faisant partie du ribosome et de la mitochondrie. La régulation positive de ces types de protéines pourrait favoriser la multiplication virale. La voie de neddylation semble également enrichie et pourrait être impliquée dans la régulation du fonctionnement cellulaire lors de l'infection. Parmi les protéines down-régulées, les protéines impliquées dans la régulation de la synthèse des sphingolipides semblent enrichies, mais aussi les protéines adaptatrices des clathrines, ainsi que la fonction moléculaire de transport de protéine et la voie de signalisation liée au transport par les protéines SNARE. Ce type de protéine pourrait être impliqué dans la réplication virale, notamment les voies d'entrée. Les régulations négatives peuvent provenir d'une défense cellulaire.

Tableaux 8: Ontologies géniques enrichies parmi a) les protéines up-régulée ou b) down-régulées par l'infection YFV-Dakar.

Types de terme : BP, Processus Biologique ; CC : Composant Cellulaire ; MF : fonction Moléculaire ; kegg : voie de signalisation de la base de donnée KeggPathways. Le nombre de gènes inclus dans chaque ontologie est renseigné, ainsi que le nombre de gènes identifiés dans la liste des candidats, et le nombre de gènes commun. Toutes les ontologies indiquées sont significativement enrichies (p-value indiquée).

a) Protéines up-régulées par l'infection YFV-Dakar

type de terme	Nom du terme	ID du terme	Nb de gènes			p-value
			terme	liste candidats	commun	
BP	cellular metabolic process	GO:0044237	5208	70	48	5,18E-03
BP	protein neddylation	GO:0045116	12	70	4	6,65E-04
CC	Ribosome	GO:0005840	198	70	8	2,08E-02
CC	mitochondrial matrix	GO:0005759	179	70	8	9,95E-03
MF	NEDD8 transferase activity	GO:0019788	5	70	3	2,60E-03
kegg	Spliceosome	KEGG:03040	32	6	3	2,27E-02

b) Protéines down-régulées par l'infection YFV-Dakar

type de terme	Nom du terme	ID du terme	Nb de gènes			p-value
			terme	liste candidats	commun	
BP	positive regulation of sphingolipid biosynthetic process	GO:0090154	2	48	2	1,64E-02
CC	clathrine adaptator	GO:0030119	13	48	3	1,66E-02
MF	protein transporter activity	GO:0008565	78	48	5	1,27E-02
kegg	SNARE interactions in vesicular transport	KEGG:04130	1	3	1	4,99E-02

4.1.4 Expression des gènes codants pour les candidats protéiques

Nous avons voulu analyser l'expression des gènes qui codent pour les candidats obtenus en protéomique. Nous nous attendions à mettre en évidence une corrélation entre les niveaux d'ARNm et ceux d'expression des protéines. Nous avons sélectionné 9 protéines dont l'abondance était diminuée dans les échantillons YFV-Dakar, 12 protéines dont l'abondance était augmentée, une protéine présente dans YFV-Dakar et absente dans NI (Q170Z9), et deux protéines témoins (Ago2 et Cactus, faisant partie du système immunitaire du moustique). Pour chaque protéine, nous avons réutilisé les échantillons ayant servi à l'étude transcriptomique (voir partie 2) pour détecter de nouveau les gènes correspondant par RT-qPCR. La **Figure 43** montre à la fois les facteurs d'induction détectés en protéomique, le facteur d'induction détecté dans l'analyse transcriptomique, ainsi que le facteur d'induction déterminé à partir des RT-qPCR réalisées sur les mêmes échantillons.

L'analyse de transcriptomique ne détecte par d'expression différente entre les échantillons YFV-Dakar et NI pour ces gènes. Lorsque les mêmes échantillons sont analysés de nouveau par RT-qPCR, on ne détecte par non plus de modulation de l'expression de ces gènes. Les résultats sont identiques pour la protéine Q170Z9.

Ainsi, de manière inattendue, dans le *pool* d'échantillon dédié à la transcriptomique, on ne détecte par de modulation d'expression des gènes qui codent pour les protéines détectées de manière différentielle dans l'autre *pool* par protéomique.

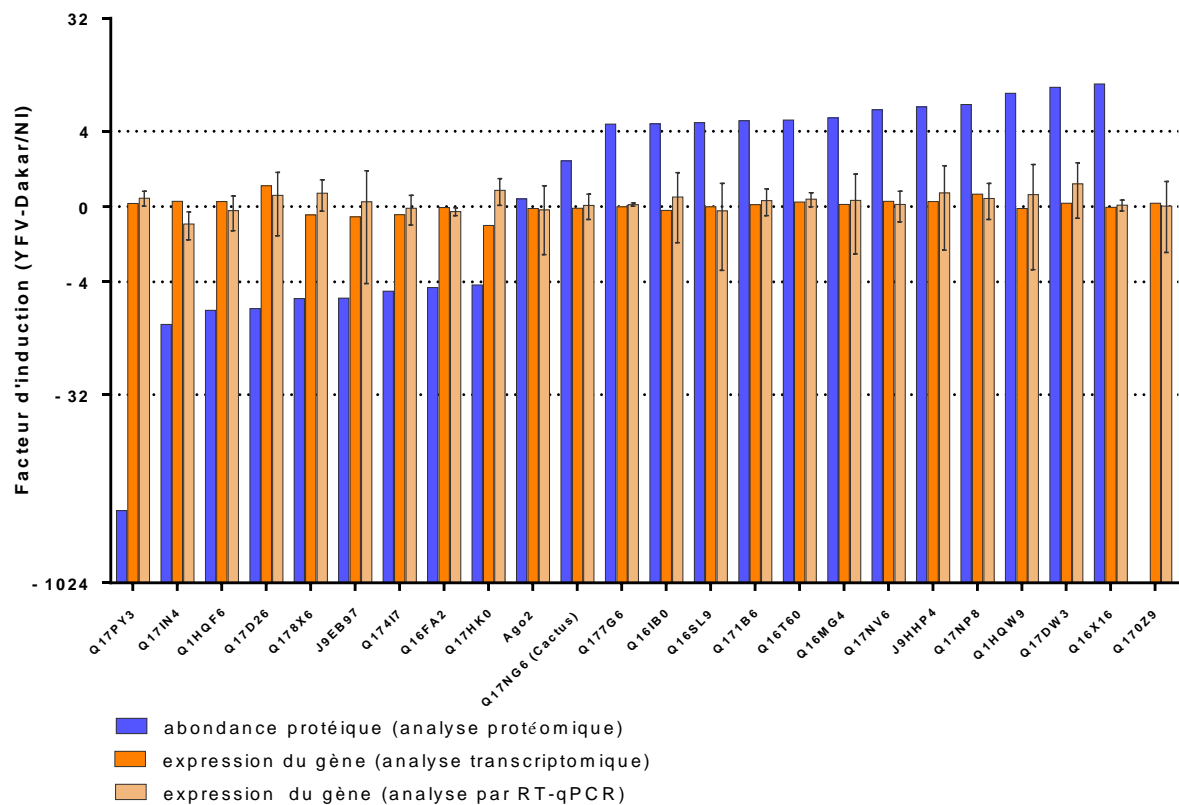


Figure 43: Expression des gènes des protéines candidates, dans les échantillons de transcriptomique.

Toutes les valeurs sont des facteurs d'induction dans les échantillons YFV-Dakar par rapport aux échantillons NI. En bleu, le facteur d'induction détectée en protéomique. En orange intense, le facteur d'induction du gène détecté dans l'analyse transcriptomique, aucun de ces gènes n'est différentiellement exprimé (p -value ajustée ~ 0.999). En orange clair, le facteur d'induction du gène détecté par RT-qPCR dans les échantillons ayant servi pour la transcriptomique. La moyenne et l'écart type sont représentés.

4.2 Validation fonctionnelle des candidats

Afin d'approfondir l'étude des candidats, nous allons analyser leur rôle sur la réplication et la production virale en diminuant leur expression génique par la technique de transfection d'ARNdb (Carissimo et al., 2015a; Raquin et al., 2017). Nous avons choisi d'effectuer ces expériences de validation fonctionnelle dans un premier temps dans des cellules d'*Aedes aegypti*. Ces expériences

sont plus accessibles qu’une validation directe *in vivo* chez le moustique, même si celle-ci sera nécessaire à terme.

4.2.1 Tests de diminution d’expression de gènes *in vivo*

En vue de nous préparer à tester nos candidats sur la réplication virale dans le moustique dans une étape ultérieure, nous avons testé l’efficacité de la technique d’injection d’ARNdb au laboratoire (**Figure 44**). Les deux ARNdb tests ciblent la calmoduline et la protéine 14-3-3 zeta, deux gènes que nous avons choisis suite à d’autres travaux menés au laboratoire. Environ 50 moustiques ont été injectés pour chaque cas. Le gorgement de ces moustiques a été efficace entre 16 % et 36 %, ce qui est comparable à ceux de moustiques non-injectés (30 %). Les analyses de RT-qPCR ont montré que la diminution d’expression du gène 14-3-3 zeta était significative (**Figure 44**). Par contre, l’expression de la calmoduline n’a pas diminué. Il est possible que l’ARNdb utilisé ne fonctionne pas (nous ne l’avons pas testé en cellule). Alternativement, la cinétique de diminution d’expression des deux gènes testés peut-être différente, et devrait être étudiée. La mise en place d’un tel processus de validation est lourde, ce qui explique pourquoi nous avons choisi de valider nos candidats dans un premier temps dans un modèle cellulaire avant de les tester dans un modèle moustique.

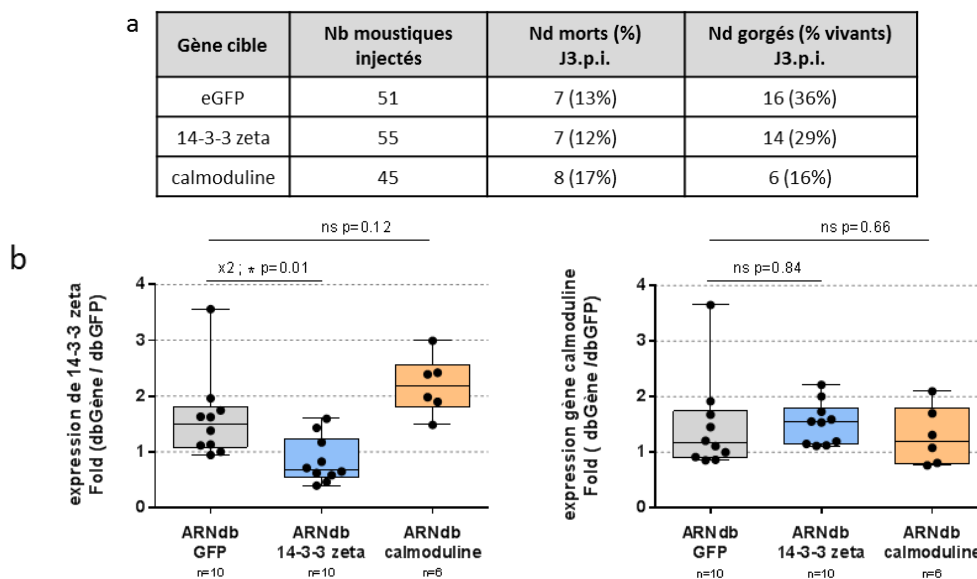


Figure 44: Essai de silencing de gènes dans les moustiques *Ae. aegypti* par injection d'ARNdb.

Les moustiques sont injectés avec 1 µg d’ARNdb dans le thorax. Les gènes ciblés codent pour la protéine 14-3-3 Zeta (identifiant UniProt Q1HR36) et le gène codant pour la calmoduline (identifiant UniProt Q1HQX3). L’ARNdb ciblant la GFP est utilisé comme témoin. Un repas sanguin leur est proposé 3 jours après injection (J3.p.i.). a) Nombre de moustiques injectés, taux de mortalité et taux de gorgement à 3 jours post-injection, pour chaque ARNdb testé. b) L’expression des gènes a été analysée par RT-qPCR dans les moustiques entiers, normalisée par rapport au gène de ménage RP49, puis par rapport à un des échantillons témoin, injecté avec l’ARNdb GFP. Les résultats représentent une seule expérience, le nombre de moustique testé est indiqué en abscisse, les moyennes et écart-types sont représentés, test statistique : t-test non apparié, * $p < 0.5$. On observe une diminution (facteur 2 entre les expressions moyennes) d’expression pour le gène codant la protéine 14-3-3 Zeta, mais pas de diminution du gène codant pour la calmoduline. Expérience réalisée une fois.

4.2.2 Méthode de validation

Les cellules Aag2, isolées d'un homogénat d'œufs d'*Aedes aegypti* (Peleg, 1968), ont été décrites comme un bon modèle pour étudier les réponses anti-microbiennes. Elles possèdent les voies connues du système immunitaire insecte : IMD, JAK-STAT, Toll ainsi que la voie d'ARN interférence (RNAi), à l'inverse de la lignée de cellules d'*Aedes albopictus* C6/36 (Barletta et al., 2012).

Aag2 permissives à YFV-Dakar. Afin de tester la permissivité de ces cellules à la souche YFV-Dakar, nous les avons infectées à différentes MOI (1, 0.1 et 0.01), puis nous avons évalué la réplication virale et le relargage de particules dans le surnageant par RT-qPCR. L'infection avec 3 MOI différentes montre 3 profils de réplication séparés d'environ $1 \log_{10}$, à 24h. Ces différences suggèrent que l'infection à ces MOI ne sature pas le système. La réplication semble atteindre un plateau à 72h avec 10^5 GE/mL détectés dans le surnageant et 10^7 GE/1 μ g d'ARN total (**Figure 46.a et b**). Nous avons également réalisé un test de marquage par cytométrie en flux des cellules infectées par les anticorps ciblant l'enveloppe 4G2 et 2D12, à plusieurs MOI (**Figure 45**). Le pourcentage de cellules infectées augmente graduellement avec la MOI. Cela confirme que l'infection n'est pas saturante. L'efficacité de marquage est légèrement différente entre les deux anticorps. Nous avons choisi d'infecter nos cellules à MOI 0.1 par la suite (**Figure 46.c et d**).

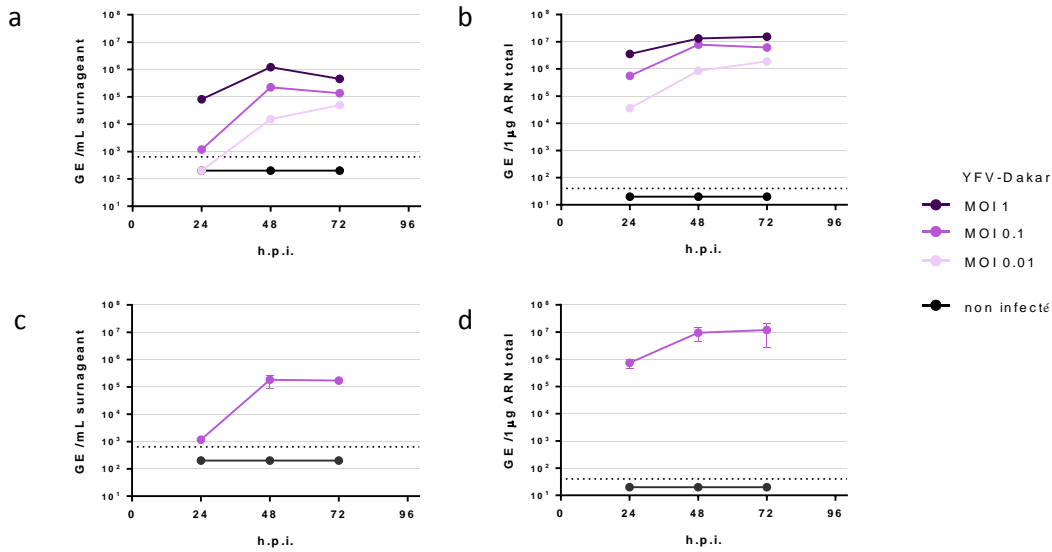


Figure 46: Réplication de YFV-Dakar sur les cellules Aag2.

Infection à différentes MOI et détection du virus par RT-qPCR dans le surnageant de culture ou dans les extraits cellulaires. Les résultats sont exprimés en génomes équivalent pour 1 µg d'ARN cellulaire total ou pour 1 mL de surnageant, à différentes heures post-infection (h.p.i.). a) et b) cinétique avec trois MOI différentes, expérience réalisée une fois. c) et d) cinétique avec infection MOI 0.1, expérience réalisée 3 fois de manière indépendante, résultats représentés avec écarts types.

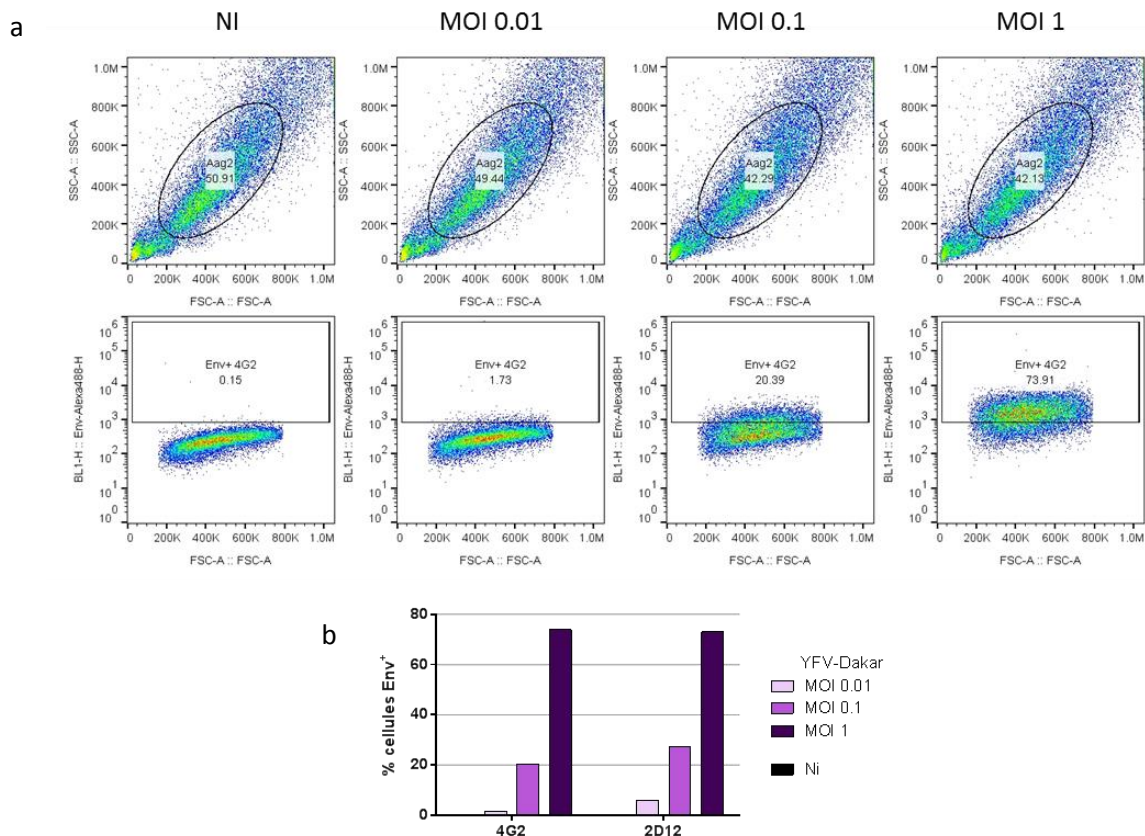


Figure 45: Efficacité d'infection des Aag2 par YFV-Dakar.

Infection à différentes MOI avec YFV-Dakar et détection des cellules infectées par cytométrie en flux 24 h post-infection. a) les cellules sont marquées avec l'anticorps anti-enveloppe pan-Flavivirus 4G2. b) Les cellules ont aussi été marquées avec un autre anticorps anti-enveloppe 2D12. L'expérience a été réalisée une fois.

Extinction d'expression de gènes par traitement ARNdb. Afin de valider l'effet de nos protéines candidates dans les cellules Aag2 sur la réplication virale, deux solutions sont possibles: la surexpression ou l'inhibition de l'expression des protéines. Dans les deux cas, l'effet de ces modifications sur la réplication du virus nous indiquera si cette protéine est importante dans la réplication. Ces deux méthodes sont complémentaires, et nous avons prévu de les réaliser toutes les deux. Dans un premier temps, nous avons choisi la méthode d'inactivation de l'expression des gènes (appelé *silencing* par la suite) qui codent ces protéines. Le *silencing* de gènes dans les cellules d'insecte est la plupart du temps réalisée en transfectant des ARN double brin (ARNdb) (Dietrich et al., 2017; Koh et al., 2018; McFarlane et al., 2014; Schnettler et al., 2013), même s'il existe des études utilisant directement des petits ARN interférent (ARNsi, ou siRNA pour small interfering RNA) (Londono-Renteria et al., 2015). La seule différence entre le *silencing* avec des ARNsi ou des ARNdb est la présence en amont du clivage de l'ARNdb par la ribonucléase de type III Dicer, qui les clive en ARNsi de 21 ntp, possédant des extrémités libres sur 2 ntp. L'avantage d'utiliser des ARNdb est qu'une molécule d'ARNdb donnera plusieurs ARNsi après clivage par Dicer (21 ARNsi si on ne considère aucun recouvrement pour un ARNdb de 450 pb), multipliant les cibles sur l'ARNm. L'inconvénient est le risque augmenté de cibles non-désirées (appelées par la suite off-target).

L'analyse de l'effet du *silencing* des gènes sur le cycle viral sera effectuée avec deux méthodes : une technique de RT-qPCR, permettant de mesurer l'efficacité de réplication du virus et une technique de titration par plaque de lyse, permettant de mesurer l'efficacité de relargage de virions infectieux dans le milieu extérieur.

4.2.3 Sélection des candidats

Nous avons choisi une technique de *silencing* couplée à l'infection par le virus YFV-Dakar sur les cellules Aag2. Afin d'augmenter la probabilité d'observer un effet du *silencing*, nous avons choisi les protéines dont l'abondance était augmentée en condition d'infection. Nous avons sélectionné en priorité des protéines dont la fonction nous paraissait intéressante : lien avec la neddylation, identifiée comme ontologie enrichie dans les protéines up-régulées, lien avec le transport cellulaire, protéines de liaison à l'ARN. Leurs fonctions sont détaillées en fin d'Axe 2 dans les tableaux suivants : **Tableau 12** et **Tableau 13**. Ces 15 protéines sont représentées en rouge sur la **Figure 47**, avec leur identifiant UniProt. Nous avons également testé la protéine Q170Z9, détectée présente dans les échantillons YFV-Dakar et absente dans les échantillons NI. Nous l'avons choisi parce qu'elle fait aussi partie de la voie de régulation de neddylation, comme les deux autres protéines candidates Q16X16 et Q16MG4. La fonction des protéines est détaillée dans le **Tableau 9**.

Nous avons en tout choisi 16 protéines candidates pour valider leur rôle sur la réplication virale dans les cellules Aag2.

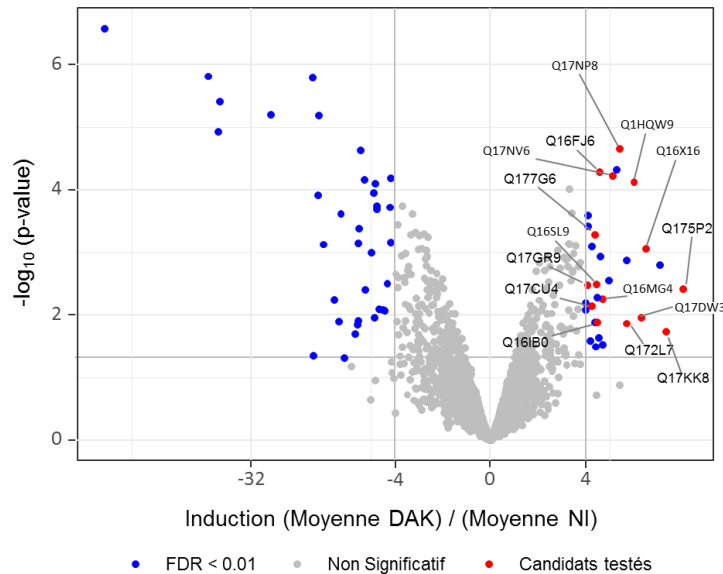


Figure 47: VolcanoPlot représentant les protéines différentiellement exprimées entre les conditions NI et YFV-Dakar.

En rouge, les protéines candidates sélectionnées pour la validation fonctionnelle sur cellules Aag-2. En bleu, les autres protéines dont l'abondance est modulée de façon significative (FDR < 1 %). L'identifiant UniProt est affecté à chaque protéine candidate.

Tableau 9: Détail des protéines sélectionnées comme candidates.

UniProt accession	nom protéine	nom gène	log2 (DAK/NI)	Description fonction du gène (NCBI)
Q175P2	Q175P2_AEDAE	AAEL006591	4,03	rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit
Q17KK8	Q17KK8_AEDAE	AAEL001657	3,67	probable ATP-dependent RNA helicase DDX23
Q16X16	Q16X16_AEDAE	AAEL009026	3,26	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12
Q17DW3	Q17DW3_AEDAE	AAEL004027	3,17	glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
Q1HQQ9	Q1HQQ9_AEDAE	AAEL010340	3,01	serine/arginine-rich splicing factor 2
Q172L7	Q172L7_AEDAE	AAEL007335	2,86	uncharacterized oxidoreductase dhs-27
Q17NP8	Q17NP8_AEDAE	AAEL000624	2,71	uncharacterized LOC5564842
Q17NV6	Q17NV6_AEDAE	AAEL000579	2,57	probable trafficking protein particle complex subunit 13 homolog
Q16MG4	Q16MG4_AEDAE	AAEL012306	2,36	nedd8-activating enzyme E1 catalytic subunit
Q16FJ6	Q16FJ6_AEDAE	AAEL014733	2,29	nuclear pore complex protein Nup214
Q16SL9	Q16SL9_AEDAE	AAEL010559	2,23	vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog
Q16IB0	Q16IB0_AEDAE	AAEL013736	2,19	intron-binding protein aquarius
Q177G6	Q177G6_AEDAE	AAEL006133	2,19	tubulin-specific chaperone A
Q17CU4	Q17CU4_AEDAE	AAEL004440	2,12	tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein
Q17GR9	CIAO1_AEDAE	Ciao1	2,04	probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein Ciao1
Q170Z9	Q170Z9_AEDAE	5579977	présente	NEDD8-activating enz. E1 regulatory subunit

4.2.4 Production des ARNdb

Les ARNdb sont produits en trois étapes. Premièrement, la séquence ciblée est amplifiée par une PCR grâce à des amorces contenant des moustaches T7 à leur extrémité 5'. Le matériel utilisé est un mélange d'ADNc (500 ng) de cellules Aag2 infectées par YFV-Dakar (MOI 0.1, 48 h) ou non infectées. Les produits de PCR sont purifiés sur gel. Ensuite, une seconde PCR est effectuée pour amplifier la matrice. Les produits de PCR sont purifiés par extraction au Phénol:Chloroforme. La troisième étape est la synthèse des ARNdb avec le kit MEGAScript® T7. La polymérase utilise les deux moustaches T7 aux extrémités de la matrice pour synthétiser un brin d'ARN dans les deux sens. La synthèse fonctionne de manière optimale avec 1 µg de matrice ADN. Les produits sont purifiés avant d'être utilisés.

La **Figure 48** présentent la vérification des ARNdb des 16 candidats (les groupe 1 et groupe 2 ont été constitués uniquement pour des raisons pratiques). L'amplification de l'ARNdb Q16X16 (**Figure 48.a**) et celle de l'ARNdb GFP (**Figure 48.b**) n'ont pas fonctionné, elles ont été renouvelées par la suite. L'amplification de l'ARNdb Q1HQW9 donne une double bande malgré la présence d'une seule bande dans les produits de PCR. La migration des ARNdb du groupe 1 présente souvent une trainée, probablement due à la dégradation des ARN pendant la migration. La synthèse du groupe 2 était mieux optimisée et a mieux fonctionné. Les ARNdb sont quantifiés et leur qualité vérifiée par mesure au spectrophotomètre NanoDrop 2000c.

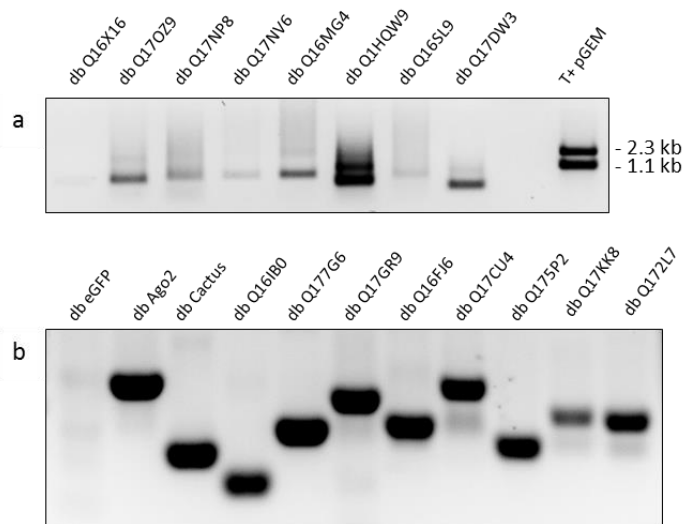


Figure 48: Vérification de la production des ARNdb.

Les candidats sont identifiés par leur identifiant UniProt. Migration sur gel des ARNdb. a) premier groupe de candidats, le témoin de synthèse d'ARNdb pGEM présente deux bandes à 2.3 kb et 1.1 kb b) second groupe de candidats, ainsi que les témoins ARNdb GFP, Ago2 et Cactus. L'électrophorèse a duré plus longtemps que pour le groupe 1, et la synthèse a mieux fonctionné.

4.2.5 Validation fonctionnelle des candidats

Les cellules Aag2 sontensemencées à raison de $4 \cdot 10^5$ cellules/puits dans des plaques 24 puits. Le lendemain, elles sont transfectées avec 500 ng d'ARN db et 1 μ L de lipofectamine LTX. Le jour suivant, elles sont infectées à MOI 0.1 avec YFV-Dakar pendant 2 h. Les surnageants et les cellules sont récoltés à 24 et 48 h post-infection pour analyser l'effet du *silencing* sur le cycle viral.

Les témoins utilisés. Un ARNdb ciblant la GFP est utilisé comme témoin négatif de transfection. Nous avons choisi de tester 4 témoins positifs de régulation du cycle viral :

1) Un ARNdb ciblant Ago2 a été précédemment décrit comme augmentant la réplication du virus de la dengue dans les moustiques *Aedes aegypti* (Raquin et al., 2017) et dans les cellules Aag2 pour d'autres arbovirus (Dietrich et al., 2017) (McFarlane et al., 2014) (Schnettler et al., 2013b). La protéine Ago2 fait partie du complexe RISC du système d'ARN interférence. Elle clive le brin *passenger* de l'ARNsi. Si elle est moins exprimée, le système d'ARN interférence fonctionne moins bien, ce qui permet au virus de se répliquer d'avantage.

2) Un ARNdb ciblant la protéine Cactus a été utilisé précédemment comme témoin de régulation négative de la réplication du virus de la dengue dans les moustiques (Raquin et al., 2017). La protéine Cactus est l'orthologue chez le moustique de la protéine I κ B- α . Elle retient Rel I (orthologue de NF- κ B) qui peut être transloqué dans le noyau et jouer son rôle de facteur de transcription lorsque Cactus est dégradé. La voie Toll comprend ce système NF- κ B et son rôle dans la réponse antivirale a été bien décrit lors de l'infection du virus de la dengue (Raquin et al., 2017). Inhiber l'expression de la protéine Cactus revient donc à activer de façon constitutive la voie Toll et à augmenter la réponse immunitaire. La conséquence est une diminution de la réplication virale.

3) Un ARNdb ciblant une sous-unité de la pompe à protons ATPase vésiculaire (vATPV1B). Cette pompe à proton permet d'acidification nécessaire à la fusion de l'enveloppe des flavivirus à l'endosome. Elle a été utilisée dans plusieurs études comme contrôle positif de diminution de l'infection dans des cellules mammifères et dans des moustiques infectés par les virus DENV-2 et ZIKV (Angleró-Rodríguez et al., 2017; Kang et al., 2014; Savidis et al., 2016).

4) Un ARNdb contre la protéine du venin riche en cystéine 379 (CRVP379, *cystein rich venom protein*) qui a été décrite comme nécessaire pour la réplication de la DENV dans son vecteur moustique (Londono-Renteria et al., 2015).

L'analyse fonctionnelle du premier groupe de candidats est montrée par la **Figure 49**. L'effet des ARNdb est évalué en mesurant l'expression du gène correspondant en RT-qPCR, normalisé par rapport à l'expression du gène dans les échantillons traités avec l'ARNdb ciblant GFP, à 24 et 48 h post-transfection. Le *silencing* éteint l'expression de tous les gènes testés au moins à 50 %, excepté pour 2 ARNdb : le témoin de régulation négative ciblant la protéine Cactus et celui ciblant le mRNA codant la protéine candidate Q17DW3 (**Figure 49.a**). Nous avons synthétisé un deuxième ARNdb ciblant le gène codant pour la protéine Cactus. Ce deuxième essai n'a pas abouti à un meilleur *silencing*. Ce constat est étonnant puisque le premier ARNdb Cactus a été validé dans une étude précédente (Raquin et al., 2017). Cependant, cette validation a été réalisée *in vivo* et non dans le modèle cellulaire Aag2. De manière intéressante, un collègue nous a récemment indiqué que son laboratoire n'avait pas non-plus réussi à éteindre l'expression du gène Cactus dans les cellules Aag2 et que le traitement par ARNdb provoquait à l'inverse une augmentation de son expression (K. Maringer, communication personnelle). L'effet des ARNdb ciblant l'expression de Cactus et de Q17DW3 ne sera donc pas pris en compte dans l'étude.

Toutes les protéines sélectionnées ont une abondance supérieure dans les conditions YFV-Dakar que NI (**Figure 47**). Nous avons testé l'induction de ces gènes suite à l'infection dans les cellules Aag2 afin de voir si l'expression des gènes candidats était régulée de la même façon que dans les intestins moyens de moustiques. La **Figure 49.b** montre une tendance à l'augmentation d'expression du gène Ago2 lors de l'infection. En revanche, aucun des gènes candidats n'est régulé positivement lors de l'infection, à 24 h ou 48 h. Les gènes codant les protéines Q17DW3, Q1HQW9 et Q17NP8 montrent des profils de régulation assez hétérogènes.

L'extinction du gène Ago2 ne semble pas affecter la réplication ni le relargage de virus infectieux dans le milieu. Ce contrôle de régulation positive de la réplication virale ne semble pas fonctionner sur notre modèle. Une diminution significative de la réplication virale est observée dans les cellules transfectées avec l'ARNdb Q16SL9 à 24 h et 48 h post-infection. A 24 h, on détecte en moyenne $1,35 \cdot 10^6$ GE/1 μ g d'ARN total dans la condition contrôle contre $4,0 \cdot 10^5$ GE/1 μ g d'ARN total dans la condition traitée avec l'ARNdb Q16SL9 (facteur 3,3). A 48 h, on observe des valeurs de réplication 10 fois plus hautes, avec une diminution d'un facteur 4 entre la condition contrôle et la condition traitée avec l'ARNdb Q16SL9. L'effet sur le relargage viral n'est pas visible à 24 h. A 48 h post-infection, en moyenne $4 \cdot 10^5$ PFU/mL sont relargués dans le surnageant des cellules traitées avec l'ARNdb contrôle ciblant la GFP contre 4 fois moins ($1,0 \cdot 10^5$ PFU/mL pour la condition ARNdb Q16SL9). Il est surprenant de ne pas voir d'effet de l'ARNdb Q16SL9 sur le relargage de virions infectieux dès 24 h alors que la réplication semble déjà affectée. Les autres ARNdb n'ont pas d'effet sur la réplication du virus (**Figure 49.c et .d**)

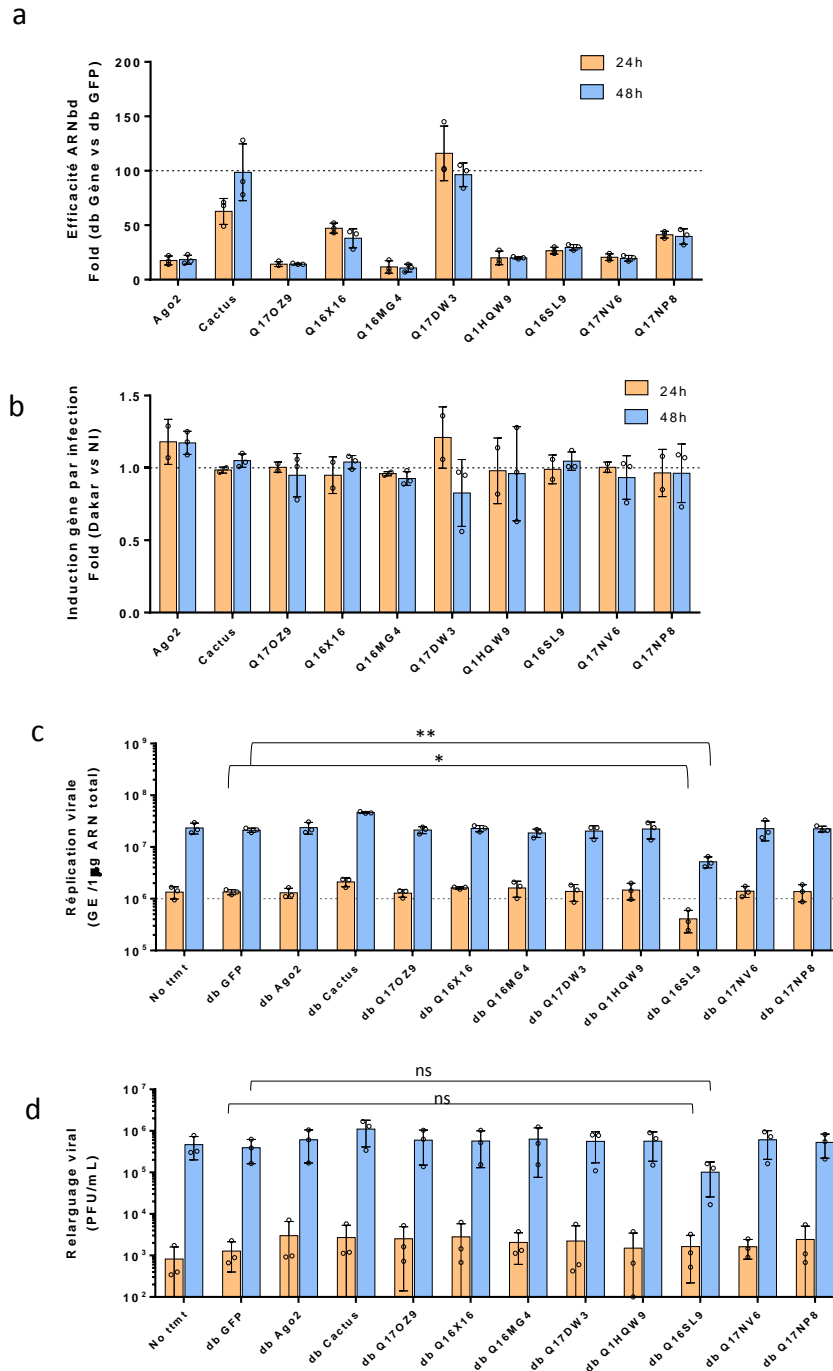


Figure 49: Validation fonctionnelle du groupe 1 de candidats.

Les cellules Aag2 sont traitées avec 500 ng d'ARNdb, infectées par YFV-Dakar MOI 0.1 et récoltées à 24 h et 48 h post-infection. Les gènes ciblés sont identifiés par l'identifiant UniProt de la protéine qu'ils codent. a) Efficacité du *silencing* avec les ARN db. Pour chaque traitement avec un ARNdb, l'expression du gène est exprimée en *fold* par rapport à la condition ARNdb GFP. b) Induction du gène par YFV-Dakar. Mesure de l'expression des différents gènes dans une condition infectée par rapport à une condition non infectée. c) Effet du traitement avec les ARNdb sur la réplication virale. La réplication virale est mesurée par RT-qPCR et exprimée en GE /1µg d'ARN total cellulaire. d) Effet du traitement avec les ARNdb sur le relargage de particules infectieuses. Les titrages sont effectués par plage de lyse sur cellules Vero et exprimés en PFU/mL. Résultats issus de 3 expériences biologiquement indépendantes, avec écarts types. Test statistique effectué: Paired t-test two tailed, * p < 0.05 ; ** p < 0.01.

L'analyse fonctionnelle du second groupe de candidats est montrée par la Figure 50. Nous avons également testé d'autres témoins positifs de régulation de la réplication virale : le gène codant pour les protéines CRVP et vATPV1B. Nous n'avons pas pu produire les ARNdb ciblant les gènes codant pour Q17KK8 et Q17IR9 de manière satisfaisante. La création de nouvelles amorces-T7 n'a pas pu régler le problème, nous n'avons donc pas pu analyser l'effet de ces gènes candidats sur la réplication virale.

L'effet du traitement avec les ARNdb provoque une diminution d'expression des gènes ciblés d'au moins 50 % pour tous les candidats et gènes contrôles, voire plus de 75 % d'efficacité pour une grande partie à 24 et 48 h post-transfection, excepté pour le gène codant la protéine Q175P2 (**Figure 50.a**).

Tester l'induction des gènes par l'infection avec YFV-Dakar permet d'observer une légère augmentation d'expression à 24 h post-infection pour les gènes codant les protéines Q177G6, Q16IBO, Q16FJ6, Q17CU4, Q175P2, Q172L7 (**Figure 50.b**). Ceci est en accord avec les observations faites sur les protéines correspondantes dans l'analyse protéomique (**Figure 47**), sans toutefois être statistiquement significatif.

Le *silencing* du gène codant pour une sous-unité de la vATPase induit une mortalité cellulaire élevée dès 24 h post-transfection, nous n'avons donc pas poursuivi l'étude de ce contrôle positif. Le *silencing* du gène codant pour la protéine CRVP induit bien quant à lui une diminution de la réplication et une diminution du relargage de particules infectieuses, visible à 48 h post-infection.

La diminution de l'expression des 7 autres candidats ne provoque pas de modulation significative de la réplication ou relargage de particules infectieuses dans les cellules Aag2. De manière similaire aux tests du groupe 1 de candidats, en moyenne 10^6 GE/1 μ g d'ARN total à 24 h et 10^7 GE/1 μ g d'ARN total à 48 h sont détectés pour toutes les conditions, et environ 10^3 PFU/mL de particules virale sont relarguées à 24 h contre environ 10^5 PFU/mL à 48 h.

Ces expériences suggèrent que la réduction significative d'expression des 15 candidats testés n'affecte pas la réplication de YFV-Dakar dans les cellules Aag2, à l'exception du gène Q16SL9. Nous avons décidé d'approfondir l'étude de ce candidat.

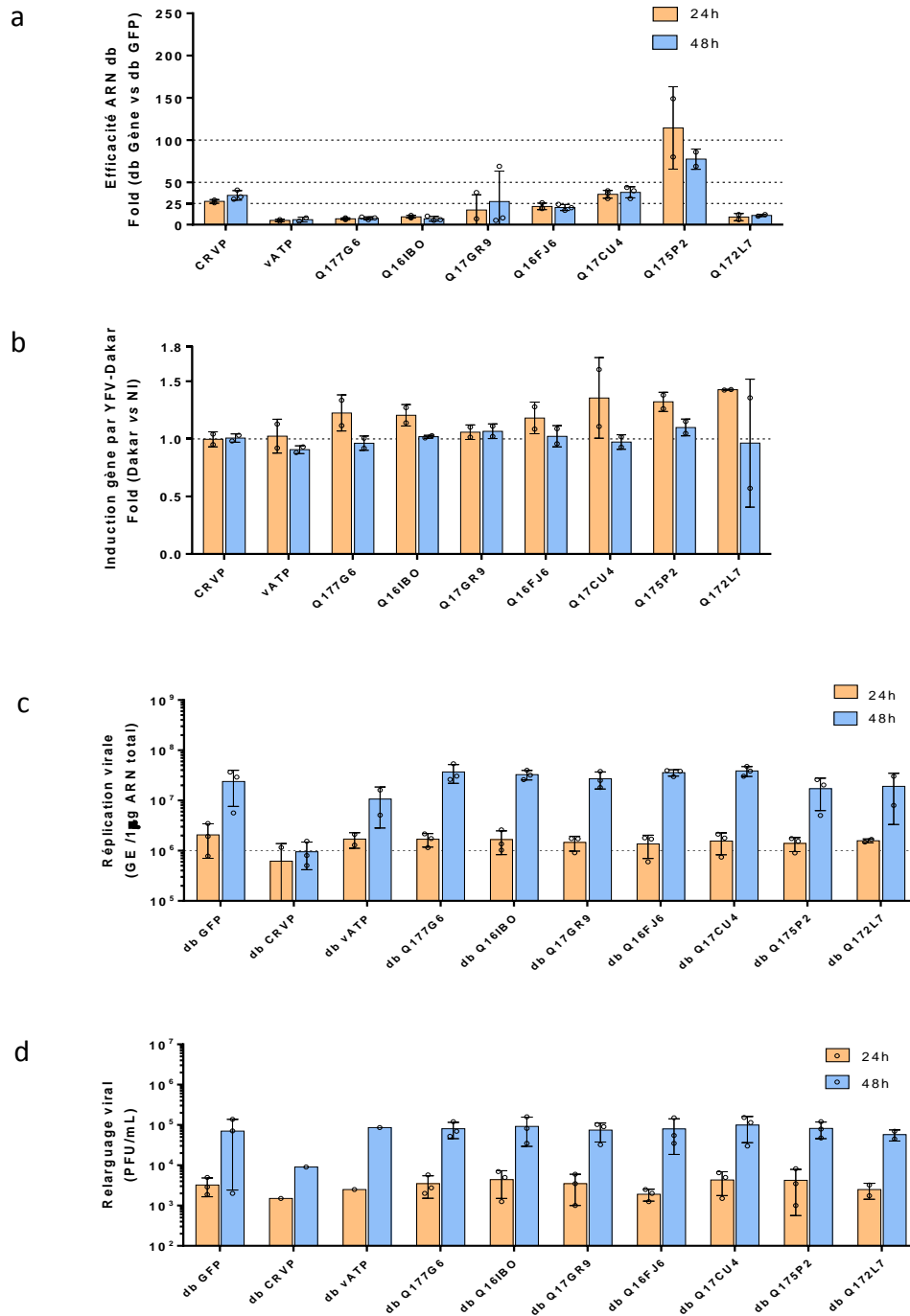


Figure 50: Validation fonctionnelle du groupe 2 de candidats.

Les cellules Aag2 sont traitées avec 500 ng d'ARNdb, infectées par YFV-Dakar MOI 0.1 et récoltées à 24 h et 48 h post-infection. Les gènes ciblés sont identifiés par l'identifiant UniProt de la protéine qu'ils codent. a) Efficacité du *silencing* avec les ARN db. Pour chaque traitement avec un ARNdb, l'expression du gène est exprimée en fold par rapport à la condition ARNdb GFP. b) Induction du gène par YFV-Dakar. Mesure de l'expression des différents gènes dans une condition infectée par rapport à une condition non infectée. c) Effet du traitement avec les ARNdb sur la réplication virale. La réplication virale est mesurée par RT-qPCR et exprimée en GE / 1µg d'ARN total cellulaire. d) Effet du traitement avec les ARNdb sur le relarguage de particules infectieuses. Les titrages sont effectués par plaque de lyse sur cellules Vero et exprimés en PFU /mL. Résultats issus de 3 expériences biologiquement indépendantes, avec écarts types.

4.3 Protéine VPS16 et cycle viral de YFV-Dakar

4.3.1 Fonction cellulaire de la protéine VPS16

La protéine correspondante à l'identifiant UniProt Q16SL9 est une protéine orthologue à VPS16 (*Vacuolar Protein Sorting 16*). La protéine VPS16 a été découverte chez la levure *S. cerevisiae*. Elle fait partie de deux complexes protéiques différents qui contrôlent la fusion des vésicules intracellulaires des cellules métazoaires (eucaryotes multicellulaires, par opposition aux levures unicellulaires protozoaires): le complexe CORVET (*class C core vacuole/endosome tethering*) et le complexe HOPS (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*) (**Figure 51**). Ces deux complexes possèdent 6 sous-unités. VPS16 est l'une des 4 protéines communes aux deux complexes (Hunter et al., 2017). Une fois assemblés, ces complexes permettent la reconnaissance de marqueurs endosomaux spécifiques, tels que Rab5 et Rab7, et favorisent la fusion membranaire médiée par les protéines SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*). La reconnaissance de Rab5 permet au complexe CORVET de prendre en charge la fusion homotypique des endosomes précoces. Le complexe HOPS reconnaît quant à lui préférentiellement les protéines Rab7 et favorise la fusion des lysosomes (ou vacuole chez la levure) avec les endosomes tardifs et les autophagosomes (Balderhaar and Ungermann, 2013).

Nos données suggèrent que la protéine similaire à VPS16 chez le moustique *Aedes aegypti* joue un rôle pro-viral dans le cycle du virus YFV-Dakar (**Figure 49c et d, Figure 52b**). Son rôle dans la fusion vésiculaire au sein du complexe CORVET et/ou HOPS pourrait lui donner une importance au début du cycle viral, après l'endocytose du virus.

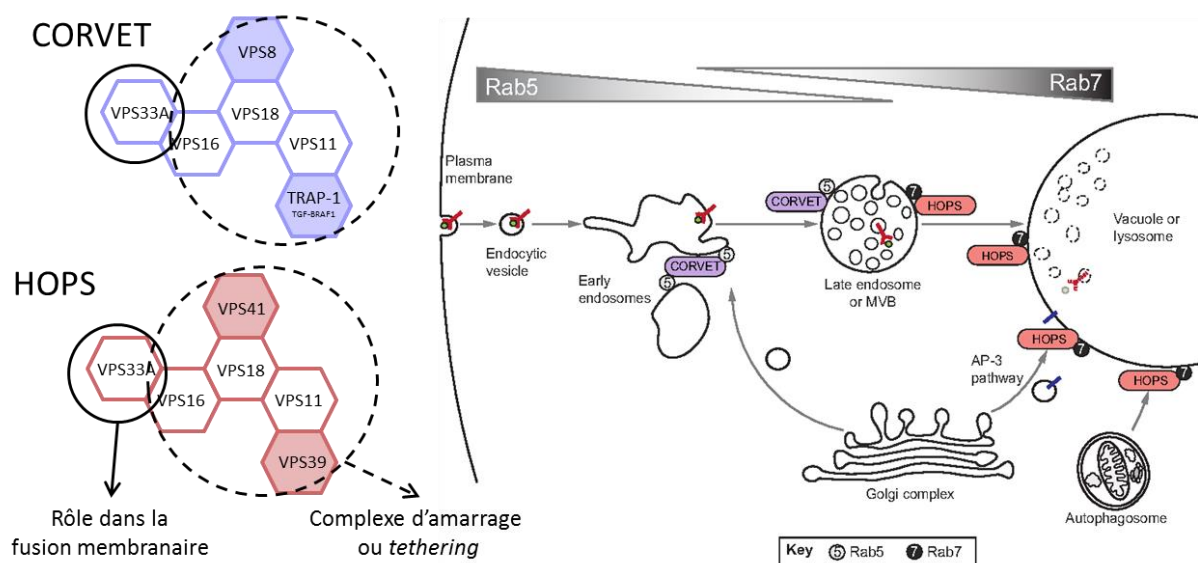


Figure 51: Fonction de la protéine VPS16 dans le transport vésiculaire.

Sources : (Hunter et al., 2017) et (Balderhaar et Ungermann, 2013)

4.3.2 VPS16 et les cycles viraux

La maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs est une étape cruciale dans le cycle des flavivirus. La fusion des endosomes précoces avec des vésicules pré-lysosomales venant de l'appareil de Golgi permet l'accumulation de protéines vATPase qui acidifient la vésicule. La fusion membranaire à lieu en majorité dans les endosomes tardifs. En effet, le passage d'un pH 7.4 extracellulaire à 5.5 (Nour and Modis, 2014) provoque un réarrangement des glycoprotéines d'enveloppe d'un état dimérique à trimérique avec exposition de la boucle de fusion. L'insertion de la boucle de fusion dans la membrane de l'endosome permet la fusion des membranes virales et endosomales et libération de la nucléocapside (Smit et al., 2011).

De manière intéressante, le complexe HOPS est requis pour la réplication du virus Ebola (EBOV). L'infection d'une lignée cellulaire mutée dans chaque composant du complexe HOPS diminue l'infection par des virus pseudotypés avec l'enveloppe d'EBOV (Carette et al., 2011). En revanche, ces mutations n'affectent pas l'infection par d'autres virus fusionnant à la membrane des endosomes tardifs comme le virus Influenza A, le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) ou le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) (Carette et al., 2011). Le complexe HOPS, plus spécifiquement l'adressage aux lysosomes est nécessaire pour les *Coronavirus* (Burkard et al., 2014).

4.3.3 Effet-dose du *silencing* de VPS16

Nous avons mesuré l'effet de la transfection des cellules Aag2 avec une quantité d'ARNdb Q16SL9 variant entre 1 µg et 50 ng par puits. La **Figure 52** montre l'effet de ce traitement gradué sur le *silencing* du gène codant pour Q16SL9 et sur la réplication de YFV-Dakar, à 48 h post-infection. Le *silencing* est efficace à environ 75 % de manière équivalente entre les transfections de 1 µg, 500 ou 300 ng mais n'atteint plus que 50 % d'efficacité avec 50 ng (**Figure 52.a**). Un effet-dose est observé sur la réplication virale (**Figure 52.b**).

Ces résultats nous confortent dans l'idée que le gène codant pour la protéine Q16SL9 joue un rôle sur la réplication de YFV-Dakar.

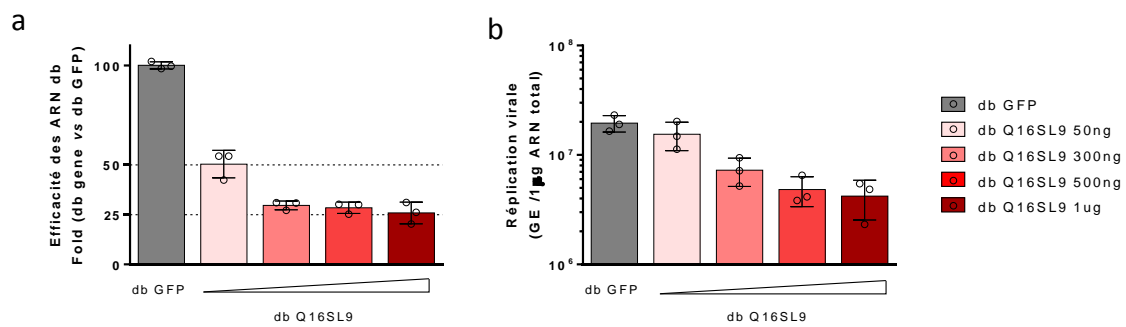


Figure 52: Effet-dose du traitement avec l'ARNdb ciblant Q16SL9 sur la réplication virale.

Les cellules Aag2 sont transfectées avec différentes quantités de l'ARNdb Q16SL9 et infectée à MOI 0.1 avec la souche YFV-Dakar. Les mesures sont faites 48 h post-infection. a) Expression du gène codant pour Q16SL9 mesurée par RT-qPCR, exprimée en % par rapport au contrôle ARNdb GFP. b) Réplication virale de YFV-Dakar, mesurée par RT-qPCR et exprimée en GE/1 µg d'ARN total. Résultats issus de trois expériences biologiquement indépendantes, avec écarts types.

4.3.4 Infirmer le rôle de VPS16 et des complexes CORVET ou HOPS dans la réplication de YFV-Dakar

Afin de valider l'effet de l'expression de Q16SL9 sur la réplication de YFV-Dakar dans les cellules Aag2, nous avons testé deux autres ARNdb, nommés respectivement db Q16SL9_v2 et _v3, ciblant différentes zones du gène (AAEL010559) (**Figure 53**). Afin de s'assurer que les conditions de synthèse des ARNdb n'influent pas sur les résultats (présence d'impuretés, reste de produit de purification), nous avons réalisé plusieurs synthèses indépendantes (s1-s4).



Figure 53: Localisation des ARNdb ciblant le gène codant pour Q16SL9/VPS16, par rapport à l'ARNm (en rouge) et la protéine (en noir). Les ARNdb sont représentés en rouge et bleu clair, avec leurs tailles respectives. En bleu foncé, la localisation de la paire d'amorces qui permet la détection des ARNm du gène par qPCR. Source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

De plus, afin de savoir si l'un des deux complexes associés à la protéine VPS16 est impliqué dans la réplication virale, nous avons synthétisé des ARNdb ciblant des orthologues de protéines spécifiques des deux complexes : l'un cible l'orthologue de VPS8, sous-unité spécifique du complexe CORVET, et l'autre cible l'orthologue de la protéine VPS39, sous-unité spécifique du complexe HOPS (**Figure 51**).

La **Figure 54** montre l'effet de la transfection des différents ARNdb ciblant le gène codant la protéine VPS16. L'extinction du gène CRVP est utilisée en contrôle positif. La transfection provoque le *silencing* du gène à au moins 75 % dans toutes les conditions (**Figure 54.a**). Les ARNdb Q16SL9_v1 provoquent tous les deux une réduction de la réplication du virus par rapport au témoin ARNdb GFP, confirmant nos résultats précédent (**Figure 49** et **Figure 52**). L'ARNdb de la synthèse s4 provoque une diminution de la réplication d'un facteur 14, ce qui est plus important que celui de la synthèse s1 (utilisé pour les expériences montrées en **Figure 49** et **Figure 52**) qui montre une diminution d'un facteur 3.9. Les autres ARNdb _v2 et _v3, des synthèses _s3 et s4 ne provoquent pas de diminution de la réplication (**Figure 54.b**), malgré une bonne efficacité de *silencing* (**Figure 54.a**).

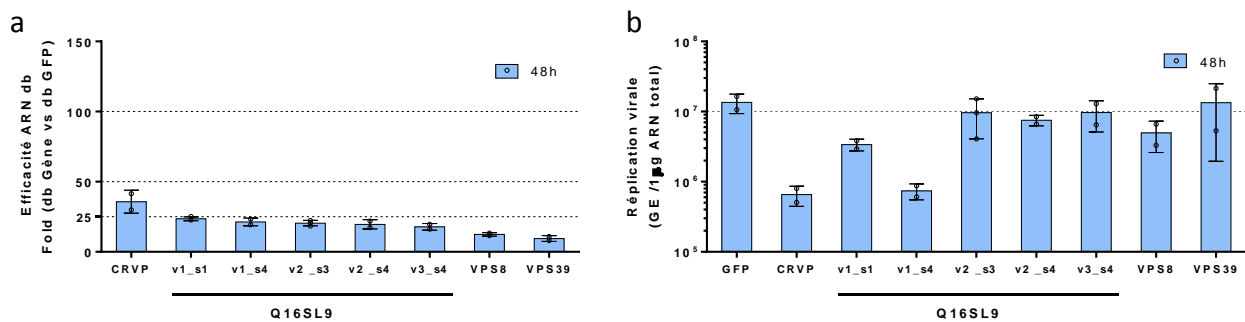


Figure 54: Effet de la transfection de différents ARNdb ciblant le gène codant pour Q16SL9: _v1, _v2 et _v3.

Plusieurs synthèses indépendantes ont été réalisées, notées s1-s4. L'effet de la transfection d'ARNdb ciblant les protéines VPS8 (complexe CORVET) et VPS39 (complexe HOPS) est aussi indiqué. Les cellules Aag2 sont transfectées avec 500 ng de ces différents ARNdb, infectées à MOI 0.1 par YFV-Dakar et récoltées à 48 h. a) Expression du gène codant pour la protéine VPS16 mesurée par RT-qPCR, exprimée en % par rapport au contrôle ARNdb GFP. b) Réplication virale de YFV-Dakar, mesurée par RT-qPCR et exprimée en GE/1 µg d'ARN total. Résultats issus de trois expériences biologiquement indépendantes, avec écarts types.

Il semblerait que la réduction de la réplication virale ne soit pas due à l'extinction du gène, mais plutôt à la transfection d'un ARNdb particulier dans les cellules. Ces expériences invalident le rôle du candidat protéique Q16SL9 dans la réplication virale dans les cellules Aag2. L'action de la transfection de l'ARNdb Q16SL9_v1 sur la réplication virale est discutée plus bas.

La **Figure 54** montre aussi l'effet de la transfection des ARNdb ciblant les orthologues de VPS8 et de VPS39. Le *silencing* des deux gènes est efficace à plus de 87 % (**Figure 54.a**) mais aucun n'induit de réduction de la réplication virale (**Figure 54.b**).

Discussion

1 Restriction du virus de la fièvre jaune dans l'intestin moyen du moustique par deux barrières : barrière d'infection et d'échappement.

Des études antérieures ont montré, en utilisant la technique de titration par plage de lyse sur des organes de la souche RexD d'*Ae. aegypti*, que la souche YFV-17D infecte l'intestin moyen, mais ne se dissémine pas vers les organes secondaires (McElroy et al., 2006a, 2006b). Nos analyses de RT-qPCR, d'immunofluorescence et de titration ont révélé que la souche YFV-17D se réplique également dans les intestins moyens des moustiques *Ae. aegypti* Paea. Cependant, sa réplication est significativement moins efficace que celle de l'isolat clinique YFV-Dakar. Parmi les virus YFV-17D qui se sont répliqués dans l'intestin moyen, moins de 10% ont réussi à atteindre les organes secondaires. Aucun de ces virus ne s'est disséminé dans les glandes salivaires. Ainsi, nos données suggèrent que la souche YFV-17D est sensible aux deux barrières associées à l'intestin moyen, ainsi qu'à la barrière d'infection des glandes salivaires, lorsqu'il est inoculé par voie orale.

Lorsqu'il est injecté dans le thorax du moustique, le virus YFV-17D se réplique dans les tissus de l'intestin moyen de manière aussi efficace que le virus YFV-Dakar. Ces données suggèrent que la restriction de YFV-17D au niveau de l'intestin moyen pourrait se produire au niveau des cellules épithéliales. Les analyses RT-qPCR suggèrent que la principale restriction survient à un stade antérieur à la production d'ARN viral. Plusieurs mécanismes, non mutuellement exclusifs, pourraient expliquer cette restriction.

1.1 Utilisation de récepteurs différents entre YFV-Dakar et YFV-17D

1.1.1 Différences de séquence dans les glycoprotéines d'enveloppe E

Premièrement, le YFV-17D pourrait rentrer de manière inefficace dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen. Les mécanismes d'entrée des *Flavivirus* sont mal décrits dans les cellules de moustiques. Ni les facteurs d'attachement ni les récepteurs d'entrée ne sont identifiés. Comme dans les cellules de mammifères, le domaine III de la protéine E est impliqué dans l'attachement et l'entrée

du virus (Smith, 2012). Ainsi, on peut envisager que la protéine E de YFV-17D aurait une affinité plus faible pour les facteurs d'entrée cellulaire que la protéine E de YFV-Dakar. Notre analyse de séquençage à haut débit a révélé que la séquence consensus des deux protéines E diffère de 69 mutations, dont 12 mutations non-synonymes. Sept de ces mutations non-synonymes sont situées dans le domaine III. De plus, le gène E de YFV-Dakar est plus diversifié que le gène E de YFV-17D. Enfin, dans les cellules Aag2 infectées pendant 48 h, nous avons détecté deux formes de la protéine E de YFV-Dakar dans des conditions non-dénaturantes et une seule forme de la protéine E de YFV-17D. Ces différences pourraient refléter une conformation protéique différente et pourraient expliquer une affinité différente pour les facteurs d'entrée dans les cellules.

Conformément à cette hypothèse, lorsque le domaine III du gène E d'un virus YFV capable de se disséminer a été remplacé par le domaine III du gène E de la souche YFV-17D, la dissémination du virus chimérique était fortement atténuée, ce qui suggère un rôle important du domaine III dans ce processus (McElroy et al., 2006b). Ces résultats pourraient toutefois être la conséquence de la chimérisation, car il est connu que les chimères des *Flavivirus* se répliquent moins efficacement que les virus parentaux (Mason et al., 2006). Des travaux précédents au laboratoire ont montré que la souche YFV-Asibi infecte un panel de cellules humaines par des mécanismes d'endocytose classique faisant intervenir la clathrine, alors que la souche YFV-17D exploite une voie indépendante de la clathrine pour son entrée dans les cellules (Fernandez-Garcia et al., 2016). Ces travaux ont également montré que les 12 mutations qui différencient la protéine E de YFV-Asibi de la protéine E de YFV-17D sont responsables des voies d'entrées différentes. Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse que les souches YFV-17D et YFV-Asibi utilisent des récepteurs cellulaires différents pour entrer dans les cellules de mammifères (Fernandez-Garcia et al., 2016). Il est donc possible que les souches YFV-17D et YFV-Dakar utilisent des récepteurs différents dans les cellules de moustiques et que le récepteur utilisé par YFV-17D soit moins exprimé à la surface apicale des cellules épithéliales de l'intestin moyen que celui utilisé par les souches cliniques.

1.1.2 Glycosylation des glycoprotéines d'enveloppe

La glycosylation du résidu d'asparagine (N) dans le motif de N-glycosylation conservé NX- (S / T) au niveau de l'acide aminé 153/154 est la modification post-traductionnelle la plus courante sur la protéine E des flavivirus. Cette modification est impliquée dans d'importantes fonctions de réplication virale et de pathogenèse (Roby et al., 2015). Des études de mutagenèse sur de nombreux flavivirus, y compris les virus DENV, WNV et ZIKV, indiquent que la perte de cette glycosylation en position N¹⁵³ / ¹⁵⁴ est un facteur déterminant de la réplication dans l'intestin moyen (Fontes-Garfias et al., 2017; Moudy et al., 2009; Wen et al., 2018). Contrairement à la plupart des flavivirus, la protéine E du virus

YFV est dépourvue du site canonique de glycosylation N^{153 / 154}. Un deuxième site potentiel de N-glycosylation non-canonique se situe au niveau de l'acide aminé 470 de la protéine. Il est peu probable que ce site soit fonctionnel car il se situe dans le domaine carboxy-terminal hydrophobe de la protéine et est donc inséré dans la membrane du réticulum endoplasmique. L'absence d'un motif de N-glycosylation accessible dans la protéine E de YFV-Dakar indique donc que ce motif n'est pas nécessaire pour la réplication et la dissémination chez le moustique. Nous pensons donc que des mutations dans la séquence de la protéine E, plutôt que son statut de glycosylation, sont impliquées dans la compétence vectorielle.

1.2 Échappement au système immunitaire du moustique

1.2.1 Rôle potentiel de la protéine structurale de capsid

Un autre mécanisme qui pourrait expliquer la faible réplication de YFV-17D dans l'intestin moyen des moustiques serait son incapacité à échapper aux mécanismes antiviraux mis en œuvre par les cellules épithéliales. La voie d'interférence par l'ARN est une défense antivirale majeure initiée par la reconnaissance des intermédiaires de réplication virale par la protéine Dicer-2 (Sim et al., 2014). Cette voie inhibe la réplication des virus de DENV et ZIKV dans l'intestin moyen et les glandes salivaires des moustiques (Franz et al., 2006; Mathur et al., 2010; Varjak et al., 2017). De manière intéressante, la protéine C de YFV contrecarre la voie de l'interférence à ARN dans les moustiques *Ae. aegypti* en protégeant les ARN viraux double-brin du clivage induit par Dicer-2 (Samuel et al., 2016). Aucune séquence d'acides aminés responsable de cet effet n'a été identifiée. Notre analyse de séquençage à haut débit a révélé que la séquence consensus du gène C des deux souches virales diffère de 10 mutations, dont une mutation unique non-synonyme. De plus, le gène C de YFV-Dakar présente beaucoup plus de diversité que le gène C de YFV-17D. Cette mutation unique et / ou ces différences de diversité des protéines C pourraient moduler leurs activités de suppression de la voie d'interférence ARN. Il est regrettable que Myles et ses collaborateurs (Samuel et al., 2016) n'aient pas fourni d'information sur la nature de la souche virale qu'ils avaient utilisée.

1.2.2 Rôle potentiel de la protéine non-structurale NS1

Nos analyses de séquençage à haut débit ont identifié le gène NS1 comme le troisième gène qui présente une diversité significativement plus importante pour la souche YFV-Dakar que la souche YFV-17D, à la fois par les indices de Shannon et de Simpson. La protéine NS1 des flavivirus est une glycoprotéine très conservée qui s'associe sous forme de dimère aux membranes cellulaires et qui est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme d'hexamère (Rastogi et al., 2016). Il a été montré

récemment que les protéines NS1 sécrétés par les cellules infectées pas les virus DENV et JEV, facilitent l'acquisition du virus par leurs vecteurs, en leur permettant d'échapper à deux mécanismes antiviraux importants: la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la voie JAK / STAT (Liu et al., 2016). Tout comme les protéines NS1 de DENV et JEV, la protéine NS1 de YFV-Dakar pourrait être un puissant supprimeur de ces deux stratégies antivirales. La protéine NS1 de YFV-Dakar pourrait également être plus exprimée et / ou sécrétée que celle de YFV-17D.

D'autres études seront nécessaires pour identifier le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) à l'origine de la faible réplication et dissémination de la souche vaccinale YFV-17D chez le moustique *Aedes*. Ces études sont essentielles pour mieux comprendre les interactions entre les virus et leurs vecteurs et peuvent également contribuer au développement de vaccins vivants atténués non-transmissibles.

2 Analyse à haut débit de la réponse de l'intestin moyen à l'infection par YFV

2.1 Profil d'infection de YFV-17D hétérogène dans l'intestin moyen

2.1.1 Mise en évidence

Nos résultats d'immunofluorescence réalisés sur des intestins moyens entiers, ainsi que ceux de RT-qPCR et de DotBlot réalisés sur des demi-intestins moyens, montrent que les sites de réplication de la souche YFV-17D dans cet organe sont beaucoup plus confinés que ceux de YFV-Dakar. Pourtant, des détections par immunohistochimie de YFV-17D et YFV-Asibi dans des estomacs d'*Ae. aegypti* indiquent des zones d'infection « larges » plutôt qu'en « foyers » dans les moustiques *Ae. Aegypti* RexD (McElroy et al., 2008). D'autres études ont montré des images de marquages viraux par immunofluorescence dans des intestins moyens infectés avec d'autres arbovirus : ceux-ci étaient répartis de manière homogène sur toute la surface de l'estomac. Ceci est, par exemple, le cas dans les intestins moyens infectés par le virus du Chikungunya au jour 4 post-gorgement (jpg) (Dong et al., 2017; Le Coupanec et al., 2017). Les foyers de réplication du virus de la dengue s'étendent également, sur toute la surface de l'intestin moyen de la souche Chetumal (isolée sur la péninsule du Yucatàn, Mexique) à 7 jpg (Salazar et al., 2007). Cependant, la susceptibilité des intestins moyens, et donc le profil d'infection, est dépendant des souches de moustique *Ae. aegypti* et de virus utilisées. Des foyers d'infections peu nombreux ont ainsi été observés aussi avec le virus de la dengue (DENV-1, -2 et -4) à 3 et 4 jpg dans les souches Red-eye et Liverpool (Le Coupanec et al., 2017; Olmo et al., 2018). Cela est

aussi le cas de la souche PF-25013-18 du virus Zika à 10 jpg dans les intestins de la souche Paea (Ryckebusch et al., 2017).

Dans notre cas, la présence d'un petit nombre de foyers d'infection, répartis de manière hétérogène a été montrée par immunofluorescence (**Figure 27** de l'Axe 1, p80), mais également en évaluant la charge virale dans les deux moitiés d'intestins moyens découpés longitudinalement. Par RT-qPCR nous avons montré que 80% d'intestins moyens infectés par YFV-17D présentait une moitié infectée, l'autre non (**Figure 27**, p80). Les deux moitiés ont également été testées respectivement par RT-qPCR et DotBlot (**Figure 30** de l'Axe 2, p89). Cette hétérogénéité de signal entre les analyses de dot-blot et de RT-qPCR suggérait que la technique de DotBlot n'était pas assez sensible. Au vu des analyses plus récentes de RT-qPCR réalisées sur des demi-intestins moyens, il semblerait que ces différences reflètent une réelle différence d'infection entre les deux moitiés d'intestin moyen. Dans les deux tests, bien que les moitiés d'intestins moyens infectés avec la souche YFV-Dakar contenaient des quantités souvent inégales d'ARN viral, elles étaient positives toutes les deux dans la plupart des cas (80 %), à la différence de YFV-17D. Les seuils de validation des infections sont déterminés de manière empirique pour les différentes techniques utilisées (immunofluorescence, RT-qPCR et dot-blot). Il est possible qu'en les modifiant, l'état infecté ou non change pour YFV-17D, mais la différence de profil entre YFV-17D et YFV-Dakar, restera la même.

2.1.2 Implications pour la protéomique

Nous avons réalisé tardivement l'existence de cette répartition confinée des sites de réplication de la souche YFV-17D dans l'intestin moyen. Dans le processus de préparation des échantillons pour l'analyse à haut-débit, le découpage en deux moitiés des intestins moyens avec YFV-17D a donc introduit un biais important. Tous les échantillons analysés en transcriptomique ont été testés par RT-qPCR donc sont tous bien infectés. Mais les échantillons « frères », utilisés en protéomique ont un fort risque de ne pas l'être dans le cas des infections avec la souche YFV-17D. Ceci peut expliquer pourquoi le virus YFV-17D n'est pas ou peu détecté dans les échantillons de protéomique.

2.2 Signal d'infection noyé dans les signaux non infectés des cellules de l'intestin moyen pour les études de transcriptomique et de protéomique

2.2.1 Analyse globale, regroupement des échantillons selon le statut d'infection

L'analyse globale de nos données de transcriptomique ne montre pas de regroupement, ni par dendrogramme, ni par PCA (**Figure 39** et **Figure 41**, p100). Une étude similaire a été effectuée sur des moustiques entiers infectés avec le virus Zika et analysés par transcriptomique à 2, 7 et 14 jpg (Etebari et al., 2017). Les échantillons se regroupent bien par statut d'infection aux trois jours. En revanche, les échantillons d'intestins moyens infectés avec le chikungunya ne se regroupent pas en fonction du statut d'infection, ni sur les analyses de PCA ni sur les dendrogrammes (Dong et al., 2017). Malgré cela, 80 gènes voient leur expression régulée (up- ou down-) lors de l'analyse différentielle. Ces données nous ont motivé à effectuer une analyse différentielle. L'impact de l'infection sur le transcriptome était beaucoup moins fort que ce à quoi nous nous attendions. En revanche, nous avons observé un effet-jour, très probablement dû à un effet de la digestion du repas sanguin par le moustique.

De manière inattendue, puisque les échantillons de protéomique sont probablement moins infectés que ceux de transcriptomique, l'analyse globale des données de protéomique par dendrogramme sépare bien les échantillons YFV-17D des échantillons YFV-Dakar, et cela au jour 3 et jour 7 post-gorgement (données non présentées dans le manuscrit).

2.2.2 Gènes différentiellement exprimés

Nous nous attendions donc à détecter un nombre relativement important (au moins une centaine) de gènes différentiellement exprimés entre les conditions infectées ou non. Or, seulement 2 gènes semblent avoir leurs expressions régulées par l'infection par au jour 3 post-gorgement. La DENV induit une régulation de 31 et 96 gènes dans les intestins moyens d'*Aedes aegypti* dès les jours 1 et 4 post infection, respectivement (Bonizzoni et al., 2012). Dans une autre étude, ce sont 240 gènes qui sont up-régulés dans les intestins moyens d'*Aedes aegypti* par l'infection par le virus DENV (dont 54 gènes de l'immunité innée) (Xi et al., 2008). Une étude identifie 18 gènes régulés à la fois aux jours 2, 7 et 14 post-gorgement avec le virus Zika, dans les moustiques entiers (Etebari et al., 2017). L'étude sur les intestins moyens infectés avec le virus chikungunya indique 80 gènes régulés par l'infection (Dong et al., 2017). Nous pouvons émettre 2 hypothèses pour expliquer ce faible nombre de gènes avec une expression régulée par l'infection par le virus YFV :

1^{ère} hypothèse : notre analyse statistique est trop stringente. Nous n'avons pas utilisé le même logiciel de détermination des gènes différentiellement exprimés, ou bien une version plus récente, que celui utilisé dans d'autres études (Bonizzoni et al., 2012; Dong et al., 2017). Cependant, le même algorithme a été utilisé récemment sur des échantillons similaires, mais non-*poolés*, et ont donné des résultats de gènes différentiellement exprimés (S. Merklings, Laboratoire de L. Lambrecht, communication personnelle).

2^{ème} hypothèse : le signal est noyé car il y a trop peu de cellules infectées. Il n'y a aucun doute sur le fait que les échantillons analysés par la transcriptomique étaient bien infectés (car ils ont été au préalable analysés et sélectionnés par RT-qPCR), même si nous n'avons pas pu détecter les génomes viraux dans les *reads a posteriori* puisque nous avons fait un enrichissement des ARNm. Nous pensons que l'analyse d'une grande quantité de cellules, dont seulement un faible pourcentage est infecté peut expliquer l'absence de signaux. Par exemple, un gène up-régulé d'un facteur 4 dans les cellules infectées ne sera pas détecté si seulement 25 % des cellules sont infectées. Dans ce sens, une étude récente détaille l'analyse transcriptomique d'une population de macrophages infectée de manière hétérogène (36 % d'infection) (Carlin et al., 2018). Les données de séquençage acquises de manière indépendante sur cellules infectées et non-infectées sont rassemblées de manière artificielle par analyse bioinformatique. Si la population totale est analysée, sans trier les macrophages infectés des non-infectés, l'analyse est moins sensible et moins spécifique. En effet, seulement 32 % des gènes up-régulés et 10% des gènes down-régulés sont détectés. De plus, des faux positifs apparaissent en grande quantité : 600 gènes up-régulés, 300 gènes down-régulés (Carlin et al., 2018).

2.2.3 Alternative possible: mise au point d'une méthode pour isoler les cellules infectées avant les analyses à haut débit.

Afin de pallier ce problème de faible fréquence d'infection, une perspective serait d'enrichir les échantillons analysés en cellules infectées. Pour cela, plusieurs étapes seraient nécessaires:

La dissociation et le tri des cellules de l'intestin. Une procédure de dissociation et purification des différents types cellulaires constituant le tube digestif du modèle *Drosophila melanogaster* a déjà été décrit (Dutta et al., 2013). Le protocole implique une dissociation enzymatique des cellules du tube digestif.

Une méthode de tri des cellules infectées. Cet enrichissement peut se faire grâce à la cytométrie en flux, après un marquage immunofluorescent des protéines virales. L'étude mentionnée ci-dessus sur les tubes digestifs de drosophile utilise un modèle transgénique dont les différents types de cellules intestinales portent différents marqueurs fluorescents (Dutta et al., 2015, 2013).

Séquençage sur cellule unique. Il serait aussi possible de réaliser du séquençage sur cellule unique. La détection de tous les ARN (dont les ARN viraux) dans les cellules pourrait permettre de détecter les cellules infectées sans avoir à les trier auparavant. Cela enlève l'avantage de l'enrichissement depuis une population faiblement infectée de cellules mais a l'avantage de ne pas nécessiter de marquage. Les analyses sur cellules uniques, dont celles de séquençage à haut débit (*single-cell sequencing*), sont de plus en plus fréquemment utilisées depuis 2010 (Linnarsson and Teichmann, 2016). Les différentes technologies permettent d'analyser une quantité de cellule de plus en plus importante pour chaque échantillon, comme la technologie 10x Genomics' Chromium, analysant 10 000 cellules par échantillon (Zheng et al., 2017). Des hémocytes de moustique du genre *Anopheles* ont ainsi pu être triés et analysés par transcriptomique (Severo et al., 2018).

La combinaison de méthodes de dissociation des cellules de l'intestin moyen puis de transcriptomique sur cellule unique pourrait représenter une perspective pour le problème de l'infection à faible fréquence des cellules de l'intestin moyen par YFV.

2.3 Analyse de protéomique

2.3.1 Différence d'expression des protéines et ARNm (**Figure 43**, p104) dans les intestins moyens infectés par la souche YFV-Dakar

Basés sur l'analyse de l'impact de l'infection par YFV-Dakar sur le niveau d'expression des protéines de l'intestin moyen d'*Aedes aegypti* (§ 4.1.2, p99), nous avons sélectionné 22 protéines parmi toutes les candidates up- et down-régulées. L'expression des gènes correspondant a été mesurée dans les échantillons « frères » en transcriptomique et aussi par RT-qPCR. Ces facteurs d'induction ont été comparés aux facteurs d'induction identifiés en protéomique (**Figure 43**, p104). De manière étonnante il n'y a pas de corrélation entre les niveaux d'induction des protéines et ceux des ARNm dans les échantillons « frères ». Nous pouvons formuler deux hypothèses pour expliquer cette absence de corrélation:

1^{ère} hypothèse : les variations d'abondance de protéines sont bien présentes, sans variation d'abondance des ARNm correspondants, indiquant une régulation traductionnelle ou post-traductionnelle pour les 22 protéines. Ce mécanisme concernerait toutes les protéines sélectionnées, cela nous paraît donc peu probable.

2^{ème} hypothèse : comme discuté ci-dessus, les échantillons analysés en protéomique ont potentiellement des intensités d'infection différentes de celles des échantillons « frères » analysés en transcriptomique. Cependant, la **Figure 27** (p80) indique que les quantités d'ARN viral de la souche

YFV-Dakar ne sont pas très différentes dans les deux moitiés des intestins moyens. Il est donc improbable que l'absence totale de corrélation entre les niveaux d'induction des protéines et ceux des ARNm dans les échantillons « frères » soit due uniquement à des intensités différentes de réplication virale entre les deux demi-intestins moyens.

Nous n'avons donc pas d'hypothèse satisfaisante pour expliquer cette corrélation inexistante entre les niveaux d'induction des protéines et ceux des ARNm correspondants dans les demi-intestins moyens appariés.

2.3.2 Analyse de protéines malgré la différence d'intensité d'infection

En analysant les données de protéomique, nous avons observé une quantité beaucoup plus faible (non quantifiable) de peptides de YFV-17D que de YFV-Dakar (1^{ère} ligne du **Tableau 10**). Nous avons décidé de ne pas analyser les données en comparant les échantillons YFV-17D avec YFV-Dakar. Dans l'idéal, pour comparer les effets des deux souches, leur réplication aurait dû être équivalente. Ici, elle est plus faible pour YFV-17D. Ainsi une protéine dont l'abondance est plus élevée dans YFV-17D que dans NI, mais encore plus élevée dans YFV-Dakar (1^{ère} ligne en rouge dans le **Tableau 10**), ne peut pas être assimilée à un effet souche-dépendant, car son évolution va dans le même sens que l'intensité d'infection. Autrement dit, on ne peut pas analyser les protéines dont l'abondance est moins modifiée dans YFV-17D que dans YFV-Dakar, par rapport au NI.

En revanche, analyser les protéines dont l'abondance est d'avantage affectée dans YFV-17D que dans YFV-Dakar resterait possible. Cette abondance pourrait être plus up-réglée dans YFV-17D que dans YFV-Dakar (2 premières lignes vertes du **Tableau 10**), et concerner par exemple, les protéines du système immunitaire, qui bloquent plus YFV-17D que YFV-Dakar. A l'inverse l'abondance pourrait être plus down-réglée dans YFV-17D que dans YFV-Dakar (2 dernières lignes vertes du **Tableau 10**), et concerner des facteurs pro-viraux, mieux régulés pour empêcher la réplication dans le cas de l'infection par YFV-17D que par YFV-Dakar.

Ces facteurs up-réglés seraient l'équivalent chez le moustique des facteurs que l'on retrouve impliqués dans la réponse immunitaire très forte à la souche vaccinale YFV-17D chez l'humain par rapport à la réponse immunitaire plus faible aux souches cliniques YFV-Asibii ou YFV-Dakar (Douam and Ploss, 2018). Des différences de réponse immunitaire ont aussi été décrites entre les virus Lassa et Mopeia (famille *Arenaviridae*) (Carnec et al., 2018), ainsi qu'entre les virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) et virus Dugbe (Peyrefitte et al., 2010). Ces différences d'induction immunitaire soutiennent la possibilité d'utiliser le virus Mopeia comme vaccin vivant « atténué » contre le virus Lassa et le virus Dugbe comme vaccin contre le virus CCHF.

Tableau 10: analyser les protéines dont la quantité est inversement proportionnelle à la quantité de virus.

	NI	YFV-17D	YFV-Dakar
virus	=	↗	↗↗
	=	↗	↗↗
	=	↘	↘↘
protéine	=	↗	=
	=	↗↗	↗
	=	↘	=
	=	↘↘	↘

2.4 Validation des candidats dans le modèle cellulaire Aag2

2.4.1 Inefficacité des ARNdb contrôles ciblant Ago2

Lors de la validation fonctionnelle de nos candidats de protéomique, nous avons utilisé des ARNdb contrôles. Nous sommes surpris de ne pas avoir observé d'effet pro-viral de l'ARNdb Ago2 sur la réplication de YFV-Dakar dans les cellules Aag2. En effet, l'extinction de l'expression du gène Ago2 par une technique d'ARN interférence afin de diminuer la réponse antivirale a été utilisée dans des études antérieures. Des ARNdb ont été testés avec succès sur la réplication du virus CHIKV dans les cellules Aag2 (McFarlane et al., 2014). L'extinction de Ago2 a été également effectuée dans des moustiques *Aedes aegypti* infectés oralement par le virus DENV. Des résultats contradictoires ont été obtenus : dans une étude un effet pro-viral a été observé (Raquin et al., 2017), mais pas dans une autre (Olmo et al., 2018). Il est possible que la voie d'ARN interférence régulée par Ago2 n'ait pas le même impact sur tous les virus, ni dans les différents types cellulaires ou tissus du moustique. Cela expliquerait notre absence d'effet.

2.4.2 Effet *off-target* d'un des ARNdb testé sur la réplication de YFV dans les cellules Aag2

Trois ARNdb différents ont été synthétisés pour cibler le même gène candidat VPS16 dans les cellules Aag2 d'*Aedes aegypti*. Ces trois ARNdb sont efficaces puisqu'ils diminuent l'expression du gène à plus de 75 % (**Figure 52**, p118). L'ARNdb ciblant le milieu du gène diminue la réplication de YFV-Dakar dans les cellules Aag2 d'un facteur 4 à 14 selon la synthèse. Par contre, les deux ARNdb ciblant les extrémités 5' et 3' du gène n'ont pas d'effet sur la réplication virale dans les cellules. Nous concluons qu'il est improbable que la protéine VPS16 codée par ce gène soit responsable de la diminution de la

réplication virale. La protéine VPS16 n'est donc plus considérée comme un candidat solide. L'effet-dose du traitement observé sur la réplication virale avec l'ARNdb ciblant le milieu du gène laisse penser qu'il a un effet, direct ou indirect, sur la réplication virale dans les cellules Aag2 (**Figure 52**, p118). Nous formulons les deux hypothèses suivantes pour expliquer cet effet :

1^{ère} hypothèse : un effet *off-target* de l'ARNdb sur l'ARN viral ou sur un ARN cellulaire ayant une importance pour la réplication virale. Les critères pour évaluer si un gène peut être ciblé par un ARNdb sont assez vagues (Das et al., 2013). Nous en avons relevé quelques-uns dans la littérature: 1) Il y a une forte probabilité de *off-target* s'il existe 90 % de complémentarité (19 ntp sur 21 ntp) (Birmingham et al., 2006; Jackson et al., 2003), 2) 11 ntp consécutifs ou bien 15 ntp au total seraient suffisants pour induire une diminution d'expression (Amarzguioui et al., 2003), 3) La région des nucléotides compris entre 2-8 ntp en 5' est très importante pour la reconnaissance qui provoque les *off-target* (Jackson et al., 2006) alors que les *mismatches* hors de cette zone sont beaucoup plus tolérés (Amarzguioui et al., 2003).

Nous avons fragmenté l'ARNdb ciblant le milieu du gène VPS16 en toutes les possibilités d'ARNsi de 21 ntp. Ces petits ARNsi ont été alignés (Blastn, NCBI) contre la séquence de YFV-Dakar et contre le génome d'*Aedes aegypti*. Le résumé des séquences qui ont le plus de ressemblance avec un ARNsi sont présentés dans le **Tableau 11**. Les plus longues séquences de YFV-Dakar ayant une similitude avec un des ARNsi générés ont une taille de 13 ntp, et s'alignent sur trois endroits différents du génome viral. Si 11 ntp suffisent pour créer une diminution d'expression (Amarzguioui et al., 2003), alors il est possible que cet ARNdb induise la dégradation de l'ARN du virus. Les plus longues séquences du génome d'*Aedes aegypti* ayant une ressemblance avec un des ARNsi générés mesurent 18 ntp, sans mismatch, dans 7 endroits différents du génome. Ces séquences sont assez grandes pour induire une diminution d'expression selon le même critère. Cependant, elles se situent dans des régions intergéniques et des introns, donc n'ont, *a priori*, pas d'effet sur une expression de gène. Il faudrait analyser de nouveau ces différents ARNsi en les alignant sur le transcriptome d'*Aedes aegypti*.

2^{ème} hypothèse : une seconde hypothèse est que l'ARNdb ciblant le candidat VPS16 provoque une réaction anti-virale en stimulant une voie immunitaire. Dans les cellules de mammifères, les ARNdb issus de la réplication virale sont détectés par différents récepteurs cytoplasmiques ou membranaires, tels que MDA5 ou RIG-I.

Tableau 11: Comparaison des ARNsi issus de l'ARNdb Q16SL9_v1 avec le génome YFV-Dakar et le génome d'*Ae. aegypti* (AaeL5.0).

Outil utilisé : Blastn, Evalue de l'alignement indiquée. Les zones en commun sont caractérisées par leur taille, le nombre de mismatch, la localisation sur l'ARNdb et la localisation de la séquence cible potentielle.

Blastn contre	taille région commune (ntp)	nb mismatch	Evalue	localisation ARNdb	localisation de la cible	nature de la cible
génom YFV-Dakar	13	0	0,002	175-187	YFV-Dakar NS4B (7455-7467)	exon
	13	1	0,43	23-35	YFV-Dakar 3'UTR (10669-10681)	exon
	13	1	0,43	233-245	YFV-Dakar NS3 (5730-5742)	exon
génom <i>Ae. aegypti</i> AaeL5.0	18	0	0,082	4-21	Chromosome 1 NC_035107.1 (5768006-5768023)	intron
	18	0	0,082	4-21	Chromosome 3 NC_035109.1 (39 742 906-39 742 923)	région intergénique
	18	0	0,082	4-21	Chromosome 2 NC_035108.1 (408456855-408456872)	intron
	18	0	0,082	4-21	Chromosome 2 NC_035108.1 (439809121-439 809 138)	intron
	18	0	0,082	223-240	Chromosome 1 NC_035107.1 (54705651-54705668)	intron
	18	0	0,082	176-193	Chromosome 2 NC_035108.1 (75213376-75213393)	intron
	18	0	0,082	372-389	Chromosome 1 NC_035107.1 (151165690-151165707)	intron

La détection des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) n'est pas bien décrite dans les cellules d'insecte au-delà de la détection des ARNdb par l'endonucléase Dicer-2. Il serait possible que l'ARNdb active une des autres voies de l'immunité innée chez les moustiques (Toll, IMD, JAK-STAT) par un mécanisme encore inconnu. Des résultats non publiés suggèrent que la transfection du contrôle ARNdb polyI:C active la voie IMD et inhibent la réplication du virus DENV dans les cellules Aag2 (données non publiées, K. Maringer). Cet ARNdb pourrait avoir une structure secondaire spécifique plus immunogène que celle des deux autres ciblant le même gène (et celle des autres ARNdb testés).

Afin de tester cette deuxième hypothèse, nous pourrions transfecter des cellules Aag2 avec les différents ARNdb ciblant le gène de VPS16, analyser l'induction de ces différentes voies immunitaires en parallèle à la réplication virale de YFV-Dakar.

2.4.3 Validation des candidats de protéomique chez le moustique plutôt que dans les cellules Aag2

Le test fonctionnel en cellules Aag2 possède ses limites : la lignée cellulaire Aag2 est issue d'un broyat d'embryons d'*Ae. aegypti* (Peleg, 1968), et ne possède donc pas les caractéristiques des cellules épithéliales intestinales. De plus, ces cellules sont infectées de manière constitutive avec d'autres virus. Le premier à être décrit est un *Flavivirus* spécifique des insectes, le CFAV (*cell fusing agent virus*) (Scott et al., 2010), qui se révèle capable d'interagir avec la DENV dans ces cellules (Zhang et al., 2017).

Récemment, il a été montré qu'un virus de la famille des *Bunyaviridae* infectait de manière constitutive et répliquative les cellules Aag2 (Weger-Lucarelli et al., 2018). De plus, les conditions de culture cellulaires *in vitro* ne récapitulent pas les conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les cellules dans les tissus, certaines étant clés pour la mise en place du système immunitaire anti-viral, comme par exemple, le microbiote présent dans l'intestin du moustique (Barletta et al., 2017).

Les taux d'infection et de dissémination étant souvent faibles lors des études *in vivo* dans le moustique, l'infection par voie intrathoracique est parfois utilisée pour analyser la diminution d'expression d'un gène sur la réplication virale. Cependant, les voies immunitaires actives dans l'intestin moyen et dans la cavité de l'hémocœle sont différentes. Cela a été démontré chez la drosophile (Ferreira et al., 2014), chez le moustique *Anopheles gambiae*, infecté par l'*Alphavirus* O'Nyong-Nyong (Carissimo et al., 2015b) ainsi que chez le moustique *Aedes aegypti* infecté par le virus DENV (Olmo et al., 2018). Pour étudier le rôle de la MEB, il est donc primordial d'infecter les moustiques avec un repas sanguin infectieux, et non *via* une injection. Dans le cas d'une injection avec des ARNdb, il est judicieux de vérifier l'inhibition de l'expression du gène cible, non pas dans le moustique entier, mais dans les tissus de l'intestin moyen, qui sont les premières cibles du virus. Une précédente étude ayant diminué l'expression de Ago2 dans des moustiques *Ae. aegypti* a montré que le *silencing* était efficace dès 2 jours post-injection et jusque 9 jours dans les intestins moyens, mais l'effet est beaucoup moins visible dans la tête (McFarlane et al., 2014).

L'utilisation de technique d'ARN interférence possède l'inconvénient de pouvoir présenter des effets *off-target*. Ces effets ont été décrit lors de l'utilisation de longs ARNdb dans des cellules de *Drosophila melanogaster* (Kulkarni et al., 2006), nous avons également pu l'observer dans notre étude sur cellules Aag2. L'apparition de la technologie CRISPR-Cas9 a ouvert grandes les portes de la modification des génomes (Jinek et al., 2012). L'application de la technique CRISPR-Cas9 aux arthropodes, dans les modèles cellulaires (Varjak et al., 2017), mais aussi dans les moustiques du genre *Aedes* (Kistler et al., 2015; Liu et al., 2018), est de plus en plus répandue. Elle permettra de tester l'effet de gènes sur les infections arbovirales de manière bien plus efficace que les techniques de classiques de *silencing*.

Annexes

Tableau 12: Protéines dont l'abondance est augmentée dans les échantillons J7-Dakar par rapport aux échantillons J7-NI. En bleu les protéines sélectionnées comme candidates pour la validation fonctionnelle. Le facteur d'induction de la protéine par l'infection est indiqué en \log_2 .

UniProt accession	nom protéine	nom gène	\log_2 (DAK/NI)	Description fonction du gène (NCBI)
Q175P2	Q175P2_AEDAE	AAEL006591	4,03	rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit
Q17KK8	Q17KK8_AEDAE	AAEL001657	3,67	probable ATP-dependent RNA helicase DDX23
Q17IR9	Q17IR9_AEDAE	AAEL002277	3,55	cAMP-dependent protein kinase type I regulatory subunit
Q16X16	Q16X16_AEDAE	AAEL009026	3,26	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12
Q17DW3	Q17DW3_AEDAE	AAEL004027	3,17	glucose dehydrogenase [FAD, quinone]
Q1HQW9	Q1HQW9_AEDAE	AAEL010340	3,01	serine/arginine-rich splicing factor 2
Q172L7	Q172L7_AEDAE	AAEL007335	2,86	uncharacterized oxidoreductase dhs-27
Q16XK7	Q16XK7_AEDAE	AAEL008844	2,86	sarcoplasmic calcium-binding protein 1
Q17NP8	Q17NP8_AEDAE	AAEL000624	2,71	uncharacterized LOC5564842
J9HHP4	J9HHP4_AEDAE	23687783	2,65	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1
Q17NV6	Q17NV6_AEDAE	AAEL000579	2,57	probable trafficking protein particle complex subunit 13 homolog
Q16VU4	Q16VU4_AEDAE	AAEL009431	2,48	39S ribosomal protein L10, mitochondrial
Q16MG4	Q16MG4_AEDAE	AAEL012306	2,36	nedd8-activating enzyme E1 catalytic subunit
P18153	ALL2_AEDAE	D7	2,35	37 kDa salivary gland allergen Aed a 2-like
Q16T60	Q16T60_AEDAE	AAEL010378	2,30	Usher syndrome type-1G protein homolog
Q16FJ6	Q16FJ6_AEDAE	AAEL014733	2,29	nuclear pore complex protein Nup214
Q171B6	Q171B6_AEDAE	AAEL007708	2,28	U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein
Q16XG8	Q16XG8_AEDAE	AAEL008887	2,24	cytochrome c oxidase subunit 6B1
Q17HJ3	Q17HJ3_AEDAE	AAEL002658	2,24	4-coumarate--CoA ligase 1
Q16SL9	Q16SL9_AEDAE	AAEL010559	2,23	vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog
Q17PR2	Q17PR2_AEDAE	AAEL000279	2,21	peptide deformylase, mitochondrial
Q16IB0	Q16IB0_AEDAE	AAEL013736	2,19	intron-binding protein aquarius
Q177G6	Q177G6_AEDAE	AAEL006133	2,19	tubulin-specific chaperone A
Q16Q66	Q16Q66_AEDAE	AAEL011390	2,13	39S ribosomal protein L9, mitochondrial
Q17CU4	Q17CU4_AEDAE	AAEL004440	2,12	tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein
Q16V30	Q16V30_AEDAE	AAEL009708	2,09	thioredoxin, mitochondrial
Q17P30	Q17P30_AEDAE	AAEL000475	2,05	beta-catenin-like protein 1
Q16GB1	Q16GB1_AEDAE	AAEL014435	2,05	uncharacterized LOC5564428
Q17GR9	CIAO1_AEDAE	Ciao1	2,04	probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein Ciao1
Q17IA3	Q17IA3_AEDAE	AAEL002432	2,00	endoplasmic reticulum metallopeptidase 1
Q17AF2	Q17AF2_AEDAE	AAEL005319	2,00	inconnu

Tableau 13: Protéines détectées dans les échantillons J7-Dakar, mais pas dans les échantillons J7-NI. En bleu la protéine sélectionnée comme candidate pour la validation fonctionnelle.

UniProt accession	nom protéine	nom gène	Description fonction du gène (NCBI)
O01949	ALL3_AEDAE	AAEL010235	30 kDa salivary gland allergen Aed a 3
Q16YB3	ITPA_AEDAE	AAEL008605	inosine triphosphate pyrophosphatase
Q17DK2	NAA25_AEDAE	psidin	Phagocyte signaling-impaired protein / psidin
Q17LR9	MED20_AEDAE	MED20	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 20
J9E8Z2	J9E8Z2_AEDAE	AAEL017357	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
J9E9J9	J9E9J9_AEDAE	23687430	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
J9HSU2	J9HSU2_AEDAE	AAEL017515	cyclic AMP response element-binding protein B
Q0IEY0	Q0IEY0_AEDAE	AAEL007712	tuberin
Q0IF93	Q0IF93_AEDAE	AAEL006417	37 kDa salivary gland allergen Aed a 2-like
Q0IFG9	Q0IFG9_AEDAE	AAEL004832	KAT8 regulatory NSL complex subunit 2
Q17LQ2	Q17LQ2_AEDAE	AAEL001280	28S ribosomal protein S15, mitochondrial
Q16HQ8	Q16HQ8_AEDAE	AAEL013948	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E
Q16HU5	Q16HU5_AEDAE	AAEL013899	aminopeptidase N
Q16IH3	Q16IH3_AEDAE	AAEL013658	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog
Q16IT0	Q16IT0_AEDAE	AAEL013560	Mitochondrial ribosomal protein, L50
Q16KB4	Q16KB4_AEDAE	AAEL013045	exosome complex component RRP41
Q16LE3	Q16LE3_AEDAE	AAEL012681	probable ribosome biogenesis protein RLP24
Q16LJ7	Q16LJ7_AEDAE	AAEL012624	elongator complex protein 6
Q170Z9	Q170Z9_AEDAE	5579977	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit
Q16LL1	Q16LL1_AEDAE	AAEL012615	uncharacterized LOC5576554
Q16MB9	Q16MB9_AEDAE	AAEL012354	dystrophin, isoforms A/C/F/G/H
Q16MT6	Q16MT6_AEDAE	AAEL012196	inconnu
Q16NB4	Q16NB4_AEDAE	AAEL012025	probable 39S ribosomal protein L45, mitochondrial
Q16NF8	Q16NF8_AEDAE	AAEL011988	tRNA selenocysteine 1-associated protein 1
Q16NP2	Q16NP2_AEDAE	AAEL011906	histone H1
Q16P80	Q16P80_AEDAE	GSTS1	Glutathione transferase
Q16PE9	Q16PE9_AEDAE	AAEL011651	probable RNA-binding protein CG14230
Q16PH8	Q16PH8_AEDAE	AAEL011630	UPF0598 protein CG30010
Q16PQ7	Q16PQ7_AEDAE	AAEL011556	vacuolar protein-sorting-associated protein 36
Q16Q29	Q16Q29_AEDAE	AAEL011441	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1
Q16QM1	Q16QM1_AEDAE	AAEL011245	probable deoxyhypusine synthase
Q16RF7	Q16RF7_AEDAE	AAEL010971	titin
Q16TT0	Q16TT0_AEDAE	AAEL010136	uncharacterized LOC5572919
Q16UX6	Q16UX6_AEDAE	AAEL009766	lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial
Q16VW7	Q16VW7_AEDAE	AAEL009412	eukaryotic translation initiation factor 2D
Q16WH6	Q16WH6_AEDAE	AAEL009219	flocculation protein FLO11
Q16WV1	Q16WV1_AEDAE	IAP1	Inhibitor of Apoptosis (IAP) containing Baculoviral IAP Repeat(s) (BIR domains)
Q16X85	Q16X85_AEDAE	AAEL008949	inconnu
Q16ZA2	Q16ZA2_AEDAE	AAEL008281	alpha-tocopherol transfer protein

Q16ZU0	Q16ZU0_AEDAE	AAEL008063	remodeling and spacing factor 1
Q170N2	Q170N2_AEDAE	AAEL007854	protein pelota
Q170R5	Q170R5_AEDAE	AAEL007823	protein argonaute-3
Q171G3	Q171G3_AEDAE	AAEL007651	probable phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha
Q172E5	Q172E5_AEDAE	AAEL007406	elongator complex protein 5
Q172X8	Q172X8_AEDAE	AAEL007228	cysteine protease ATG4B
Q173P2	Q173P2_AEDAE	AAEL007061	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1
Q175J4	Q175J4_AEDAE	AAEL006644	tachykinins
Q176K3	Q176K3_AEDAE	AAEL006359	sulfotransferase 1 family member D1
Q176R0	Q176R0_AEDAE	AAEL006290	UPF0565 protein C2orf69 homolog
Q177K9	Q177K9_AEDAE	AAEL006096	gelsolin
Q177V9	Q177V9_AEDAE	AAEL006011	serine protease inhibitor dipetalogastin
Q17A06	Q17A06_AEDAE	AAEL005454	ATPase family AAA domain-containing protein 1-B
Q17AZ4	Q17AZ4_AEDAE	AAEL005149	liprin-beta-2
Q17B75	Q17B75_AEDAE	AAEL005061	exocyst complex component 5
Q17I28	Q17I28_AEDAE	AAEL002495	probable chitinase 10
Q17C82	Q17C82_AEDAE	AAEL004661	chitooligosaccharidolytic beta-N-acetylglucosaminidase
Q17CR7	Q17CR7_AEDAE	AAEL004482	RRP15-like protein
Q17DU2	Q17DU2_AEDAE	AAEL004063	protein Notchless
Q17DU6	Q17DU6_AEDAE	AAEL004071	iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU
Q17FN8	Q17FN8_AEDAE	AAEL003344	metaxin-2
Q17GE0	Q17GE0_AEDAE	AAEL003108	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4
Q17I53	Q17I53_AEDAE	AAEL002459	inconnu
Q17I83	Q17I83_AEDAE	AAEL002455	nuclear pore complex protein Nup153
Q17IT4	Q17IT4_AEDAE	AAEL002260	trafficking protein particle complex subunit 11
Q17IU3	Q17IU3_AEDAE	AAEL002225	pyroglutamyl-peptidase 1
Q17J52	Q17J52_AEDAE	AAEL002148	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog, mitochondrial
Q17JH3	Q17JH3_AEDAE	AAEL001977	integrator complex subunit 1
Q17JV4	Q17JV4_AEDAE	AAEL001889	serine-arginine protein 55
Q17LX9	Q17LX9_AEDAE	AAEL001211	WD repeat-containing protein 82
Q17MC4	Q17MC4_AEDAE	AAEL001085	mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40
Q17PZ9	Q17PZ9_AEDAE	AAEL000173	coiled-coil domain-containing protein 86
Q17Q51	Q17Q51_AEDAE	AAEL000146	inconnu
Q1HQX8	Q1HQX8_AEDAE	AAEL004691	RING-box protein 1A
Q9GYW1	Q9GYW1_AEDAE	ProPO1	inconnu

Tableau 14: Protéines dont l'abondance est diminuée dans les échantillons J7-Dakar par rapport aux échantillons J7-NI.

UniProt accession	nom protéine	nom gène	log ₂ (DAK/Ni)	Description fonction du gène (NCBI)
Q17HK0	Q17HK0_AEDAE	AAEL002654	-2,09	zonadhesin (lien entre ovule et spermatozoïde)
Q17Q11	Q17Q11_AEDAE	AAEL000163	-2,09	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim22
J9HSN0	J9HSN0_AEDAE	23687436	-2,10	inconnu
Q16FA2	Q16FA2_AEDAE	AAEL014847	-2,16	innexin inx2
Q16R60	Q16R60_AEDAE	AAEL011061	-2,21	Rho guanine nucleotide exchange factor 11
Q174I7	Q174I7_AEDAE	AAEL006887	-2,25	mRNA turnover protein 4 homolog
Q174K0	Q174K0_AEDAE	AAEL006854	-2,33	protein NPC2 homolog
Q17DF2	Q17DF2_AEDAE	AAEL004235	-2,38	kinesin-like protein Klp10A
Q17CM9	Q17CM9_AEDAE	AAEL004538	-2,38	N-acetylgalactosaminyltransferase 7
Q16V79	Q16V79_AEDAE	AAEL009658	-2,40	trehalase
J9EB97	J9EB97_AEDAE	23687928	-2,43	mitochondrial dicarboxylate carrier
Q178X6	Q178X6_AEDAE	AAEL005732	-2,45	short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
Q178E9	Q178E9_AEDAE	AAEL005937	-2,49	multidrug resistance-associated protein 4
Q16RL5	Q16RL5_AEDAE	AAEL010912	-2,62	venom dipeptidyl peptidase 4
Q0IG54	Q0IG54_AEDAE	AAEL003535	-2,64	bromodomain-containing protein DDB_G0270170
Q17D26	Q17D26_AEDAE	AAEL004351	-2,71	casein kinase I
Q17EN5	Q17EN5_AEDAE	HOT_AEDAE	-2,75	probable hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial
Q1HQF6	Q1HQF6_AEDAE	AAEL001569	-2,76	dnaJ homolog subfamily C member 5 homolog
Q171F3	Q171F3_AEDAE	AAEL007669	-2,77	Oxidoreductase
Q16V05	Q16V05_AEDAE	AAEL009738	-2,78	CCAAT/enhancer-binding protein zeta
Q172P3	Q172P3_AEDAE	AAEL007322	-2,84	putative phosphatidate phosphatase
Q6Q9G4	Q6Q9G4_AEDAE	AAEL005914	-3,06	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14
Q17IN4	Q17IN4_AEDAE	AAEL002286	-3,13	autophagy protein 5
Q16N01	Q16N01_AEDAE	Slif	-3,17	Slif - PREDICTED: Aedes aegypti cationic amino acid transporter 3
Q16RU5	Q16RU5_AEDAE	AAEL010834	-3,27	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1
Q16LR7	Q16LR7_AEDAE	AAEL012549	-3,49	probable phospholipid-transporting ATPase IF
Q179R6	Q179R6_AEDAE	AAEL005526	-3,60	uncharacterized LOC5579825
Q16TH8	Q16TH8_AEDAE	AAEL010241	-3,60	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1 homolog
Q179Z5	Q179Z5_AEDAE	AAEL005458	-3,70	carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform
Q16WG3	Q16WG3_AEDAE	AAEL009217	-3,72	28S ribosomal protein S35, mitochondrial
Q16T82	Q16T82_AEDAE	AAEL010353	-4,60	inconnu
Q17ES6	Q17ES6_AEDAE	AAEL003651	-5,66	phospholipase D3
Q17DT8	Q17DT8_AEDAE	AAEL004045	-5,70	maestro heat-like repeat-containing protein family member 1
Q0IFE2	Q0IFE2_AEDAE	AAEL005719	-5,91	protein suppressor of forked (mRNA 3' end formation)
Q17PY3	Q17PY3_AEDAE	AAEL000194	-8,08	phosphatidylinositol 4-kinase alpha

Tableau 15: Protéines détectées dans les échantillons J7-NI, mais pas dans les échantillons J7-Dakar.

UniProt accession	nom protéine	nom gène	Description fonction du gène (NCBI)
-------------------	--------------	----------	-------------------------------------

Q172Q2	Q172Q2_AEDAE	AAEL007320	inconnu
Q17J49	U184_AEDAE	AAEL002161	UPF0184 protein AAEL002161
QOIEC0	QOIEC0_AEDAE	AAEL011429	AP-3 complex subunit mu-1
QOIEG6	QOIEG6_AEDAE	AAEL010761	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 1
QOIF60	QOIF60_AEDAE	AAEL006510	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein Mextli
QOIG64	QOIG64_AEDAE	AAEL003056	chitinase-3-like protein 1
Q16EL4	Q16EL4_AEDAE	AAEL015110	venom dipeptidyl peptidase 4
Q16FF8	Q16FF8_AEDAE	AAEL014771	TBC1 domain family member 23
Q16V22	Q16V22_AEDAE	AAEL009721	inconnu
Q16K20	Q16K20_AEDAE	AAEL013147	uncharacterized LOC5577287
Q16KU6	Q16KU6_AEDAE	AAEL012864	uncharacterized LOC5576923
Q16ML5	Q16ML5_AEDAE	AAEL012267	CD109 antigen
Q16P32	Q16P32_AEDAE	AAEL011781	peroxisomal biogenesis factor 3
Q16QK7	Q16QK7_AEDAE	AAEL011251	pre-mRNA-splicing factor RBM22
Q1DH28	Q1DH28_AEDAE	AAEL015275	inconnu
Q16SE7	Q16SE7_AEDAE	AAEL010610	serine palmitoyltransferase 1
Q16SK5	Q16SK5_AEDAE	AAEL010565	forkhead box protein K2
Q16TF5	Q16TF5_AEDAE	AAEL010254	protein FAM98A
Q16TZ8	Q16TZ8_AEDAE	AAEL010073	nardilysin
Q16U78	Q16U78_AEDAE	AAEL010003	pre-mRNA-splicing factor SPF27
Q16W34	Q16W34_AEDAE	AAEL009356	uncharacterized protein C7orf50 homolog
Q16XV5	Q16XV5_AEDAE	AAEL008753	dynein assembly factor 1, axonemal homolog
Q16Y40	Q16Y40_AEDAE	AAEL008664	protein ABHD4
Q16Y94	Q16Y94_AEDAE	AAEL008620	37 kDa salivary gland allergen Aed a 2-like
Q16YQ4	Q16YQ4_AEDAE	AAEL008459	TATA element modulatory factor
Q16YX6	Q16YX6_AEDAE	AAEL008389	kinase D-interacting substrate of 220 kDa
Q16Z33	Q16Z33_AEDAE	AAEL008328	Krueppel homolog 2
Q16ZU8	Q16ZU8_AEDAE	AAEL008061	GPI ethanolamine phosphate transferase 1
Q170S3	Q170S3_AEDAE	AAEL007820	protein LSM12 homolog A
Q172B3	Q172B3_AEDAE	AAEL007469	mitotic checkpoint protein BUB3
Q172F4	Q172F4_AEDAE	AAEL007404	ras-interacting protein RIP3
Q172F6	Q172F6_AEDAE	AAEL007392	mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog
Q172Q7	Q172Q7_AEDAE	AAEL007298	putative fatty acyl-CoA reductase CG5065
Q174H2	Q174H2_AEDAE	AAEL006897	F-actin-methionine sulfoxide oxidase Mical
Q176G1	Q176G1_AEDAE	AAEL006367	vesicle transport protein SEC20
Q176Z1	Q176Z1_AEDAE	AAEL006221	TP53-regulating kinase
Q178Q7	Q178Q7_AEDAE	AAEL015592	inconnu
Q179D0	Q179D0_AEDAE	AAEL005667	inconnu
Q179D2	Q179D2_AEDAE	AAEL005666	matrix metalloproteinase-14
Q179V8	Q179V8_AEDAE	AAEL005481	uncharacterized family 31 glucosidase KIAA1161
Q17AX3	Q17AX3_AEDAE	AAEL005162	39S ribosomal protein L11, mitochondrial
Q17C79	Q17C79_AEDAE	AAEL004682	ceramide-1-phosphate transfer protein
Q17E30	Q17E30_AEDAE	AAEL003970	proton-coupled amino acid transporter-like protein pathetic
Q17FD5	Q17FD5_AEDAE	AAEL003412	carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 1

Q17FP9	Q17FP9_AEDAE	AAEL003325	Niemann-Pick C1 protein
Q17FX7	Q17FX7_AEDAE	AAEL003220	rho GTPase-activating protein 7
Q17G37	Q17G37_AEDAE	AAEL003190	uncharacterized LOC5577518
Q17H36	Q17H36_AEDAE	AAEL002804	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B
Q17I51	Q17I51_AEDAE	AAEL002493	retinol dehydrogenase 13
Q17IH6	Q17IH6_AEDAE	AAEL002322	uncharacterized LOC5574346
Q17IT0	Q17IT0_AEDAE	AAEL002272	YTH domain-containing protein 1
Q17IV6	Q17IV6_AEDAE	AAEL002232	ribonuclease P protein subunit p30
Q17J48	Q17J48_AEDAE	AAEL002176	uncharacterized protein C1683.06c
Q17KR7	Q17KR7_AEDAE	AAEL001541	conserved oligomeric Golgi complex subunit 6
Q17KZ7	Q17KZ7_AEDAE	AAEL001533	UDP-glucuronosyltransferase 2C1
Q17L00	Q17L00_AEDAE	AAEL001525	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA2
Q17L95	Q17L95_AEDAE	AAEL001405	AP-3 complex subunit sigma-2
Q17MJ7	Q17MJ7_AEDAE	AAEL000978	ESF1 homolog
Q17N04	Q17N04_AEDAE	AAEL000824	probable serine/threonine-protein kinase kinX
Q17N25	Q17N25_AEDAE	AAEL000832	cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1
Q17PR5	Q17PR5_AEDAE	AAEL000300	periodic tryptophan protein 2 homolog
Q17PZ3	Q17PZ3_AEDAE	AAEL000180	39S ribosomal protein L18, mitochondrial
Q1DH30	Q1DH30_AEDAE	AAEL015271	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

Tableau 16: Amorces utilisées pour l'analyse de l'expression de gènes en RT-qPCR.

nom gène ciblé	référence Uniprot	nom amorce	séquence amorce
YFV-NS3		YFV_NS3_For	GCGTAAGGCTGGAAAGAGTG
		YFV_NS3_Rev	CTTCTCCCTTCATCCACAA
GAPDH		GAPDH_For	GGTCGGAGTCAACGGATTTG
		GAPDH_Rev	ACTCCACGACGTACTCAGCG
RP49		RP49 For_A.ag	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA
		RP49 Rev_A.ag	TCATCAGCACCTCCAGCT
14-3-3 protein zeta	Q1HR36	Q1HR36_For	TCCCCAAAGCCAGTAATCCA
		Q1HR36_Rev	GACTGAGAAATTGAGCGCGA
calmoduline	Q1HQX3	Q1HQX3_For	GATGCGATCGTTAGGCCAGA
		Q1HQX3_Rev	GGAAATCGATCGTGCCGTTG
Cactus	Q17NG6	Q17NG6_For	ACTCCCGGGAAGGAAAATCC
		Q17NG6_Rev	CACTCGTCCAGCAGGAAGTT
Argonaute-2 (Ago-2)	C5J0H4	Ago2_F	TCAAGAGCTTCACATTGGAT
		Ago2_R	CCAACACGTGATTGGAACC
vATPV1B		vATPV1B_For	GGAACATCAAAGCAGGCAGC
		vATPV1B_Rev	GGTCTGTAGGTCAGTCGTGG
Cysteine Rich Venom Protein (CRVP)		CRVP_F1	TTTGCCATAGCCGTACCACC
		CRVP_R1	TCGAAAATGACTTGAAGTGTGGT
NEDD8 activating enzyme activity	Q170Z9	Q170Z9_For	TCGCCAGATTAGGTTGTGGG
		Q170Z9_Rev	ATGGTAAATCCTCCGACGCC
NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	Q16X16	Q16X16_For	AGCTGAATCTGCCAAGACC
		Q16X16_Rev	TAGGGCCGACCTGAAGTTA
nedd8-activating enzyme E1 catalytic subunit	Q16MG4	Q16MG4_For	GTTTCCACCGCAGGTAAGT
		Q16MG4_Rev	CCGTTCTTGAGCCTTCTCGT
glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	Q17DW3	Q17DW3_For	GCCGTACATAGACGCAGGTT
		Q17DW3_Rev	ACCAATTCGGTTTCAGCACT
serine/arginine-rich splicing factor 2	Q1HQW9	Q1HQW9_For	GGCTTTGCGTTTGTGAGATTC
		Q1HQW9_Rev	GAGAAGTGGGCCGTCCATAG
vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog	Q16SL9	Q16SL9_For	TCACTAGCGATCTGACCTGC
		Q16SL9_Rev	TGAGTTGTCGGAGCACTGTC
uncharacterized LOC5564842	Q17NP8	Q17NP8_For	GTAGGCTGTGCATCCTCGAA
		Q17NP8_Rev	TGCCGCTACAAAGTCCGAAT
probable trafficking protein particle complex subunit 13 homolog	Q17NV6	Q17NV6_For	ACCCGGATCAATTTGCCGAT
		Q17NV6_Rev	CAGACCAAAATGTGGGTTCCA
rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	Q175P2	Q175P2_FOR	CATATTCCAGGAGTGGCTGC
		Q175P2_REV	GAAGGGCAATCCTCCCTCAC
probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	Q17KK8	Q17KK8_FOR	GGCGCCAGTGAAAGGAAAATA
		Q17KK8_REV	TTCCCGGATATCTCGTTCGC
cAMP-dependent protein kinase type I regulatory subunit	Q17IR9	Q17IR9_FOR	ACTCCCTGTTTGCTTCGTG
		Q17IR9_REV	TTTGGCATTTCCTTTTGCTG

uncharacterized oxidoreductase dhs-27	Q172L7	Q172L7_FOR	CGATGGGGTGAACAACCTGA
		Q172L7_REV	AGATCCGGAAGAATGCTGGTG
nuclear pore complex protein Nup214	Q16FJ6	Q16FJ6_FOR	ATGTTACGGAAGTAAATTCACCCCT
		Q16FJ6_REV	AACACCAACCCGTGGACACT
endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	Q17IA3	Q17IA3_FOR	TGCTGTAGCGTTGGTAGCAT
		Q17IA3_REV	GGAATGTGTGCGTGACAAGG
intron-binding protein aquarius, spliceosome	Q16IB0	Q16IB0_For	ACCGAAGAAAAATACCATCCGC
		Q16IB0_Rev	GAGATGATTTGCACGGCCAC
tubulin-specific chaperone A	Q177G6	Q177G6_For	CGACGATCATGTCCTTCGCA
		Q177G6_Rev	AACGCCTTTGCCAATCTCCG
tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	Q17CU4	Q17CU4_For	GCATCTCACCGGTAACCACA
		Q17CU4_Rev	TGGACAAAGTGACCTAATGGGA
cytosolic iron-sulfur protein assembly protein Ciao1	Q17GR9	Q17GR9_For	GTGTGGGCAGTATCTGGCAT
		Q17GR9_Rev	CGTTGCACTCAAATTCACCTGAT
VPS39-like protein/vam6		VPS39_For	GCTGGATGTCGTGAAATCGAAAT
		VPS39_Rev	TGAACCCAACGCAAATGCAA
VPS8-like protein		VPS8_For	AACTGGACATCGAAGAGCTGG
		VPS8_Rev	GAAACGCTGTCCAGGTCACCTA

Tableau 17: Amorces utilisées pour la synthèse des ARNdb.

Les identifiants UniProt des protéines candidates sont indiqués, ainsi que la référence de la séquence de l'ARN messager utilisée pour la création des amorces avec l'outilE-RNAi. La taille de l'amplicon correspond à la taille du fragment d'ADN synthétisé par les 2 premières PCR (avec les promoteurs T7 de chaque côté, 2x20 pb) , la taille de l'ARNdb est aussi précisée.

nom protéine	référence Uniprot	séquence utilisée dans E-RNAi	nom amorce	séquence amorce	taille amplicon (pb)	taille ARNdb (pb)
eGFP			tag-eGFP_For	GCCCGACGCGGCAAGCTGACCCTGAAGTT	414	356
			tag-eGFP_Rev	CGCCTCGGCTTCTGCTTGTGCGCCATGAT		
T7-tag			T7tag_For	taatacgactcactatagggGCCCGACGC		
			T7tag_Rev	taatacgactcactatagggCGCCTCGGC		
14-3-3 protein zeta	Q1HR36	XM_021840307.1	tag-Q1HR36_For	GCCCGACGCGGCACAAGCGATGAAATCAG	313	273
			tag-Q1HR36_Rev	CGCCTCGGCTCTGGATTACTGGCTTTGGGG		
Calmoduline	Q1HQX3	XM_001662381.2	tag-Q1HQX3_For	GCCCGACGCTGATAAACGAAGTCGACGCGG	290	250
			tag-Q1HQX3_Rev	CGCCTCGGCCCATCGCCATCTATGTCTGGC		
Cactus	Q17NG6	XM_021848127.1, XM_001650217.3	T7_CACTUS_F	taatacgactcactatagggCGAGTCAGCAGAACCCGAGCAG	329	289
			T7_CACTUS_R	taatacgactcactatagggTGCCCGTTAGCACCGAAAG		
			T7_CACTUS_v2_F	taatacgactcactatagggATCCATCAAAGGAGGAGCG	465	425
			T7_CACTUS_v2_R	taatacgactcactatagggGTCGTCTGTTCTGGTGGAAGTA		
Argonaute-2 (Ago-2)	C5J0H4		T7_AGO2_F	taatacgactcactatagggCAGTTC AAGCAGACGAACCA	539	499
			T7_dsAGO2_R	taatacgactcactatagggTGATGTAGACGCGTCCTCTG		
vATPV1B		XM_001651408.2	T7_vATPV1B_For	taatacgactcactatagggTCTGATGAAGTCTGCCATCG	465	425
			T7_vATPV1B_Rev	taatacgactcactatagggTGCTAGAAGGGACAGCAACA		
Cysteine Rich Venom Protein (CRVP)		XM_001655445	T7_CRVP_For	taatacgactcactatagggGCGCTAATCTACACTTGCGTT	414	374
			T7_CRVP_Rev	taatacgactcactatagggTAATTCATCTCCGCTTCCTAGC		
			T7_CRVP_v2_For	taatacgactcactatagggCTTTTGCAGTGGACCCAAC	314	274
			T7_CRVP_v2_Rev	taatacgactcactatagggTGGTCTGACAATGGGTGGTA		
NEDD8 activating enzyme activity	Q170Z9	AAEL007738 (Exon 3)	T7_Q170Z9_For	taatacgactcactatagggGCAATGCCTTTTGGATTCTG	353	313
			T7_Q170Z9_Rev	taatacgactcactatagggGCCTTATCGTATTCATCGGC		

NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	Q16X16	AAEL009026 (3'-UTR)	T7_Q16X16_b_For	taatacgactcactatagggCGGCCCTAATTATCCCCAT	298	258
			T7_Q16X16_b_Rev	taatacgactcactatagggATCGCCTTGAACACGTTGTG		
nedd8-activating enzyme E1 catalytic subunit	Q16MG4	AAEL012306	T7_Q16MG4_For	taatacgactcactatagggGGTCTCTCGTACCGGCTG	411	371
			T7_Q16MG4_Rev	taatacgactcactatagggGTCGCCATGTAGAGCGTTTT		
glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	Q17DW3	AAEL004027	T7_Q17DW3_For	taatacgactcactatagggGCCTAATGGATGTTTCTGGC	244	204
			T7_Q17DW3_Rev	taatacgactcactatagggCCTCCGTTTGAATCAGCAAT		
serine/arginine-rich splicing factor 2	Q1HQW9	AAEL010340	T7_Q1HQW9_For	taatacgactcactatagggAAAAACGCAGCGAAAACAAC	309	269
			T7_Q1HQW9_Rev	taatacgactcactatagggCTGCAAAAGTTTGC GGTTTT		
vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog	Q16SL9	AAEL010559	T7_Q16SL9_For	taatacgactcactatagggGCCCCAAAAGATCTCCGATA	433	393
			T7_Q16SL9_Rev	taatacgactcactatagggCTGGGCTTGAAGTCATCTT		
		XM_001660865.2	T7_Q16SL9_v2_For	taatacgactcactatagggGAACCTGTTCCGGGATGTC	447	407
			T7_Q16SL9_v2_Rev	taatacgactcactatagggCGCTCCCATGCTGAACTT		
			T7_Q16SL9_v3_For	taatacgactcactatagggTACCAGAAAACGCCTCTACGG		
T7_Q16SL9_v3_Rev	taatacgactcactatagggCAGCTGCCCGATCAAATTAT					
uncharacterized LOC5564842	Q17NP8	AAEL000624	T7_Q17NP8_For	taatacgactcactatagggCGCGCGGGTATAGATACATT	399	359
			T7_Q17NP8_Rev	taatacgactcactatagggTCTGCTTGATGTTTGTATGTGC		
probable trafficking protein particle complex subunit 13 homolog	Q17NV6	AAEL000579	T7_Q17NV6_For	taatacgactcactatagggTGGTGATCTCCGATTGACTG	395	355
			T7_Q17NV6_Rev	taatacgactcactatagggTTGAAAGTCGTCTCTTGGT		
rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	Q175P2	AAEL006591	T7_Q175P2_For	taatacgactcactatagggGCGAAAACCTGGATCAGCAAT	399	359
			T7_Q175P2_Rev	taatacgactcactatagggAAGATAAGGTCCGTCAGCGA		
probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	Q17KK8	AAEL001657	T7_Q17KK8_For	taatacgactcactatagggTTCTACGGGGTCTTTTGAA	466	426
			T7_Q17KK8_Rev	taatacgactcactatagggGATCGATCTTTGGAAGCGAT		
cAMP-dependent protein kinase type I regulatory subunit	Q17IR9	AAEL002277	T7_Q17IR9_For	taatacgactcactatagggCTATGCGCGGACATTCTCA	403	363
			T7_Q17IR9_Rev	taatacgactcactatagggCAAAAAGCATTGTTTGCTGAA		
uncharacterized oxidoreductase dhs-27	Q172L7	AAEL007335	T7_Q172L7_For	taatacgactcactatagggTTCTATTTCAAACGACCCG	447	407
			T7_Q172L7_Rev	taatacgactcactatagggTGGCAGTACGACTTGAGCAG		
nuclear pore complex protein Nup214	Q16FJ6	AAEL014733	T7_Q16FJ6_For	taatacgactcactatagggGGGGCATTAGTACCCCTAC	414	374
			T7_Q16FJ6_Rev	taatacgactcactatagggGATGCGTTCTATCGCCAAC		

endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	Q17IA3	AAEL002432	T7_Q17IA3_For	taatacgactcactatagggCAGAAGCACCTCCCGAAAC	298	258
			T7_Q17IA3_Rev	taatacgactcactatagggTTATGTTCCATGGTCCACTCG		
intron-binding protein aquarius, spliceosome	Q16IB0	AAEL013736	T7_Q16IB0_For	taatacgactcactatagggCGTTGACCGATCACGACAT	254	214
			T7_Q16IB0_Rev	taatacgactcactatagggAGCTCTTCCGGTACCAAGTTC		
tubulin-specific chaperone A	Q177G6	XM_001657475.2 (Exon 2)	T7_Q177G6_For	taatacgactcactatagggATGTCCACTCTACCGTTTTTCG	396	356
			T7_Q177G6_Rev	taatacgactcactatagggTGATCAGAATCGTTCAAGCG		
tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	Q17CU4	AAEL004440	T7_Q17CU4_For	taatacgactcactatagggTGACCAAAAGCATTAGCAGC	532	492
			T7_Q17CU4_Rev	taatacgactcactatagggTCCTTCTTCGCATTTACAAA		
cytosolic iron-sulfur protein assembly protein Ciao1	Q17GR9	XM_001662630.2	T7_Q17GR9_For	taatacgactcactatagggTGAGTCCACTGTTTGAGCA	489	449
			T7_Q17GR9_Rev	taatacgactcactatagggAGCAGACGGCTTCTGGTTAC		
VPS39-like protein/vam6		XM_001652337.2, XM_021849452.1	T7_VPS39_For	taatacgactcactatagggGTTGGAGTGAACCTTCCAG	626	586
			T7_VPS39_Rev	taatacgactcactatagggCGCAGACTGTATCGAATTTCC		
VPS8-like protein		XM_001659212.2	T7_VPS8_For	taatacgactcactatagggAGACAATACCCGACTGCTGG	589	549
			T7_VPS8_Rev	taatacgactcactatagggGATATCCGTCCGTTGCAATA		

Tableau 18: Amorces utilisées pour amplifier le génome des virus YFV en 3 fragments d'environ 3000 pb chacun.

fragment	sens	localisation	sequence	Tm (°C)	taille fragment (pb)	origine
a	For	17D-1-2005F	AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTG	61,9	3725	Beck et al., 2014
	Rev	17D-1749-3725R	TTGAAAAGGCAGCAATCAACGC	58,4		
b	For	17D-3498-5506F	GGGTTACAGCTGGAGAAATACATGC	63,0	3781	Beck et al., 2014
	Rev	17D-5249-7278R	TGCTGCGCTTTGATTCCAGGTA	60,3		
c(1) / c(2)	For	17D-6900-9100F	TGCTGGAGAAAACCAAAGAGGA	58,4		Beck et al., 2014
c(1)	Rev	17D-10773-10752	GGTCTTCCCTGGCGTCAATA	59,8	3874	Primer Blast
c(2)	Rev	17D-10789-10770	AAGCAGAGAACCCTCCGGT	59,4	3891	

Bibliographie

- Achee, N.L., Gould, F., Perkins, T.A., Reiner, R.C., Morrison, A.C., Ritchie, S.A., Gubler, D.J., Teyssou, R., Scott, T.W., 2015. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003655. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003655>
- Agius, C., Eamens, A.L., Millar, A.A., Watson, J.M., Wang, M.-B., 2012. RNA Silencing and Antiviral Defense in Plants. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 17–38. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-882-5_2
- Alfaro-Tolosa, P., Clouet-Huerta, D.E., Rodríguez-Morales, A.J., 2015. Chikungunya, the emerging migratory rheumatism. *Lancet Infect. Dis.* 15, 510–512. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70160-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70160-X)
- Amaku, M., Coutinho, F.A.B., Massad, E., 2011. Why dengue and yellow fever coexist in some areas of the world and not in others? *Biosystems* 106, 111–120. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMS.2011.07.004>
- Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E., Prydz, H., 2003. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* 31, 589–95.
- American Association for the Advancement of Science, 1899. The *Bacillus icteroides* as the cause of yellow fever. *Science* (80-). 10, 379–80. <https://doi.org/10.1126/science.10.246.379>
- Amorim, J.H., Alves, R.P. dos S., Boscardin, S.B., Ferreira, L.C. de S., 2014. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Res.* 181, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.001>
- Andersson, N., Nava-Aguilera, E., Arosteguí, J., Morales-Perez, A., Suazo-Laguna, H., Legorreta-Soberanis, J., Hernandez-Alvarez, C., Fernandez-Salas, I., Paredes-Solís, S., Balmaseda, A., Cortés-Guzmán, A.J., Serrano de Los Santos, R., Coloma, J., Ledogar, R.J., Harris, E., 2015. Evidence based community mobilization for dengue prevention in Nicaragua and Mexico (Camino Verde, the Green Way): cluster randomized controlled trial. *BMJ* 351, h3267. <https://doi.org/10.1136/bmj.h3267>
- Angelini, P., Finarelli, A.C., Silvi, G., Borrini, B.M., Frasca, G., Mattivi, A., Massimiliani, E., Po, C., Angelini, R., Venturelli, C., Macini, P., 2008. [Chikungunya emergency in Emilia-Romagna: learning through experience]. *Epidemiol. Prev.* 32, 258–63.
- Angleró-Rodríguez, Y.I., MacLeod, H.J., Kang, S., Carlson, J.S., Jupatanakul, N., Dimopoulos, G., 2017. *Aedes aegypti* Molecular Responses to Zika Virus: Modulation of Infection by the Toll and Jak/Stat Immune Pathways and Virus Host Factors. *Front. Microbiol.* 8, 2050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02050>
- Appassakij, H., Khuntikij, P., Kemapunmanus, M., Wutthanarungsan, R., Silpapojakul, K., 2013. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? *Transfusion* 53, 2567–2574. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03960.x>
- Ashraf, U., Ye, J., Ruan, X., Wan, S., Zhu, B., Cao, S., Ashraf, U., Ye, J., Ruan, X., Wan, S., Zhu, B., Cao, S., 2015. Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe. *Viruses* 7, 219–238. <https://doi.org/10.3390/v7010219>
- Avadhanula, V., Weasner, B.P., Hardy, G.G., Kumar, J.P., Hardy, R.W., 2009. A Novel System for the Launch of Alphavirus RNA Synthesis Reveals a Role for the Imd Pathway in Arthropod Antiviral Response. *PLoS Pathog.* 5, e1000582. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000582>

- Balderhaar, H.J. kleine, Ungermann, C., 2013. CORVET and HOPS tethering complexes – coordinators of endosome and lysosome fusion. *J. Cell Sci.* 126, 1307–1316. <https://doi.org/10.1242/jcs.064576>
- Barillas-Mury, C., Han, Y.S., Seeley, D., Kafatos, F.C., 1999. Anopheles gambiae Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* 18, 959–67. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.959>
- Barletta, A.B.F., Nascimento-Silva, M.C.L., Talyuli, O.A.C., Oliveira, J.H.M., Pereira, L.O.R., Oliveira, P.L., Sorgine, M.H.F., 2017. Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in Aedes aegypti. *Parasit. Vectors* 10, 103. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2040-9>
- Barletta, A.B.F., Silva, M.C.L.N., Sorgine, M.H.F., 2012. Validation of Aedes aegypti Aag-2 cells as a model for insect immune studies. *Parasites and Vectors* 5, 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-148>
- Barrett, A.D., Teuwen, D.E., 2009. Yellow fever vaccine — how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr. Opin. Immunol.* 21, 308–313. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2009.05.018>
- Barrett, A.D.T., 2018. The reemergence of yellow fever. *Science (80-.)*. 361, 847–848. <https://doi.org/10.1126/science.aau8225>
- Barrett, A.D.T., 2016. Yellow Fever in Angola and Beyond — The Problem of Vaccine Supply and Demand. *N. Engl. J. Med.* 375, 301–303. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1606997>
- Barrett, A.D.T., 2012. Yellow fever vaccine chapter, *Vaccines* 6th Ed.
- Barrett, A.D.T., Higgs, S., 2007. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 209–229. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091454>
- Bauer, J.H., Hudson, N.P., 1928. The Incubation Period Of Yellow Fever In The Mosquito. *J. Exp. Med.* 48, 147–153.
- Beck, A., Guzman, H., Li, L., Ellis, B., Tesh, R.B., Barrett, A.D.T., 2013. Phylogeographic Reconstruction of African Yellow Fever Virus Isolates Indicates Recent Simultaneous Dispersal into East and West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e1910. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001910>
- Beck, A., Tesh, R.B., Wood, T.G., Widen, S.G., Ryman, K.D., Barrett, A.D.T., 2014. Comparison of the live attenuated yellow fever vaccine 17D-204 strain to its virulent parental strain asibi by deep sequencing. *J. Infect. Dis.* 209, 334–344. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit546>
- Behura, S.K., Gomez-Machorro, C., deBruyn, B., Lovin, D.D., Harker, B.W., Romero-Severson, J., Mori, A., Severson, D.W., 2014. Influence of mosquito genotype on transcriptional response to dengue virus infection. *Funct. Integr. Genomics* 14, 581–589. <https://doi.org/10.1007/s10142-014-0376-1>
- Behura, S.K., Gomez-Machorro, C., Harker, B.W., deBruyn, B., Lovin, D.D., Hemme, R.R., Mori, A., Romero-Severson, J., Severson, D.W., 2011. Global Cross-Talk of Genes of the Mosquito Aedes aegypti in Response to Dengue Virus Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1385. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001385>
- Benchimol, J., 2013. How Brazil joined the quest for a yellow fever vaccine. Interview by Claudia Jurberg and Julia D’Aloisio. *Bull. World Health Organ.* 91, 165–6. <https://doi.org/10.2471/BLT.13.030313>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* <https://doi.org/10.2307/2346101>
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R.W., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J., Hay, S.I., 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>

- Birmingham, A., Anderson, E.M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W.S., Khvorova, A., 2006. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods* 3, 199–204. <https://doi.org/10.1038/nmeth854>
- Blair, C.D., Olson, K.E., 2015. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses* 7, 820–843. <https://doi.org/10.3390/v7020820>
- Blair, C.D., Olson, K.E., 2014. Mosquito immune responses to arbovirus infections. *Curr. Opin. Insect Sci.* 3, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.005>
- Bonizzoni, M., Dunn, W.A., Campbell, C.L., Olson, K.E., Dimon, M.T., Marinotti, O., James, A.A., 2011. RNA-seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics* 12, 82. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-82>
- Bonizzoni, M., Dunn, W.A., Campbell, C.L., Olson, K.E., Marinotti, O., James, A.A., 2012. Complex Modulation of the *Aedes aegypti* Transcriptome in Response to Dengue Virus Infection. *PLoS One* 7, e50512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050512>
- Bowers, D.F., Abell, B.A., Brown, D.T., 1995. Replication and Tissue Tropism of the Alphavirus Sindbis in the Mosquito *Aedes albopictus*. *Virology* 212, 1–12. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1995.1447>
- Brackney, D.E., 2017. Implications of autophagy on arbovirus infection of mosquitoes. *Curr. Opin. Insect Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.001>
- Brasil, P., Calvet, G.A., Siqueira, A.M., Wakimoto, M., de Sequeira, P.C., Nobre, A., Quintana, M. de S.B., Mendonça, M.C.L. de, Lupi, O., de Souza, R.V., Romero, C., Zogbi, H., Bressan, C. da S., Alves, S.S., Lourenço-de-Oliveira, R., Nogueira, R.M.R., Carvalho, M.S., de Filippis, A.M.B., Jaenisch, T., 2016. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004636. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004636>
- Bredenbeek, P.J., Kooi, E.A., Lindenbach, B., Huijckman, N., Rice, C.M., Spaan, W.J.M., 2003. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J. Gen. Virol.* 84, 1261–1268. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18860-0>
- Brown, J.E., Evans, B.R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., Zhao, H., Caccone, A., Powell, J.R., 2014. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution* 68, 514–25. <https://doi.org/10.1111/evo.12281>
- Burkard, C., Verheije, M.H., Wicht, O., van Kasteren, S.I., van Kuppeveld, F.J., Haagmans, B.L., Pelkmans, L., Rottier, P.J.M., Bosch, B.J., de Haan, C.A.M., 2014. Coronavirus Cell Entry Occurs through the Endo-/Lysosomal Pathway in a Proteolysis-Dependent Manner. *PLoS Pathog.* 10, e1004502. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004502>
- Câmara, F.P., Gomes, A.L.B.B., Carvalho, L.M.F. de, Castello, L.G.V., 2011. Dynamic behavior of sylvatic yellow fever in Brazil (1954-2008). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 297–299. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000024>
- Campbell, C.L., Harrison, T., Hess, A.M., Ebel, G.D., 2014. MicroRNA levels are modulated in *Aedes aegypti* after exposure to Dengue-2. *Insect Mol. Biol.* 23, 132–9. <https://doi.org/10.1111/imb.12070>
- Campbell, C.L., Keene, K.M., Brackney, D.E., Olson, K.E., Blair, C.D., Wilusz, J., Foy, B.D., 2008. *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. *BMC Microbiol.* 8, 47. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-47>
- Campi-Azevedo, A.C., de Almeida Estevam, P., Coelho-dos-Reis, J.G., Peruhype-Magalhães, V., Villela-Rezende, G., Quaresma, P.F., Maia, M. de L.S., Farias, R.H.G., Camacho, L.A.B., Freire, M. da S.,

- Galler, R., Yamamura, A.M.Y., Almeida, L.F.C., Lima, S.M.B., Nogueira, R.M.R., Silva Sá, G.R., Hokama, D.A., de Carvalho, R., Freire, R.A.V., Filho, E.P., Leal, M. da L.F., Homma, A., Teixeira-Carvalho, A., Martins, R.M., Martins-Filho, O.A., 2014. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. *BMC Infect. Dis.* 14, 391. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-391>
- Carbajo, A.E., Cardo, M., Vezzani, D., 2018. Past, present and future of *Aedes aegypti* in its South American southern distribution fringe: What do temperature and population tell us? *Acta Trop.* <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2018.11.017>
- Carette, J.E., Raaben, M., Wong, A.C., Herbert, A.S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., Kuehne, A.I., Kranzusch, P.J., Griffin, A.M., Ruthel, G., Cin, P.D., Dye, J.M., Whelan, S.P., Chandran, K., Brummelkamp, T.R., 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1. *Nature* 477, 340–343. <https://doi.org/10.1038/nature10348>
- Carissimo, G., Pondeville, E., McFarlane, M., Dietrich, I., Mitri, C., Bischoff, E., Antoniewski, C., Bourgouin, C., Failloux, A.-B., Kohl, A., Vernick, K.D., 2015a. Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E176–E185. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412984112>
- Carissimo, G., Pondeville, E., McFarlane, M., Dietrich, I., Mitri, C., Bischoff, E., Antoniewski, C., Bourgouin, C., Failloux, A.-B., Kohl, A., Vernick, K.D., 2015b. Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E176–E185. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412984112>
- Carlin, A.F., Vizcarra, E.A., Branche, E., Viramontes, K.M., Suarez-Amaran, L., Ley, K., Heinz, S., Benner, C., Shresta, S., Glass, C.K., 2018. Deconvolution of pro- and antiviral genomic responses in Zika virus-infected and bystander macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E9172–E9181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807690115>
- Carnec, X., Mateo, M., Page, A., Reynard, S., Hortion, J., Picard, C., Yekwa, E., Barrot, L., Barron, S., Vallve, A., Raoul, H., Carbonnelle, C., Ferron, F., Baize, S., 2018. A Vaccine Platform against Arenaviruses Based on a Recombinant Hyperattenuated Mopeia Virus Expressing Heterologous Glycoproteins. *J. Virol.* 92. <https://doi.org/10.1128/JVI.02230-17>
- Carnec, X., Meertens, L., Dejarnac, O., Perera-Lecoin, M., Hafirassou, M.L., Kitaura, J., Ramdasi, R., Schwartz, O., Amara, A., 2016. The Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Receptor CD300a Binds Dengue Virus and Enhances Infection. *J. Virol.* 90, 92–102. <https://doi.org/10.1128/JVI.01849-15>
- Carrington, L.B., Leslie, J., Weeks, A.R., Hoffmann, A.A., 2009. The popcorn wolbachia infection of *drosophila melanogaster*: Can selection alter wolbachia longevity effects? *Evolution (N. Y.)* 63, 2648–2657. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00745.x>
- Carrington, L.B., Tran, B.C.N., Le, N.T.H., Luong, T.T.H., Nguyen, T.T., Nguyen, P.T., Nguyen, C.V.V., Nguyen, H.T.C., Vu, T.T., Vo, L.T., Le, D.T., Vu, N.T., Nguyen, G.T., Luu, H.Q., Dang, A.D., Hurst, T.P., O’Neill, S.L., Tran, V.T., Kien, D.T.H., Nguyen, N.M., Wolbers, M., Wills, B., Simmons, C.P., 2018. Field- and clinically derived estimates of Wolbachia-mediated blocking of dengue virus transmission potential in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 361–366. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715788115>
- Carson, R., 1962. *silent spring*. Penguin.
- Carter, H.R., 1931. Yellow fever: an epidemiological and historical study of its place of origin. *J. Am. Med. Assoc.* 97.
- Carter, H.R., 1900. A note on the interval between infecting and secondary cases of yellow fever from the records of the yellow fever at Orwood and Taylor, Mississippi in 1898. *New Orleans Med. Surg. J.* 52, 617–636.

- Carvalho, D.O., McKemey, A.R., Garziera, L., Lacroix, R., Donnelly, C.A., Alphey, L., Malavasi, A., Capurro, M.L., 2015. Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003864. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003864>
- Carvalho, R.G., Lourenço-De-Oliveira, R., Braga, I.A., 2014. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 787–796. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140304>
- CDC, 2018. Arbovirus Catalog - CDC Division of Vector-Borne Diseases (DVBD) [WWW Document]. URL <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/VirusBrowser.aspx> (accessed 11.23.18).
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R., Rice, C.M., 1990. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 649–688. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245>
- Charif, D., Lobry, J.R., 2007. Seqin{R} 1.0-2: a contributed package to the {R} project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis., in: Bastolla, U., Porto, M., Roman, H.E., Vendruscolo, M. (Eds.), *Structural Approaches to Sequence Evolution: Molecules, Networks, Populations, Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*. Springer Verlag, New York, pp. 207–232.
- Chastel, C., 2005. [Chikungunya virus: its recent spread to the southern Indian Ocean and Reunion Island (2005-2006)]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 189, 1827–35.
- Chauhan, C., Behura, S.K., DeBruyn, B., Lovin, D.D., Harker, B.W., Gomez-Machorro, C., Mori, A., Romero-Severson, J., Severson, D.W., 2012. Comparative Expression Profiles of Midgut Genes in Dengue Virus Refractory and Susceptible *Aedes aegypti* across Critical Period for Virus Infection. *PLoS One* 7, e47350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047350>
- Chaves-Carballo, E., 2005. Carlos Finlay and yellow fever: triumph over adversity. *Mil. Med.* 170, 881–5.
- Chejanovsky, N., Ophir, R., Schwager, M.S., Slabezki, Y., Grossman, S., Cox-Foster, D., 2014. Characterization of viral siRNA populations in honey bee colony collapse disorder. *Virology* 454–455, 176–83. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.012>
- Ciota, A.T., Chin, P.A., Ehrbar, D.J., Micieli, M.V., Fonseca, D.M., Kramer, L.D., 2018. Differential effects of temperature and mosquito genetics determine transmissibility of arboviruses by *Aedes aegypti* in Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 99, 417–424. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0097>
- Cleaves, G.R., Dubin, D.T., 1979. Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology* 96, 159–65.
- Clements, A.N., 1996. Adult salivary glands and their secretions. In *The Biology of Mosquitoes*. London, UK.
- Clements, A.N., Harbach, R.E., 2017. History of the discovery of the mode of transmission of yellow fever virus. *J. Vector Ecol.* 42, 208–222. <https://doi.org/10.1111/jvec.12261>
- Clyde, K., Kyle, J.L., Harris, E., 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.* 80, 11418–31. <https://doi.org/10.1128/JVI.01257-06>
- Cokelaer, T., Desvillechabrol, D., Legendre, R., Cardon, M., 2017. Sequana': a Set of Snakemake NGS pipelines. *J. Open Source Softw.* 2, 352. <https://doi.org/10.21105/joss.00352>
- Colpitts, T.M., Cox, J., Vanlandingham, D.L., Feitosa, F.M., Cheng, G., Kurscheid, S., Wang, P., Krishnan, M.N., Higgs, S., Fikrig, E., 2011. Alterations in the *Aedes aegypti* Transcriptome during Infection with West Nile, Dengue and Yellow Fever Viruses. *PLoS Pathog.* 7, e1002189. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002189>

- Corver, J., Lenches, E., Smith, K., Robison, R.A., Sando, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H., 2003. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J. Virol.* 77, 2265–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.3.2265-2270.2003>
- Couto-Lima, D., Madec, Y., Bersot, M.I., Campos, S.S., Motta, M. de A., Dos Santos, F.B., Vazeille, M., Da Costa Vasconcelos, P.F., Lourenço-De-Oliveira, R., Failloux, A.B., 2017. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci. Rep.* 7, 4848. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05186-3>
- D’Ortenzio, E., Matheron, S., de Lamballerie, X., Hubert, B., Piorkowski, G., Maquart, M., Descamps, D., Damond, F., Yazdanpanah, Y., Leparç-Goffart, I., 2016. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* 374, 2195–2198. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1604449>
- Da Costa Vasconcelos, P.F., 2003. Febre amarela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 275–293. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000200012>
- Dame, D.A., Curtis, C.F., Benedict, M.Q., Robinson, A.S., Knols, B.G.J., 2009. Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malar. J.* 8 Suppl 2, S2. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-S2-S2>
- Das, S., Ghosal, S., Chakrabarti, J., Kozak, K., 2013. SeedSeq: Off-target transcriptome database. *Biomed Res. Int.* 2013, 905429. <https://doi.org/10.1155/2013/905429>
- Davis, N.C., Lloyd, W., Frobisher, M., Jr., 1932. The Transmission Of Neurotropic Yellow Fever Virus By *Stegomyia* Mosquitoes. *J. Exp. Med.* 56, 853–65.
- Delaporte, F., 1989. L’histoire de la fièvre jaune. Naissance de la médecine tropicale.
- Dickson, L.B., Sanchez-Vargas, I., Sylla, M., Fleming, K., Black, W.C., 2014. Vector Competence in West African *Aedes aegypti* Is Flavivirus Species and Genotype Dependent. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3153. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003153>
- Dietrich, I., Jansen, S., Fall, G., Lorenzen, S., Rudolf, M., Huber, K., Heitmann, A., Schicht, S., Ndiaye, E.H., Watson, M., Castelli, I., Brennan, B., Elliott, R.M., Diallo, M., Sall, A.A., Failloux, A.-B., Schnettler, E., Kohl, A., Becker, S.C., 2017. RNA Interference Restricts Rift Valley Fever Virus in Multiple Insect Systems. *mSphere* 2, e00090-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00090-17>
- Ding, J., Chou, Y.-Y., Chang, T.L., 2009. Defensins in viral infections. *J. Innate Immun.* 1, 413–20. <https://doi.org/10.1159/000226256>
- Dissanayake, S.N., Ribeiro, J.M., Wang, M.-H., Dunn, W.A., Yan, G., James, A.A., Marinotti, O., 2010. aeGEPUCI: a database of gene expression in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Res. Notes* 3, 248. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-248>
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dong, S., Behura, S.K., Franz, A.W.E., 2017. The midgut transcriptome of *Aedes aegypti* fed with saline or protein meals containing chikungunya virus reveals genes potentially involved in viral midgut escape. *BMC Genomics* 18, 382. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3775-6>
- Dong, S., Kantor, A.M., Lin, J., Passarelli, A.L., Clem, R.J., Franz, A.W.E., 2016. Infection pattern and transmission potential of chikungunya virus in two New World laboratory-adapted *Aedes aegypti* strains. *Sci. Rep.* 6, 24729. <https://doi.org/10.1038/srep24729>
- Dong, Y., Taylor, H.E., Dimopoulos, G., 2006. AgDscam, a Hypervariable Immunoglobulin Domain-Containing Receptor of the *Anopheles gambiae* Innate Immune System. *PLoS Biol.* 4, e229. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040229>
- Dorigatti, I., McCormack, C., Nedjati-Gilani, G., Ferguson, N.M., 2018. Using *Wolbachia* for Dengue

- Control: Insights from Modelling. *Trends Parasitol.* 34, 102–113. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2017.11.002>
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Imler, J.-L., 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat. Immunol.* 6, 946–953. <https://doi.org/10.1038/ni1237>
- Douam, F., Ploss, A., 2018. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol.* 26, 913–928. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.05.012>
- Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A.J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B.J., Fischer, M., Hayes, E.B., 2009. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360, 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Duong, V., Lambrechts, L., Paul, R.E., Ly, S., Lay, R.S., Long, K.C., Huy, R., Tarantola, A., Scott, T.W., Sakuntabhai, A., Buchy, P., 2015. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 14688–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508114112>
- Dutta, D., Dobson, A.J., Houtz, P.L., Gläßer, C., Revah, J., Korzelius, J., Patel, P.H., Edgar, B.A., Buchon, N., 2015. Regional Cell-Specific Transcriptome Mapping Reveals Regulatory Complexity in the Adult *Drosophila* Midgut. *Cell Rep.* 12, 346–358. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.06.009>
- Dutta, D., Xiang, J., Edgar, B.A., 2013. RNA Expression Profiling from FACS-Isolated Cells of the *Drosophila* Intestine. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* 27, 2F.2.1-2F.2.12. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc02f02s27>
- ECDC, 2018. *Aedes albopictus* - current known distribution: January 2018 [WWW Document]. *Eur. Cent. Dis. Prev. Control*. URL <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-june-2018> (accessed 11.25.18).
- Eckert, J., 1993. In the days of the epidemic: the 1793 yellow fever outbreak in Philadelphia as seen by physicians. *Trans. Stud. Coll. Physicians Phila.* 15, 31–8.
- Edgil, D., Polacek, C., Harris, E., 2006. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. *J. Virol.* 80, 2976–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.6.2976-2986.2006>
- EFSA, 2018. Peste porcine africaine | Autorité européenne de sécurité des aliments [WWW Document]. URL <https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/african-swine-fever> (accessed 11.25.18).
- Elena, S.F., Sanjuan, R., 2005. Adaptive Value of High Mutation Rates of RNA Viruses: Separating Causes from Consequences. *J. Virol.* 79, 11555–11558. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11555-11558.2005>
- Eng, M.W., van Zuylen, M.N., Severson, D.W., 2016. Apoptosis-related genes control autophagy and influence DENV-2 infection in the mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 76, 70–83. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2016.07.004>
- Engelmann, F., Josset, L., Girke, T., Park, B., Barron, A., Dewane, J., Hammarlund, E., Lewis, A., Axthelm, M.K., Slifka, M.K., Messaoudi, I., 2014. Pathophysiologic and Transcriptomic Analyses of Viscerotropic Yellow Fever in a Rhesus Macaque Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3295. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003295>
- Espinosa, M., 2009. Epidemic Invasions: Yellow Fever and the Limits of Cuban Independence.
- Etebari, K., Hegde, S., Saldaña, M.A., Widen, S.G., Wood, T.G., Asgari, S., Hughes, G.L., Fernandez-Sesma, A., 2017. Global Transcriptome Analysis of *Aedes aegypti* Mosquitoes in Response to Zika Virus Infection. *mSphere* 2, e00456-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00456-17>

- Famakinde, D.O., 2018. Treading the Path towards Genetic Control of Snail Resistance to Schistosome Infection. *Trop. Med. Infect. Dis.* 3. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3030086>
- Faria, N.R., Kraemer, M.U.G., Hill, S.C., Goes de Jesus, J., Aguiar, R.S., Iani, F.C.M., Xavier, J., Quick, J., du Plessis, L., Dellicour, S., Thézé, J., Carvalho, R.D.O., Baele, G., Wu, C.-H., Silveira, P.P., Arruda, M.B., Pereira, M.A., Pereira, G.C., Lourenço, J., Obolski, U., Abade, L., Vasylyeva, T.I., Giovanetti, M., Yi, D., Weiss, D.J., Wint, G.R.W., Shearer, F.M., Funk, S., Nikolay, B., Fonseca, V., Adelino, T.E.R., Oliveira, M.A.A., Silva, M.V.F., Sacchetto, L., Figueiredo, P.O., Rezende, I.M., Mello, E.M., Said, R.F.C., Santos, D.A., Ferraz, M.L., Brito, M.G., Santana, L.F., Menezes, M.T., Brindeiro, R.M., Tanuri, A., Dos Santos, F.C.P., Cunha, M.S., Nogueira, J.S., Rocco, I.M., da Costa, A.C., Komninakis, S.C. V, Azevedo, V., Chieppe, A.O., Araujo, E.S.M., Mendonça, M.C.L., Dos Santos, C.C., Dos Santos, C.D., Mares-Guia, A.M., Nogueira, R.M.R., Sequeira, P.C., Abreu, R.G., Garcia, M.H.O., Abreu, A.L., Okumoto, O., Kroon, E.G., de Albuquerque, C.F.C., Lewandowski, K., Pullan, S.T., Carroll, M., de Oliveira, T., Sabino, E.C., Souza, R.P., Suchard, M.A., Lemey, P., Trindade, G.S., Drumond, B.P., Filippis, A.M.B., Loman, N.J., Cauchemez, S., Alcantara, L.C.J., Pybus, O.G., 2018. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 361, 894–899. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115>
- Fernandez-Garcia, M.D., Meertens, L., Chazal, M., Hafirassou, M.L., Dejarnac, O., Zamborlini, A., Despres, P., Sauvonnnet, N., Arenzana-Seisdedos, F., Jouvenet, N., Amara, A., 2016. Vaccine and Wild-Type Strains of Yellow Fever Virus Engage Distinct Entry Mechanisms and Differentially Stimulate Antiviral Immune Responses. *MBio* 7, e01956-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01956-15>
- Ferreira, Á.G., Naylor, H., Esteves, S.S., Pais, I.S., Martins, N.E., Teixeira, L., 2014. The Toll-dorsal pathway is required for resistance to viral oral infection in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 10, e1004507. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004507>
- Findlay, G.M., 1948. John Williams and the early history of yellow fever. *Br. Med. J.* 2, 474–6.
- Finlay, C., 1886. Yellow fever: its transmission by means of the *Culex* mosquito. *Am. J. Med. Sci.* 92, 395–409.
- Finlay, C., 1881. El mosquito hipoteticamente considerado como agente de trasmision de la fiebre amarilla. *An. Real Acad. Cienc. Méd. Fis. Nat. Habana* 18, 147–169.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fontenille, D., Diallo, M., Mondo, M., Ndiaye, M., Thonnon, J., 1997. First evidence of natural vertical transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti*, its epidemic vector. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 533–535. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(97\)90013-4](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(97)90013-4)
- Fontes-Garfias, C.R., Shan, C., Luo, H., Muruato, A.E., Medeiros, D.B.A., Mays, E., Xie, X., Zou, J., Roundy, C.M., Wakamiya, M., Rossi, S.L., Wang, T., Weaver, S.C., Shi, P.-Y., 2017. Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. *Cell Rep.* 21, 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.10.016>
- Forrester, N.L., Guerbois, M., Seymour, R.L., Spratt, H., Weaver, S.C., 2012. Vector-Borne Transmission Imposes a Severe Bottleneck on an RNA Virus Population. *PLoS Pathog.* 8, e1002897. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002897>
- Fragkoudis, R., Chi, Y., Siu, R.W.C., Barry, G., Attarzadeh-Yazdi, G., Merits, a., Nash, a. a., Fazakerley, J.K., Kohl, a., 2008. Semliki Forest virus strongly reduces mosquito host defence signaling. *Insect Mol. Biol.* 17, 647–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00834.x>
- Franz, A.W.E., Kantor, A.M., Passarelli, A.L., Clem, R.J., 2015. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v7072795>

- Franz, A.W.E., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z.N., Blair, C.D., Beaty, B.J., James, A.A., Olson, K.E., 2006. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4198–203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600479103>
- Franz, A.W.E., Sanchez-Vargas, I., Raban, R.R., Black IV, W.C., James, A.A., Olson, K.E., 2014. Fitness Impact and Stability of a Transgene Conferring Resistance to Dengue-2 Virus following Introgression into a Genetically Diverse *Aedes aegypti* Strain. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2833. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002833>
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J.A., Imler, J.-L., 2006. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. *Nat. Immunol.* 7, 590–597. <https://doi.org/10.1038/ni1335>
- Gantz, V.M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V.M., Bier, E., James, A.A., 2015. Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E6736–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521077112>
- Gentleman, R., Carey, V.J., Huber, W., Irizarry, R.A., Dudoit, S. (Eds.), 2005. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, Statistics for Biology and Health. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0>
- Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A., 2001. *Drosophila* Immune Deficiency (IMD) Is a Death Domain Protein that Activates Antibacterial Defense and Can Promote Apoptosis. *Dev. Cell* 1, 503–514. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00059-4)
- Germi, R., Crance, J.-M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W.H., Zarski, J.-P., Drouet, E., 2002. Heparan Sulfate-Mediated Binding of Infectious Dengue Virus Type 2 and Yellow Fever Virus. *Virology* 292, 162–168. <https://doi.org/10.1006/VIRO.2001.1232>
- Giai Gianetto, Q., Combes, F., Ramus, C., Bruley, C., Couté, Y., Burger, T., 2016. Calibration plot for proteomics: A graphical tool to visually check the assumptions underlying FDR control in quantitative experiments. *Proteomics* 16, 29–32. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500189>
- Göertz, G.P., Fros, J.J., Miesen, P., Vogels, C.B.F., van der Bent, M.L., Geertsema, C., Koenraadt, C.J.M., van Rij, R.P., van Oers, M.M., Pijlman, G.P., 2016. Noncoding Subgenomic Flavivirus RNA Is Processed by the Mosquito RNA Interference Machinery and Determines West Nile Virus Transmission by *Culex pipiens* Mosquitoes. *J. Virol.* 90, 10145–10159. <https://doi.org/10.1128/JVI.00930-16>
- Gómez, M.M., Abreu, F.V.S. de, Santos, A.A.C. dos, Mello, I.S. de, Santos, M.P., Ribeiro, I.P., Ferreira-de-Brito, A., Miranda, R.M. de, Castro, M.G. de, Ribeiro, M.S., Laterrière Junior, R. da C., Aguiar, S.F., Meira, G.L.S., Antunes, D., Torres, P.H.M., Mir, D., Vicente, A.C.P., Guimarães, A.C.R., Caffarena, E.R., Bello, G., Lourenço-de-Oliveira, R., Bonaldo, M.C., 2018. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. *J. Gen. Virol.* 99, 536–548. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001033>
- Grubaugh, N.D., Weger-Lucarelli, J., Murrieta, R.A., Fauver, J.R., Garcia-Luna, S.M., Prasad, A.N., Black, W.C., Ebel, G.D., 2016. Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative Fitness during Host Switching. *Cell Host Microbe* 19, 481–492. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2016.03.002>
- Gubler, D.J., 2011. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop. Med. Health* 39, 3–11. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S05>
- Gubler, D.J., 2002. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Arch. Med. Res.* 33, 330–342. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00378-8](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00378-8)

- Gubler, D.J., Meltzer, M., 1999. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv. Virus Res.* 53, 35–70.
- Gubler, D.J., Vasilakis, N., Musso, D., 2017. History and Emergence of Zika Virus. *J. Infect. Dis.* 216, S860–S867. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix451>
- Hall, A.B., Basu, S., Jiang, X., Qi, Y., Timoshevskiy, V.A., Biedler, J.K., Sharakhova, M. V., Elahi, R., Anderson, M.A.E., Chen, X.-G., Sharakhov, I. V., Adelman, Z.N., Tu, Z., 2015. SEX DETERMINATION. A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 348, 1268–70. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2850>
- Halstead, S.B., 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239, 476–81. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.239.4839.476>
- Hanners, N.W., Eitson, J.L., Usui, N., Richardson, R.B., Wexler, E.M., Konopka, G., Schoggins, J.W., 2016. Western Zika Virus in Human Fetal Neural Progenitors Persists Long Term with Partial Cytopathic and Limited Immunogenic Effects. *Cell Rep.* 15, 2315–22. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.075>
- Harbach, R.E., Besansky, N.J., 2014. Mosquitoes. *Curr. Biol.* 24, R14–R15. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.047>
- Hardy, J.L., Houk, E.J., Kramer, L.D., Reeves, W.C., 1983. Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. *Annu. Rev. Entomol.* 28, 229–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.001305>
- Harris, A.F., McKemey, A.R., Nimmo, D., Curtis, Z., Black, I., Morgan, S.A., Oviedo, M.N., Lacroix, R., Naish, N., Morrison, N.I., Collado, A., Stevenson, J., Scaife, S., Dafa'alla, T., Fu, G., Phillips, C., Miles, A., Raduan, N., Kelly, N., Beech, C., Donnelly, C.A., Petrie, W.D., Alphey, L., 2012. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nat. Biotechnol.* 30, 828–830. <https://doi.org/10.1038/nbt.2350>
- Hartig, J.V., Esslinger, S., Böttcher, R., Saito, K., Förstemann, K., 2009. Endo-siRNAs depend on a new isoform of loquacious and target artificially introduced, high-copy sequences. *EMBO J.* 28, 2932–44. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.220>
- Hecker, H., Rudin, W., 1981. Morphometric parameters of the midgut cells of *Aedes aegypti* L. (Insecta, Diptera) under various conditions. *Cell Tissue Res.* 219, 619–27. <https://doi.org/10.1007/BF00209999>
- Hendrichs, J., Franz, G., Rendon, P., 1995. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. *J. Appl. Entomol.* 119, 371–377. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1995.tb01303.x>
- Hess, A.M., Prasad, A.N., Ptitsyn, A., Ebel, G.D., Olson, K.E., Barbacioru, C., Monighetti, C., Campbell, C.L., 2011. Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. *BMC Microbiol.* 11, 45. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-45>
- Hillyer, J.F., 2015. Integrated Immune and Cardiovascular Function in Pancrustacea: Lessons from the Insects. *Integr. Comp. Biol.* 55, 843–855. <https://doi.org/10.1093/icb/icv021>
- Hoffmann, A.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Callahan, A.G., Phillips, B.L., Billington, K., Axford, J.K., Montgomery, B., Turley, A.P., O'Neill, S.L., 2014. Stability of the wMel *Wolbachia* Infection following Invasion into *Aedes aegypti* Populations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3115. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003115>
- Huang, Z., Kingsolver, M.B., Avadhanula, V., Hardy, R.W., 2013. An antiviral role for antimicrobial peptides during the arthropod response to alphavirus replication. *J. Virol.* 87, 4272–80. <https://doi.org/10.1128/JVI.03360-12>
- Hubálek, Z., Rudolf, I., Nowotny, N., 2014. Arboviruses Pathogenic for Domestic and Wild Animals. *Adv.*

- Virus Res. 89, 201–275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7>
- Hughes, H.R., Kayiwa, J., Mossel, E.C., Lutwama, J., Staples, J.E., Lambert, A.J., 2018. Phylogeny of Yellow Fever Virus, Uganda, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 1598. <https://doi.org/10.3201/eid2408.180588>
- Hunter, M.R., Scourfield, E.J., Emmott, E., Graham, S.C., 2017. VPS18 recruits VPS41 to the human HOPS complex via a RING-RING interaction. *Biochem. J.* 474, 3615–3626. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170588>
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–6.
- Hussain, M., Asgari, S., 2014. MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2746–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320123111>
- Hussain, M., Torres, S., Schnettler, E., Funk, A., Grundhoff, A., Pijlman, G.P., Khromykh, A.A., Asgari, S., 2012. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res.* 40, 2210–23. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr848>
- Hussain, M., Walker, T., O'Neill, S.L., Asgari, S., 2013. Blood meal induced microRNA regulates development and immune associated genes in the Dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 146–152. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2012.11.005>
- Ivanyi-Nagy, R., Lavergne, J.-P., Gabus, C., Ficheux, D., Darlix, J.-L., 2008. RNA chaperoning and intrinsic disorder in the core proteins of Flaviviridae. *Nucleic Acids Res.* 36, 712–725. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1051>
- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S. V, Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P.S., 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21, 635–637. <https://doi.org/10.1038/nbt831>
- Jackson, A.L., Burchard, J., Schelter, J., Chau, B.N., Cleary, M., Lim, L., Linsley, P.S., 2006. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12, 1179–1187. <https://doi.org/10.1261/rna.25706>
- Jayachandran, B., Hussain, M., Asgari, S., 2012. RNA Interference as a Cellular Defense Mechanism against the DNA Virus Baculovirus. *J. Virol.* 86, 13729–13734. <https://doi.org/10.1128/JVI.02041-12>
- Jeang, K.-T., 2012. RNAi in the regulation of mammalian viral infections. *BMC Biol.* 10, 58. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-58>
- Jemielity, S., Wang, J.J., Chan, Y.K., Ahmed, A.A., Li, W., Monahan, S., Bu, X., Farzan, M., Freeman, G.J., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H., Choe, H., 2013. TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. *PLoS Pathog.* 9, e1003232. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003232>
- Jennings, a D., Gibson, C. a, Miller, B.R., Mathews, J.H., Mitchell, C.J., Roehrig, J.T., Wood, D.J., Taffs, F., Sil, B.K., Whitby, S.N., 1994. Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine-associated human encephalitis. *J. Infect. Dis.* 169, 512–518.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Johnson, B.W., Chambers, T. V., Crabtree, M.B., Filippis, A.M.B., Vilarinhos, P.T.R., Resende, M.C., Macoris, M. de L.G., Miller, B.R., 2002. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 611–613.

[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90326-3](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90326-3)

- Jorgensen, R.A., 1995. Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression States. *Science* 268, 686–91. <https://doi.org/10.1126/science.268.5211.686>
- Joubert, P.-E., Werneke, S., de la Calle, C., Guivel-Benhassine, F., Giodini, A., Peduto, L., Levine, B., Schwartz, O., Lenschow, D., Albert, M.L., 2012. Chikungunya-induced cell death is limited by ER and oxidative stress-induced autophagy. *Autophagy* 8, 1261–1263. <https://doi.org/10.4161/auto.20751>
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., Kim, D.-H., 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>
- Junjhon, J., Edwards, T.J., Utaipat, U., Bowman, V.D., Holdaway, H.A., Zhang, W., Keelapang, P., Puttikhunt, C., Perera, R., Chipman, P.R., Kasinrerak, W., Malasit, P., Kuhn, R.J., Sittisombut, N., 2010. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *J. Virol.* 84, 8353–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.00696-10>
- Kang, S., Shields, A.R., Jupatanakul, N., Dimopoulos, G., 2014. Suppressing Dengue-2 Infection by Chemical Inhibition of *Aedes aegypti* Host Factors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3084. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003084>
- Kantor, A., Grant, D., Balaraman, V., White, T., Franz, A., Kantor, A.M., Grant, D.G., Balaraman, V., White, T.A., Franz, A.W.E., 2018. Ultrastructural Analysis of Chikungunya Virus Dissemination from the Midgut of the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Viruses* 10, 571. <https://doi.org/10.3390/v10100571>
- Kantor, A.M., Dong, S., Held, N.L., Ishimwe, E., Passarelli, A.L., Clem, R.J., Franz, A.W.E., 2017. Identification and initial characterization of matrix metalloproteinases in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 26, 113–126. <https://doi.org/10.1111/imb.12275>
- Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., Virgin, H.W., 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299, 1575–8. <https://doi.org/10.1126/science.1077905>
- Kay, B., Nam, V.S., 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *Lancet* 365, 613–617. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17913-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17913-6)
- Keene, K.M., Foy, B.D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B.J., Blair, C.D., Olson, K.E., 2004. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17240–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406983101>
- Khan, K., Bogoch, I., Brownstein, J.S., Miniota, J., Nicolucci, A., Hu, W., Nsoesie, E.O., Cetron, M., Creatore, M.I., German, M., Wilder-Smith, A., 2014. Assessing the Origin of and Potential for International Spread of Chikungunya Virus from the Caribbean. *PLoS Curr.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.2134a0a7bf37fd8d388181539fea2da5>
- Khoo, C.C., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K.E., Franz, A.W., 2010. The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol.* 10, 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-130>
- Khoo, C.C.H., Doty, J.B., Heersink, M.S., Olson, K.E., Franz, A.W.E., 2013. Transgene-mediated suppression of the RNA interference pathway in *Aedes aegypti* interferes with gene silencing and enhances Sindbis virus and dengue virus type 2 replication. *Insect Mol. Biol.* 22, 104–114. <https://doi.org/10.1111/imb.12008>
- Khromykh, A.A., Varnavski, A.N., Sedlak, P.L., Westaway, E.G., 2001. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J. Virol.* 75, 4633–40. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4633-4640.2001>
- Kim, S., Li, B., Linhardt, R., Kim, S.Y., Li, B., Linhardt, R.J., 2017. Pathogenesis and Inhibition of

- Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. *Pharmaceuticals* 10, 44. <https://doi.org/10.3390/ph10020044>
- Kistler, K.E., Vosshall, L.B., Matthews, B.J., 2015. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep.* 11, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.009>
- Klitting, R., Gould, E., Paupy, C., de Lamballerie, X., Klitting, R., Gould, E.A., Paupy, C., de Lamballerie, X., 2018. What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (I). *Genes (Basel)*. 9, 291. <https://doi.org/10.3390/genes9060291>
- Knipe, D., Howley, P. (Eds.), 2013. *Fields Virology*, sixth edition.
- Koh, C., Allen, S.L., Herbert, R.I., McGraw, E.A., Chenoweth, S.F., 2018. The transcriptional response of *Aedes aegypti* with variable extrinsic incubation periods for dengue virus. *Genome Biol. Evol.* <https://doi.org/10.1093/gbe/evy230>
- Kraemer, M.U., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A.Q., Shearer, F.M., Barker, C.M., Moore, C.G., Carvalho, R.G., Coelho, G.E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I.R., Teng, H.J., Brady, O.J., Messina, J.P., Pigott, D.M., Scott, T.W., Smith, D.L., William Wint, G.R., Golding, N., Hay, S.I., 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Kramer, L.D., Hardy, J.L., Presser, S.B., Houk, E.J., 1981. Dissemination barriers for western equine encephalomyelitis virus in *Culex tarsalis* infected after ingestion of low viral doses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 190–7.
- Kularatne, S.A.M., Weerasinghe, S.C., Gihan, C., Wickramasinghe, S., Dharmarathne, S., Abeyrathna, A., Jayalath, T., 2012. Epidemiology, clinical manifestations, and long-term outcomes of a major outbreak of chikungunya in a hamlet in sri lanka, in 2007: a longitudinal cohort study. *J. Trop. Med.* 2012, 639178. <https://doi.org/10.1155/2012/639178>
- Kulkarni, M.M., Booker, M., Silver, S.J., Friedman, A., Hong, P., Perrimon, N., Mathey-Prevot, B., 2006. Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. *Nat. Methods* 33, 833833–838838. <https://doi.org/10.1038/nmeth935>
- Kurtz, J., 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 26, 186–192. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2005.02.001>
- Kwagonga, L., Masiira, B., Kyobe-Bosa, H., Kadobera, D., Atuheire, E.B., Lubwama, B., Kagirita, A., Katushabe, E., Kayiwa, J.T., Lutwama, J.J., Ojwang, J.C., Makumbi, I., Ario, A.R., Borchert, J., Zhu, B.-P., 2018. Outbreak of yellow fever in central and southwestern Uganda, February–may 2016. *BMC Infect. Dis.* 18, 548. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3440-y>
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R.G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J.H., Jarman, R.G., Scott, T.W., 2009. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol. Biol.* 9, 160. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-160>
- Lambrechts, L., Paaijmans, K.P., Fansiri, T., Carrington, L.B., Kramer, L.D., Thomas, M.B., Scott, T.W., 2011. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7460–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101377108>
- Lauring, A.S., Andino, R., 2010. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLoS Pathog.* 6, e1001005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
- Le Coupanec, A., Tchankouo-Nguetchou, S., Roux, P., Khun, H., Huerre, M., Morales-Vargas, R., Enguehard, M., Lavillette, D., Missé, D., Choumet, V., 2017. Co-infection of mosquitoes with chikungunya and dengue viruses reveals modulation of the replication of both viruses in midguts and salivary glands of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18081708>
- Le Sommer, C., Barrows, N.J., Bradrick, S.S., Pearson, J.L., Garcia-Blanco, M.A., 2012. G Protein-Coupled

- Receptor Kinase 2 Promotes Flaviviridae Entry and Replication. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1820. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001820>
- Lee, R.C.H., Chu, J.J.H., 2015. Proteomics Profiling of Chikungunya-Infected *Aedes albopictus* C6/36 Cells Reveal Important Mosquito Cell Factors in Virus Replication. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003544. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003544>
- Léger, P., Lara, E., Jagla, B., Sismeiro, O., Mansuroglu, Z., Coppée, J.Y., Bonnefoy, E., Bouloy, M., 2013. Dicer-2- and Piwi-Mediated RNA Interference in Rift Valley Fever Virus-Infected Mosquito Cells. *J. Virol.* 87, 1631–1648. <https://doi.org/10.1128/JVI.02795-12>
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A., 1996. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 86, 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Lennemann, N.J., Coyne, C.B., 2015. Catch Me If You Can: The Link between Autophagy and Viruses. *PLOS Pathog.* 11, e1004685. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004685>
- Lepiniec, L., Dalgarno, L., Huong, V.T.Q., Monath, T.P., Digoutte, J.P., Deubel, V., 1994. Geographic distribution and evolution of yellow fever viruses based on direct sequencing of genomic cDNA fragments. *J. Gen. Virol.* 75, 417–423. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-2-417>
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, H., Li, W.X., Ding, S.W., 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296, 1319–21. <https://doi.org/10.1126/science.1070948>
- Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 1999. Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. *J. Virol.* 73.
- Lindquist, D.A., Abusowa, M., Hall, M.J.R., 1992. The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med. Vet. Entomol.* 6, 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1992.tb00027.x>
- Linnarsson, S., Teichmann, S.A., 2016. Single-cell genomics: coming of age. *Genome Biol.* 17, 97. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0960-x>
- Liu-Helmerson, J., Stenlund, H., Wilder-Smith, A., Rocklöv, J., 2014. Vectorial Capacity of *Aedes aegypti*: Effects of Temperature and Implications for Global Dengue Epidemic Potential. *PLoS One* 9, e89783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089783>
- Liu, J., Liu, Y., Nie, K., Du, S., Qiu, J., Pang, X., Wang, P., Cheng, G., 2016. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nat. Microbiol.* 1, 16087. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.87>
- Liu, T., Yang, W.-Q., Xie, Y.-G., Liu, P.-W., Xie, L.-H., Lin, F., Li, C.-Y., Gu, J.-B., Wu, K., Yan, G.-Y., Chen, X.-G., 2018. Construction of an efficient genomic editing system with CRISPR/Cas9 in the vector mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Sci.* <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12645>
- Londono-Renteria, B., Troupin, A., Conway, M.J., Vesely, D., Ledizet, M., Roundy, C.M., Cloherty, E., Jameson, S., Vanlandingham, D., Higgs, S., Fikrig, E., Colpitts, T.M., 2015. Dengue Virus Infection of *Aedes aegypti* Requires a Putative Cysteine Rich Venom Protein. *PLOS Pathog.* 11, e1005202. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005202>

- Louis, V.R., Montenegro Quiñonez, C.A., Kusumawathie, P., Palihawadana, P., Janaki, S., Tozan, Y., Wijemuni, R., Wilder-Smith, A., Tissera, H.A., 2016. Characteristics of and factors associated with dengue vector breeding sites in the City of Colombo, Sri Lanka. *Pathog. Glob. Health* 110, 79–86. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1175158>
- Lourenço-de-Oliveira, R., Vazeille, M., Filippis, A.M.B. de, Failloux, A.-B., 2002. Oral Susceptibility to Yellow Fever Virus of *Aedes aegypti* from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 437–439. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000300031>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lucas, K.J., Myles, K.M., Raikhel, A.S., 2013. Small RNAs: a new frontier in mosquito biology. *Trends Parasitol.* 29, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.003>
- Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Patramool, S., Dumas, E., Wasinpiyamongkol, L., Saune, L., Hamel, R., Bernard, E., Sereno, D., Thomas, F., Piquemal, D., Yssel, H., Briant, L., Missé, D., 2011. Induction of a Peptide with Activity against a Broad Spectrum of Pathogens in the *Aedes aegypti* Salivary Gland, following Infection with Dengue Virus. *PLoS Pathog.* 7, e1001252. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001252>
- Ma, L., Jones, C.T., Groesch, T.D., Kuhn, R.J., Post, C.B., 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3414–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>
- Mackenzie, J.M., Westaway, E.G., 2001. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J. Virol.* 75, 10787–99. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10787-10799.2001>
- Maina, J.N., 1989. Scanning and transmission electron microscopic study of the tracheal air sac system in a grasshopper *Chrotogonus senegalensis* (Kraus)? Orthoptera: Acrididae: Pyrogomorphinae. *Anat. Rec.* 223, 393–405. <https://doi.org/10.1002/ar.1092230408>
- Manson, P., 1878. On the Development of *Filaria sanguinis hominis*, and on the Mosquito considered as a Nurse*. *J. Linn. Soc. London, Zool.* 14, 304–311. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1878.tb01837.x>
- Marcombe, S., Mathieu, R.B., Pocquet, N., Riaz, M.-A., Poupardin, R., Sélior, S., Darriet, F., Reynaud, S., Yébakima, A., Corbel, V., David, J.-P., Chandre, F., 2012. Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. *PLoS One* 7, e30989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030989>
- Marten, G.G., Reid, J.W., 2007. Cyclopid copepods. *Am. Modquito Control* 7, 65–92. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2007\)23\[65:CC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2007)23[65:CC]2.0.CO;2)
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* 17, 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martins, R.M., Maia, M. de L.S., Farias, R.H.G., Camacho, L.A.B., Freire, M.S., Galler, R., Yamamura, A.M.Y., Almeida, L.F.C., Lima, S.M.B., Nogueira, R.M.R., Sá, G.R.S., Hokama, D.A., de Carvalho, R., Freire, R.A. V, Pereira Filho, E., Leal, M. da L.F., Homma, A., 2013. 17DD yellow fever vaccine: a double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9, 879–88. <https://doi.org/10.4161/hv.22982>
- Mason, P.W., Shustov, A. V., Frolov, I., 2006. Production and characterization of vaccines based on flaviviruses defective in replication. *Virology* 351, 432–443. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2006.04.003>
- Mathur, G., Sanchez-Vargas, I., Alvarez, D., Olson, K.E., Marinotti, O., James, A.A., 2010. Transgene-mediated suppression of dengue viruses in the salivary glands of the yellow fever mosquito,

- Aedes aegypti*. Insect Mol. Biol. 19, 753–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01032.x>
- Matthews, B.J., Dudchenko, O., Kingan, S.B., Koren, S., Antoshechkin, I., Crawford, J.E., Glassford, W.J., Herre, M., Redmond, S.N., Rose, N.H., Weedall, G.D., Wu, Y., Batra, S.S., Brito-Sierra, C.A., Buckingham, S.D., Campbell, C.L., Chan, S., Cox, E., Evans, B.R., Fansiri, T., Filipović, I., Fontaine, A., Gloria-Soria, A., Hall, R., Joardar, V.S., Jones, A.K., Kay, R.G.G., Kodali, V.K., Lee, J., Lycett, G.J., Mitchell, S.N., Muehling, J., Murphy, M.R., Omer, A.D., Partridge, F.A., Peluso, P., Aiden, A.P., Ramasamy, V., Rašić, G., Roy, S., Saavedra-Rodriguez, K., Sharan, S., Sharma, A., Smith, M.L., Turner, J., Weakley, A.M., Zhao, Z., Akbari, O.S., Black, W.C., Cao, H., Darby, A.C., Hill, C.A., Johnston, J.S., Murphy, T.D., Raikhel, A.S., Sattelle, D.B., Sharakhov, I. V., White, B.J., Zhao, L., Aiden, E.L., Mann, R.S., Lambrechts, L., Powell, J.R., Sharakhova, M. V., Tu, Z., Robertson, H.M., McBride, C.S., Hastie, A.R., Korfach, J., Neafsey, D.E., Phillippy, A.M., Vosshall, L.B., 2018. Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. *Nature* 1. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0692-z>
- McElroy, K.L., Girard, Y.A., McGee, C.E., Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., Higgs, S., 2008. Characterization of the Antigen Distribution and Tissue Tropisms of Three Phenotypically Distinct Yellow Fever Virus Variants in Orally Infected *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 8, 675–688. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0269>
- McElroy, K.L., Tsetsarkin, K. a., Vanlandingham, D.L., Higgs, S., 2006a. Manipulation of the yellow fever virus non-structural genes 2A and 4B and the 3' non-coding region to evaluate genetic determinants of viral dissemination from the *Aedes Aegypti* midgut. *J. Gen. Virol.* 87, 1158–1164. <https://doi.org/75/6/1158> [pii]
- McElroy, K.L., Tsetsarkin, K. a., Vanlandingham, D.L., Higgs, S., 2006b. Role of the yellow fever virus structural protein genes in viral dissemination from the *Aedes aegypti* mosquito midgut. *J. Gen. Virol.* 87, 2993–3001. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82023-0>
- McElroy, K.L., Tsetsarkin, K. a., Vanlandingham, D.L., Higgs, S., 2005. Characterization of an infectious clone of the wild-type yellow fever virus Asibi strain that is able to infect and disseminate in mosquitoes. *J. Gen. Virol.* 86, 1747–1751. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80746-0>
- McFarlane, M., Arias-Goeta, C., Martin, E., O'Hara, Z., Lulla, A., Mousson, L., Rainey, S.M., Misbah, S., Schnettler, E., Donald, C.L., Merits, A., Kohl, A., Failloux, A.-B., 2014. Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2994. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002994>
- McGavran, M.H., White, J.D., 1964. Electron Microscopic and Immunofluorescent Observations on Monkey Liver and Tissue Culture Cells Infected with the Asibi Strain of Yellow Fever Virus. *Am. J. Pathol.* 45, 501–17.
- McGraw, E.A., O'Neill, S.L., 2013. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 181–193. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2968>
- McMeniman, C.J., Lane, R. V, Cass, B.N., Fong, A.W.C., Sidhu, M., Wang, Y.-F., O'Neill, S.L., 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323, 141–4. <https://doi.org/10.1126/science.1165326>
- McNeil, D.G., 2016. Zika : the emerging epidemic.
- Medlock, J.M., Hansford, K.M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., Van Bortel, W., 2012. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 435–47. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0814>
- Meertens, L., Carnec, X., Lecoin, M.P., Ramdasi, R., Guivel-Benhassine, F., Lew, E., Lemke, G., Schwartz, O., Amara, A., 2012. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell Host Microbe* 12, 544–557. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2012.08.009>
- Merkling, S.H., van Rij, R.P., 2013. Beyond RNAi: Antiviral defense strategies in *Drosophila* and

- mosquito. *J. Insect Physiol.* 59, 159–170. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2012.07.004>
- Miesen, P., Ivens, A., Buck, A.H., van Rij, R.P., 2016a. Small RNA Profiling in Dengue Virus 2-Infected Aedes Mosquito Cells Reveals Viral piRNAs and Novel Host miRNAs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004452. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004452>
- Miesen, P., Joosten, J., van Rij, R.P., 2016b. PIWIs Go Viral: Arbovirus-Derived piRNAs in Vector Mosquitoes. *PLOS Pathog.* 12, e1006017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006017>
- Miller, B.R., 1987. Increased yellow fever virus infection and dissemination rates in Aedes aegypti mosquitoes orally exposed to freshly grown virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 1011–1012. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90381-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90381-6)
- Miller, B.R., Adkins, D., 1988. Biological characterization of plaque-size variants of yellow fever virus in mosquitoes and mice. *Acta Virol.* 32, 227–234.
- Miller, B.R., Mitchell, C.J., 1991. Genetic selection of a flavivirus-refractory strain of the yellow fever mosquito Aedes aegypti. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 399–407. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.399>
- Miller, B.R., Mitchell, C.J., Ballinger, M.E., 1989. Replication, tissue tropisms and transmission of yellow fever virus in aedes albopictus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 252–255. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90667-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90667-6)
- Miller, B.R., Monath, T.P., Tabachnick, W.J., Ezike, V.I., 1989. Epidemic yellow fever caused by an incompetent mosquito vector. *Trop. Med. Parasitol.* 40, 396–9.
- Mir, D., Delatorre, E., Bonaldo, M., Lourenço-de-Oliveira, R., Vicente, A.C., Bello, G., 2017. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci. Rep.* 7, 7385. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07873-7>
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R.S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P.B., Ware, J., Flouri, T., Beutel, R.G., Niehuis, O., Petersen, M., Izquierdo-Carrasco, F., Wappler, T., Rust, J., Aberer, A.J., Aspöck, U., Aspöck, H., Bartel, D., Blanke, A., Berger, S., Böhm, A., Buckley, T.R., Calcott, B., Chen, J., Friedrich, F., Fukui, M., Fujita, M., Greve, C., Grobe, P., Gu, S., Huang, Y., Jermiin, L.S., Kawahara, A.Y., Krogmann, L., Kubiak, M., Lanfear, R., Letsch, H., Li, Y., Li, Z., Li, J., Lu, H., Machida, R., Mashimo, Y., Kapli, P., McKenna, D.D., Meng, G., Nakagaki, Y., Navarrete-Heredia, J.L., Ott, M., Ou, Y., Pass, G., Podsiadlowski, L., Pohl, H., von Reumont, B.M., Schütte, K., Sekiya, K., Shimizu, S., Slipinski, A., Stamatakis, A., Song, W., Su, X., Szucsich, N.U., Tan, M., Tan, X., Tang, M., Tang, J., Timelthaler, G., Tomizuka, S., Trautwein, M., Tong, X., Uchifune, T., Walz, M.G., Wiegmann, B.M., Wilbrandt, J., Wipfler, B., Wong, T.K.F., Wu, Q., Wu, G., Xie, Y., Yang, S., Yang, Q., Yeates, D.K., Yoshizawa, K., Zhang, Q., Zhang, R., Zhang, W., Zhang, Y., Zhao, J., Zhou, C., Zhou, L., Ziesmann, T., Zou, S., Li, Y., Xu, X., Zhang, Y., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Kjer, K.M., Zhou, X., 2014. Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science (80-.)*. 346, 763–767. <https://doi.org/10.1126/science.1257570>
- Mizushima, N., Levine, B., 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 12, 823–830. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-823>
- Mogensen, T.H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–73, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Monath, T.P., 2005. Yellow fever vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 4, 553–574. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.4.553>
- Monath, T.P., 1994. Yellow fever and dengue—the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. *Semin. Virol.* 5, 133–145. <https://doi.org/10.1006/SMVY.1994.1014>
- Monath, T.P., 1987. Yellow fever: a medically neglected disease. Report on a seminar. *Rev Infect Dis* 9,

- 165–175. <https://doi.org/10.1093/clinids/9.1.165>
- Monath, T.P., Vasconcelos, P.F.C., 2015. Yellow fever. *J. Clin. Virol.* 64, 160–173. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>
- Morazzani, E.M., Wiley, M.R., Murreddu, M.G., Adelman, Z.N., Myles, K.M., 2012. Production of Virus-Derived Ping-Pong-Dependent piRNA-like Small RNAs in the Mosquito Soma. *PLoS Pathog.* 8, e1002470. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002470>
- Moreira-Soto, A., Torres, M.C., Lima de Mendonça, M.C., Mares-Guia, M.A., dos Santos Rodrigues, C.D., Fabri, A.A., dos Santos, C.C., Machado Araújo, E.S., Fischer, C., Ribeiro Nogueira, R.M., Drosten, C., Sequeira, P.C., Drexler, J.F., Bispo de Filippis, A.M., 2018. Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the 2016–2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 1019.e1-1019.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.026>
- Moudy, R.M., Zhang, B., Shi, P.Y., Kramer, L.D., 2009. West Nile virus envelope protein glycosylation is required for efficient viral transmission by *Culex* vectors. *Virology* 387, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.038>
- Moy, R.H., Gold, B., Molleston, J.M., Schad, V., Yanger, K., Salzano, M.-V., Yagi, Y., Fitzgerald, K.A., Stanger, B.Z., Soldan, S.S., Cherry, S., 2014. Antiviral Autophagy Restricts Rift Valley Fever Virus Infection and Is Conserved from Flies to Mammals. *Immunity* 40, 51–65. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2013.10.020>
- Msanga, A., Kiwia, N., Mramba, F., Malele, I., Kitwika, W., Byamungu, M., Dyck, A., Parker, A., Kassim, J., Chalo, O., Jimbika, A., 2000. Research note on eradication of tsetse flies using the sterile insect technique: The case of Zanzibar and Mafia Island Tanzania. *Tanzania J. Agric. Sci.* 3, 173–180.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Murray, C.L., Jones, C.T., Rice, C.M., 2008. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 699–708. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1928>
- Musso, D., Nilles, E.J., Cao-Lormeau, V.-M., 2014. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, O595–O596. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707>
- Mutebi, J.P., Wang, H., Li, L., Bryant, J.E., Barrett, A.D., 2001. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J. Virol.* 75, 6999–7008. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6999-7008.2001>
- Nakamoto, M., Moy, R.H., Xu, J., Bambina, S., Yasunaga, A., Shelly, S.S., Gold, B., Cherry, S., 2012. Virus Recognition by Toll-7 Activates Antiviral Autophagy in *Drosophila*. *Immunity* 36, 658–667. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2012.03.003>
- Netea, M.G., Quintin, J., van der Meer, J.W.M., 2011. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe* 9, 355–361. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2011.04.006>
- Ng, W., Soto-Acosta, R., Bradrick, S., Garcia-Blanco, M., Ooi, E., Ng, W.C., Soto-Acosta, R., Bradrick, S.S., Garcia-Blanco, M.A., Ooi, E.E., 2017. The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses* 9, 137. <https://doi.org/10.3390/v9060137>
- NIH, 2018. NIH begins clinical trial of live, attenuated Zika vaccine | National Institutes of Health (NIH) [WWW Document]. URL <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-begins-clinical-trial-live-attenuated-zika-vaccine> (accessed 11.27.18).
- Nishijima, N., Marusawa, H., Ueda, Y., Takahashi, K., Nasu, A., Osaki, Y., Kou, T., Yazumi, S., Fujiwara, T., Tsuchiya, S., Shimizu, K., Uemoto, S., Chiba, T., 2012. Dynamics of Hepatitis B Virus Quasispecies in Association with Nucleos(t)ide Analogue Treatment Determined by Ultra-Deep Sequencing. *PLoS One* 7, e35052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035052>

- Nour, A.M., Modis, Y., 2014. Endosomal vesicles as vehicles for viral genomes. *Trends Cell Biol.* 24, 449–54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.03.006>
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparç-Goffart, I., Lastère, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H.P., Musso, D., Ghawche, F., 2014. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* 19, 20720. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>
- Okuda, K., Caroci, A. d. S., Ribolla, P.E.M., de Bianchi, A.G., Bijovsky, A.T., 2002. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue Cell* 34, 210–219. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(02\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(02)00032-0)
- Olmo, R.P., Ferreira, A.G.A., Izidoro-Toledo, T.C., Aguiar, E.R.G.R., de Faria, I.J.S., de Souza, K.P.R., Osório, K.P., Kuhn, L., Hammann, P., de Andrade, E.G., Todjro, Y.M., Rocha, M.N., Leite, T.H.J.F., Amadou, S.C.G., Armache, J.N., Paro, S., de Oliveira, C.D., Carvalho, F.D., Moreira, L.A., Marois, E., Imler, J.-L., Marques, J.T., 2018. Control of dengue virus in the midgut of *Aedes aegypti* by ectopic expression of the dsRNA-binding protein Loqs2. *Nat. Microbiol.* 1. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0268-6>
- Ooi, E.-E., Goh, K.-T., Gubler, D.J., 2006. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 887–93.
- Owen, W.B., 1977. Morphology of the thoracic skeleton and muscles of the mosquito, *Culiseta inornata* (Williston), (Diptera: Culicidae). *J. Morphol.* 153, 427–460. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051530308>
- Oxitec.com, 2018. Oxitec's Friendly™ *Aedes* Mosquito Receives Positive Evaluation for European Standard in relation to Human Health and the Environment - Oxitec [WWW Document]. URL <https://www.oxitec.com/oxitecs-friendly-aedes-mosquito-receives-positive-evaluation-for-european-standard-in-relation-to-human-health-and-the-environment/> (accessed 11.26.18).
- PAHO, 2014. PAHO | Chikungunya 29 August 2014 [WWW Document]. URL https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=343&Itemid=40931&lang=fr (accessed 11.24.18).
- Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A.S., Xi, Z., 2012. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E23–E31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108>
- Paradkar, P.N., Duchemin, J.B., Voysey, R., Walker, P.J., 2014. Dicer-2-Dependent Activation of *Culex Vago* Occurs via the TRAF-Rel2 Signaling Pathway. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002823>
- Paradkar, P.N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J.-B., Walker, P.J., 2012. Secreted *Vago* restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1205231109>
- Patramool, S., Surasombatpattana, P., Luplertlop, N., Sévéno, M., Choumet, V., Thomas, F., Missé, D., 2011. Proteomic analysis of an *Aedes albopictus* cell line infected with Dengue serotypes 1 and 3 viruses. *Parasit. Vectors* 4, 138. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-138>
- Patterson, E.I., Khanipov, K., Rojas, M.M., Kautz, T.F., Rockx-Brouwer, D., Golovko, G., Albayrak, L., Fofanov, Y., Forrester, N.L., 2018. Mosquito bottlenecks alter viral mutant swarm in a tissue and time-dependent manner with contraction and expansion of variant positions and diversity. *Virus Evol.* 4. <https://doi.org/10.1093/ve/vey001>
- Peleg, J., 1968. Growth of arboviruses in primary tissue culture of *Aedes aegypti* embryos. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17, 219–223. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1968.17.219>
- Perera, R., Kuhn, R.J., 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 369–377.

<https://doi.org/10.1016/J.MIB.2008.06.004>

- Perrone, J., Spielman, A., 1988. Time and site of assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Tissue Res.* 252, 473–478. <https://doi.org/10.1007/BF00214391>
- Petit, M., Mongelli, V., Frangeul, L., Blanc, H., Jiggins, F., Saleh, M.-C., 2016. piRNA pathway is not required for antiviral defense in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E4218–E4227. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1607952113>
- Petitjean, O., Montavon, T., Pfeffer, S., 2018. En avoir ou pas, l'interférence par l'ARN comme défense antivirale chez les mammifères. *Virologie* 22, 251–260. <https://doi.org/10.1684/VIR.2018.0748>
- Peyrefitte, C.N., Perret, M., Garcia, S., Rodrigues, R., Bagnaud, A., Lacote, S., Crance, J.M., Vernet, G., Garin, D., Bouloy, M., Paranhos-Baccala, G., 2010. Differential activation profiles of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus- and Dugbe virus-infected antigen-presenting cells. *J. Gen. Virol.* 91, 189–198. <https://doi.org/10.1099/vir.0.015701-0>
- Phuc, H., Andreasen, M.H., Burton, R.S., Vass, C., Epton, M.J., Pape, G., Fu, G., Condon, K.C., Scaife, S., Donnelly, C.A., Coleman, P.G., White-Cooper, H., Alphey, L., 2007. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol.* 5, 11. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-11>
- Pong, W.-L., Huang, Z.-S., Teoh, P.-G., Wang, C.-C., Wu, H.-N., 2011. RNA binding property and RNA chaperone activity of dengue virus core protein and other viral RNA-interacting proteins. *FEBS Lett.* 585, 2575–2581. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.06.038>
- Possas, C., Lourenço-de-Oliveira, R., Tauil, P.L., Pinheiro, F. de P., Pissinatti, A., Cunha, R.V. da, Freire, M., Martins, R.M., Homma, A., Possas, C., Lourenço-de-Oliveira, R., Tauil, P.L., Pinheiro, F. de P., Pissinatti, A., Cunha, R.V. da, Freire, M., Martins, R.M., Homma, A., 2018. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180278>
- Post, P.R., Carvalho, R., Galler, R., 1991. Glycosylation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Virus Res.* 18, 291–302. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(91\)90025-Q](https://doi.org/10.1016/0168-1702(91)90025-Q)
- Pounds, S., Cheng, C., 2006. Robust estimation of the false discovery rate. *Bioinformatics* 22, 1979–1987. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl328>
- Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2010. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 625–629. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2010.01.006>
- Raquin, V., Merklings, S.H., Gausson, V., Moltini-Conclois, I., Frangeul, L., Varet, H., Dillies, M.-A., Saleh, M.-C., Lambrechts, L., 2017. Individual co-variation between viral RNA load and gene expression reveals novel host factors during early dengue virus infection of the *Aedes aegypti* midgut. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0006152. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006152>
- Rastogi, M., Sharma, N., Singh, S.K., 2016. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology* 531, 131. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>
- Reed, W., Carroll, J., Agramonte, A., 1901a. Experimental yellow fever. 1901. *J. Am. Med. Assoc.* 415–440.
- Reed, W., Carroll, J., Agramonte, A., 1901b. The etiology of yellow fever: a supplemental note. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 16, 45–71.
- Reed, W., Carroll, J., Agramonte, A., Lazear, J.W., 1900. The Etiology of Yellow Fever-A Preliminary Note. *Public Health Pap. Rep.* 26, 37–53.
- Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H., Vilo, J., 2016. g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res.* 44, W83–W89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw199>

- Reisinger, E.C., Tschismarov, R., Beubler, E., Wiedermann, U., Firbas, C., Loebermann, M., Pfeiffer, A., Muellner, M., Tauber, E., Ramsauer, K., 2018. Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored chikungunya virus vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32488-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32488-7)
- Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., Strauss, J.H., 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229, 726–33. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.4023707>
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., Smyth, G.K., 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47–e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Roby, J.A., Setoh, Y.X., Hall, R.A., Khromykh, A.A., 2015. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 96, 1551–1569. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000097>
- Rodhain, F., 2017. Les arbovirus ont aussi leur « rêve américain ». *Bull. la Société Pathol. Exot.* 110, 147–159. <https://doi.org/10.1007/s13149-017-0557-y>
- Rodhain, F., 2015. Le parasite, le moustique, l'homme ... et les autres : essai sur l'éco-épidémiologie des maladies à vecteurs. Docis.
- Romoser, W.S., Wasieloski, L.P., Pushko, P., Kondig, J.P., Lerdtusnee, K., Neira, M., Ludwig, G. V., 2004. Evidence for Arbovirus Dissemination Conduits from the Mosquito (Diptera: Culicidae) Midgut. *J. Med. Entomol.* 41, 467–475. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.467>
- Ross, R.W., 1956. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J. Hyg. (Lond).* 54, 177–91.
- Rossi, G., Karki, S., Smith, R.L., Brown, W.M., Ruiz, M.O., 2018. The spread of mosquito-borne viruses in modern times: A spatio-temporal analysis of dengue and chikungunya. *Spat. Spatiotemporal. Epidemiol.* 26, 113–125. <https://doi.org/10.1016/J.SSTE.2018.06.002>
- Rozen-Gagnon, K., Stapleford, K.A., Mongelli, V., Blanc, H., Failloux, A.-B., Saleh, M.-C., Vignuzzi, M., 2014. Alphavirus Mutator Variants Present Host-Specific Defects and Attenuation in Mammalian and Insect Models. *PLoS Pathog.* 10, e1003877. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003877>
- Ryckebusch, F., Berthet, M., Missé, D., Choumet, V., Ryckebusch, F., Berthet, M., Missé, D., Choumet, V., 2017. Infection of a French Population of *Aedes albopictus* and of *Aedes aegypti* (Paea Strain) with Zika Virus Reveals Low Transmission Rates to These Vectors' Saliva. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2384. <https://doi.org/10.3390/ijms18112384>
- Salazar, M.I., Richardson, J.H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K.E., Beaty, B.J., 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* 7, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-9>
- Saldaña, M.A., Etebari, K., Hart, C.E., Widen, S.G., Wood, T.G., Thangamani, S., Asgari, S., Hughes, G.L., 2017. Zika virus alters the microRNA expression profile and elicits an RNAi response in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005760>
- Sall, A.A., Faye, O., Diallo, M., Firth, C., Kitchen, A., Holmes, E.C., 2010. Yellow fever virus exhibits slower evolutionary dynamics than dengue virus. *J. Virol.* 84, 765–72. <https://doi.org/10.1128/JVI.01738-09>
- Samuel, G.H., Adelman, Z.N., Myles, K.M., 2018. Antiviral Immunity and Virus-Mediated Antagonism in Disease Vector Mosquitoes. *Trends Microbiol.* 26, 447–461. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.12.005>

- Samuel, G.H., Wiley, M.R., Badawi, A., Adelman, Z.N., Myles, K.M., 2016. Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 13863–13868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600544113>
- Sánchez-Vargas, I., Scott, J.C., Poole-Smith, B.K., Franz, A.W.E., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., Olson, K.E., Blair, C.D., 2009. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000299>
- Sanders, H.R., Foy, B.D., Evans, A.M., Ross, L.S., Beaty, B.J., Olson, K.E., Gill, S.S., 2005. Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 1293–1307. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2005.07.006>
- Savidis, G., McDougall, W.M., Meraner, P., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Trincucci, G., John, S.P., Aker, A.M., Renzette, N., Robbins, D.R., Guo, Z., Green, S., Kowalik, T.F., Brass, A.L., 2016. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Rep.* 16, 232–246. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.06.028>
- Sawyer, B.W.A., Kitchen, S.F., Lloyd, W., York, N., 1932. VACCINATION AGAINST YELLOW FEVER WITH IMMUNE SERUM AND VIRUS FIXED FOR MICE 945–969.
- Schindler, C., Fu, X.Y., Improta, T., Aebersold, R., Darnell, J.E., 1992. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7836–9. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.16.7836>
- Schnettler, E., Donald, C.L., Human, S., Watson, M., Siu, R.W.C., McFarlane, M., Fazakerley, J.K., Kohl, A., Fragkoudis, R., 2013a. Knockdown of piRNA pathway proteins results in enhanced Semliki Forest virus production in mosquito cells. *J. Gen. Virol.* 94, 1680–9. <https://doi.org/10.1099/vir.0.053850-0>
- Schnettler, E., Leung, J.Y., Sterken, M.G., Metz, S.W., Geertsema, C., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., Kohl, A., Khromykh, A. a., Pijlman, G.P., 2013b. Non-coding flavivirus RNA displays RNAi suppressor activity in insect and mammalian cells 86, 13486–13500. <https://doi.org/10.1128/JVI.01104-12>
- Schnettler, E., Tykalová, H., Watson, M., Sharma, M., Sterken, M.G., Obbard, D.J., Lewis, S.H., McFarlane, M., Bell-Sakyi, L., Barry, G., Weisheit, S., Best, S.M., Kuhn, R.J., Pijlman, G.P., Chase-Topping, M.E., Gould, E.A., Grubhoffer, L., Fazakerley, J.K., Kohl, A., 2014. Induction and suppression of tick cell antiviral RNAi responses by tick-borne flaviviruses. *Nucleic Acids Res.* 42, 9436–46. <https://doi.org/10.1093/nar/gku657>
- Scott, J.C., Brackney, D.E., Campbell, C.L., Bondu-Hawkins, V., Hjelle, B., Ebel, G.D., Olson, K.E., Blair, C.D., 2010. Comparison of dengue virus type 2-specific small RNAs from RNA interference-competent and -incompetent mosquito cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e848. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000848>
- Sergon, K., Njuguna, C., Kalani, R., Ofula, V., Onyango, C., Konongoi, L.S., Bedno, S., Burke, H., Dumilla, A.M., Konde, J., Njenga, M.K., Sang, R., Breiman, R.F., 2008. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 333–7.
- Serrato-Salas, J., Izquierdo-Sánchez, J., Argüello, M., Conde, R., Alvarado-Delgado, A., Lanz-Mendoza, H., 2018. *Aedes aegypti* antiviral adaptive response against DENV-2. *Dev. Comp. Immunol.* 84, 28–36. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2018.01.022>
- Severo, M.S., Landry, J.J.M., Lindquist, R.L., Goosmann, C., Brinkmann, V., Collier, P., Hauser, A.E., Benes, V., Henriksson, J., Teichmann, S.A., Levashina, E.A., 2018. Unbiased classification of mosquito blood cells by single-cell genomics and high-content imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E7568–E7577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803062115>
- Shelly, S., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., Cherry, S., 2009. Autophagy Is an Essential Component

- of *Drosophila* Immunity against Vesicular Stomatitis Virus. *Immunity* 30, 588–598. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2009.02.009>
- Shrinet, J., Jain, S., Jain, J., Bhatnagar, R.K., Sunil, S., 2014. Next Generation Sequencing Reveals Regulation of Distinct *Aedes* microRNAs during Chikungunya Virus Development. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2616. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002616>
- Sim, S., Jupatanakul, N., Dimopoulos, G., 2014. Mosquito Immunity against Arboviruses. *Viruses* 6, 4479–4504. <https://doi.org/10.3390/v6114479>
- Sim, S., Jupatanakul, N., Ramirez, J.L., Kang, S., Romero-Vivas, C.M., Mohammed, H., Dimopoulos, G., 2013. Transcriptomic Profiling of Diverse *Aedes aegypti* Strains Reveals Increased Basal-level Immune Activation in Dengue Virus-refractory Populations and Identifies Novel Virus-vector Molecular Interactions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2295. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002295>
- Sim, S., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2012. Dengue Virus Infection of the *Aedes aegypti* Salivary Gland and Chemosensory Apparatus Induces Genes that Modulate Infection and Blood-Feeding Behavior. *PLoS Pathog.* 8, e1002631. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002631>
- Simmons, C.P., Farrar, J.J., van Vinh Chau, N., Wills, B., 2012. Dengue. *N. Engl. J. Med.* 366, 1423–1432. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1110265>
- Slifka, M.K., 2014. Vaccine-mediated immunity against dengue and the potential for long-term protection against disease. *Front. Immunol.* 5, 195. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00195>
- Slonchak, A., Hussain, M., Torres, S., Asgari, S., Khromykh, A.A., 2014. Expression of Mosquito MicroRNA Aae-miR-2940-5p Is Downregulated in Response to West Nile Virus Infection To Restrict Viral Replication. *J. Virol.* 88, 8457–8467. <https://doi.org/10.1128/JVI.00317-14>
- Sluss, H.K., Han, Z., Barrett, T., Goberdhan, D.C., Wilson, C., Davis, R.J., Ip, Y.T., 1996. A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10, 2745–58. <https://doi.org/10.1101/GAD.10.21.2745>
- Smit, J.M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., Wilschut, J., 2011. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses* 3, 160–171. <https://doi.org/10.3390/v3020160>
- Smith, D.R., 2012. An update on mosquito cell expressed dengue virus receptor proteins. *Insect Mol. Biol.* 21, 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01098.x>
- Société française de microbiologie., E., Froissart, R., Louis, C., Blanc, S., 1999. *Virologie.*, Virologie. John Libbey Eurotext.
- Song, R., Guan, S., Lee, S.S., Chen, Z., Chen, C., Han, L., Xu, Y., Li, A., Zeng, H., Ye, H., Zhang, F., 2018. Late or Lack of Vaccination Linked to Importation of Yellow Fever from Angola to China. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 1383. <https://doi.org/10.3201/eid2407.171868>
- Soper, F.L., 1965. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14, 887–891. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1965.14.887>
- Spielman, A. (Andrew), D'Antonio, M., 2001. *Mosquito : a natural history of our most persistent and deadly foe.* Faber and Faber.
- Stefopoulou, A., Balatsos, G., Petraki, A., LaDeau, S.L., Papachristos, D., Michaelakis, A., 2018. Reducing *Aedes albopictus* breeding sites through education: A study in urban area. *PLoS One* 13, e0202451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202451>
- Stokes, A., Bauer, J.H., Paul Hudson, N., Mortimer, P.P., 1928a. Experimental transmission of Yellow Fever virus to laboratory animals. *Am. J. Trop. Med.* <https://doi.org/10.1002/rmv.311>
- Stokes, A., Bauer, J.H., Paul Hudson, N., Mortimer, P.P., 1928b. The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. *JAMA.* <https://doi.org/10.1002/rmv.311>

- Sun, D., Guo, Z., Liu, Y., Zhang, Y., 2017. Progress and Prospects of CRISPR/Cas Systems in Insects and Other Arthropods. *Front. Physiol.* 8, 608. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00608>
- Tabachnick, W., Tabachnick, J., W., 2013. Nature, Nurture and Evolution of Intra-Species Variation in Mosquito Arbovirus Transmission Competence. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 249–277. <https://doi.org/10.3390/ijerph10010249>
- Tchankouo-Nguetcheu, S., Bourguet, E., Lenormand, P., Rousselle, J.C., Namane, A., Choumet, V., 2012. Infection by chikungunya virus modulates the expression of several proteins in *Aedes aegypti* salivary glands. *Parasites and Vectors* 5, 264. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-264>
- Tchankouo-Nguetcheu, S., Khun, H., Pincet, L., Roux, P., Bahut, M., Huerre, M., Guette, C., Choumet, V., 2010. Differential Protein Modulation in Midguts of *Aedes aegypti* Infected with Chikungunya and Dengue 2 Viruses. *PLoS One* 5, e13149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013149>
- Terradas, G., Joubert, D.A., McGraw, E.A., 2017. The RNAi pathway plays a small part in Wolbachia-mediated blocking of dengue virus in mosquito cells. *Sci. Rep.* 7, 43847. <https://doi.org/10.1038/srep43847>
- Thammapalo, S., Chongsuvivatwong, V., Geater, A., Dueravee, M., 2008. Environmental factors and incidence of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in an urban area, Southern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 136, 135–43. <https://doi.org/10.1017/S0950268807008126>
- Theiler, M., 1930. Susceptibility of white mice to the virus yellow fever. *Science* (80-). 71, 367. <https://doi.org/10.1126/science.71.1840.367>
- Theiler, M., Smith, H.H., 1937. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. *J. Exp. Med.* 65, 767–86. <https://doi.org/10.1084/JEM.65.6.767>
- Theiler, M., Smith, H.H., 1937. the Use of Yellow Fever Virus Modified By in Vitro Cultivation for Human Immunization. *J. Exp. Med.* 65, 787–800. <https://doi.org/10.1084/jem.65.6.787>
- Tsukada, M., Ohsumi, Y., 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E)
- Van Den Berg, H., 2009. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ. Health Perspect.* <https://doi.org/10.1289/ehp.0900785>
- van den Hurk, A.F., Hall-Mendelin, S., Pyke, A.T., Frentiu, F.D., McElroy, K., Day, A., Higgs, S., O’Neill, S.L., 2012. Impact of Wolbachia on Infection with Chikungunya and Yellow Fever Viruses in the Mosquito Vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1892. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001892>
- Varjak, M., Maringer, K., Watson, M., Sreenu, V.B., Fredericks, A.C., Pondeville, E., Donald, C.L., Sterk, J., Kean, J., Vazeille, M., Failloux, A.-B., Kohl, A., Schnettler, E., 2017. *Aedes aegypti* Piwi4 Is a Noncanonical PIWI Protein Involved in Antiviral Responses. *mSphere* 2, e00144-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00144-17>
- Vasilakis, N., Cardoso, J., Hanley, K.A., Holmes, E.C., Weaver, S.C., 2011. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 532–541. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2595>
- Vasilakis, N., Weaver, S.C., 2017. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr. Opin. Virol.* 22, 30–35. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2016.11.007>
- Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B., Lourenço-de-Oliveira, R., 2014. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J. Virol.* 88, 6294–306. <https://doi.org/10.1128/JVI.00370-14>
- Vodovar, N., Bronkhorst, A.W., van Cleef, K.W.R., Miesen, P., Blanc, H., van Rij, R.P., Saleh, M.-C., 2012.

- Arbovirus-Derived piRNAs Exhibit a Ping-Pong Signature in Mosquito Cells. *PLoS One* 7, e30861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030861>
- Volkman, L.E., 1997. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect hosts. *Adv. Virus Res.* 48, 313–48.
- Waldock, J., Olson, K.E., Christophides, G.K., 2012. *Anopheles gambiae* Antiviral Immune Response to Systemic O'nyong-nyong Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1565. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001565>
- Walker, T., Johnson, P.H., Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F.D., McMeniman, C.J., Leong, Y.S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A.L., Ritchie, S.A., O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476, 450–3. <https://doi.org/10.1038/nature10355>
- Wang, E., Ryman, K.D., Jennings, A.D., Wood, D.J., Taffs, F., Minor, P.D., Sanders, P.G., Barrett, A.D.T.T., 1995. Comparison of the genomes of the wild-type French viscerotropic strain of yellow fever virus with its vaccine derivative French neurotropic vaccine. *J. Gen. Virol.* 76, 2749–2755. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-11-2749>
- Wasserman, S., Tambyah, P.A., Lim, P.L., 2016. Yellow fever cases in Asia: primed for an epidemic. *Int. J. Infect. Dis.* 48, 98–103. <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2016.04.025>
- Watts, D.M., Burke, D.S., Harrison, B.A., Whitmire, R.E., Nisalak, A., 1987. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 143–52.
- Weaver, S.C., Reisen, W.K., 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Weaver, S.C., Scott, T.W., Lorenz, L.H., Lerdthusnee, K., Romoser, W.S., 1988. Togavirus-associated pathologic changes in the midgut of a natural mosquito vector. *J. Virol.* 62, 2083–90.
- Weger-Lucarelli, J., Rückert, C., Grubaugh, N.D., Misencik, M.J., Armstrong, P.M., Stenglein, M.D., Ebel, G.D., Brackney, D.E., 2018. Adventitious viruses persistently infect three commonly used mosquito cell lines. *Virology* 521, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.06.007>
- Wen, D., Li, S., Dong, F., Zhang, Y., Lin, Y., Wang, J., Zou, Z., Zheng, A., 2018. N-glycosylation of Viral E Protein Is the Determinant for Vector Midgut Invasion by Flaviviruses. *MBio* 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00046-18>
- Wengler, G., Wengler, G., Gross, H.J., 1978. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology* 89, 423–37.
- Werren, J.H., Baldo, L., Clark, M.E., 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 741–751. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- Whitman, L., 1939. Failure of *Aedes Aegypti* to Transmit Yellow Fever Cultured Virus (17D) 1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* s1-19, 19–26. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1939.s1-19.19>
- WHO, 2018a. WHO | Global vector control response 2017–2030 [WWW Document]. WHO. URL <https://www.who.int/vector-control/publications/global-control-response/en/> (accessed 11.25.18).
- WHO, 2018b. Dengue vaccine: WHO position paper – September 2018 [WWW Document]. WHO. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-2-15.Voir>
- WHO, 2018c. WHO. Yellow Fever. [WWW Document]. URL <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever> (accessed 11.15.18).
- WHO, 2018d. WHO | Eliminating Yellow Fever Epidemics (EYE) Strategy: Meeting demand for yellow fever vaccines [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/meeting-demand-for-vaccines/en/> (accessed

11.18.18).

- WHO, 2017. WHO | Yellow fever – Nigeria [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/csr/don/22-december-2017-yellow-fever-nigeria/en/> (accessed 11.18.18).
- WHO, 2016a. Synthèse, par le Directeur général de l’OMS, des conclusions du Comité d’urgence sur le virus Zika [WWW Document]. URL <http://www.who.int/fr/news-room/detail/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barré-syndrome> (accessed 11.23.18).
- WHO, 2016b. WHO | Yellow Fever – Democratic Republic of the Congo, 11 April 2016 [WWW Document]. WHO. URL <https://www.who.int/csr/don/02-june-2016-yellow-fever-drc/en/> (accessed 11.18.18).
- WHO, 2014a. WHO | Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY) [WWW Document]. WHO. URL http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/ (accessed 11.25.18).
- WHO, 2014b. WHO | Yellow fever vaccination booster not needed [WWW Document]. WHO. URL https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/yellow_fever_20130517/en/ (accessed 11.18.18).
- WHO, 2013a. WHO | Yellow Fever [WWW Document]. WHO. URL <https://www.who.int/csr/don/14-june-2016-yellow-fever-angola/en/> (accessed 11.18.18).
- WHO, 2013b. WHO | Yellow Fever [WWW Document]. WHO. URL <https://www.who.int/csr/don/02-may-2016-yellow-fever-uganda/en/> (accessed 11.18.18).
- WHO, 2011a. WHO | The use of DDT in malaria vector control. WHO position statement. WHO.
- WHO, 2011b. WHO | UN prequalified vaccines - Yellow Fever. WHO.
- Wickham, H., 2009. ggplot2, Media. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>
- Wieczorek, S., Combes, F., Lazar, C., Giai Gianetto, Q., Gatto, L., Dorffer, A., Hesse, A.-M., Couté, Y., Ferro, M., Bruley, C., Burger, T., 2017. DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* 33, 135–136. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw580>
- Wilder-Smith, A., Gubler, D.J., 2008. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. *Med. Clin. North Am.* 92, 1377–1390. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2008.07.002>
- Wilder-Smith, A., Gubler, D.J., Weaver, S.C., Monath, T.P., Heymann, D.L., Scott, T.W., 2017. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30518-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30518-7)
- Winnebeck, E.C., Millar, C.D., Warman, G.R., 2010. Why does insect RNA look degraded? *J. Insect Sci.* 10, 159. <https://doi.org/10.1673/031.010.14119>
- Wyss, J.H., 2006. Screwworm Eradication in the Americas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 186–193. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05289.x>
- Xi, Z., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 4, e1000098. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000098>
- Xin, Q.-L., Deng, C.-L., Chen, X., Wang, J., Wang, S.-B., Wang, W., Deng, F., Zhang, B., Xiao, G., Zhang, L.-K., 2017. Quantitative Proteomic Analysis of Mosquito C6/36 Cells Reveals Host Proteins Involved in Zika Virus Infection. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00554-17>
- Yeap, H.L., Axford, J.K., Popovici, J., Endersby, N.M., Iturbe-Ormaetxe, I., Ritchie, S.A., Hoffmann, A.A., 2014. Assessing quality of life-shortening *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes in the field based on capture rates and morphometric assessments. *Parasit. Vectors* 7, 58. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-58>
- Zambon, R.A., Nandakumar, M., Vakharia, V.N., Wu, L.P., 2005. The Toll pathway is important for an

- antiviral response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7257–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409181102>
- Zanotto, P.M., Gould, E.A., Gao, G.F., Harvey, P.H., Holmes, E.C., 1996. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 548–53. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.2.548>
- Zhang, G., Asad, S., Khromykh, A.A., Asgari, S., 2017. Cell fusing agent virus and dengue virus mutually interact in *Aedes aegypti* cell lines. *Sci. Rep.* 7, 6935. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07279-5>
- Zhang, L., Gallo, R.L., 2016. Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* 26, R14–R19. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.11.017>
- Zhang, S.-M., Adema, C.M., Kepler, T.B., Loker, E.S., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I., Schmucker, D., 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* 305, 251–4. <https://doi.org/10.1126/science.1088069>
- Zheng, G.X.Y., Terry, J.M., Belgrader, P., Ryvkin, P., Bent, Z.W., Wilson, R., Ziraldo, S.B., Wheeler, T.D., McDermott, G.P., Zhu, J., Gregory, M.T., Shuga, J., Montesclaros, L., Underwood, J.G., Masquelier, D.A., Nishimura, S.Y., Schnall-Levin, M., Wyatt, P.W., Hindson, C.M., Bharadwaj, R., Wong, A., Ness, K.D., Beppu, L.W., Deeg, H.J., McFarland, C., Loeb, K.R., Valente, W.J., Ericson, N.G., Stevens, E.A., Radich, J.P., Mikkelsen, T.S., Hindson, B.J., Bielas, J.H., 2017. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells. *Nat. Commun.* 8, 14049. <https://doi.org/10.1038/ncomms14049>
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K.A., Shi, P.-Y., Li, H., 2007. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J. Virol.* 81, 3891–903. <https://doi.org/10.1128/JVI.02704-06>
- Zhu, Y., Zhang, R., Zhang, B., Zhao, T., Wang, P., Liang, G., Cheng, G., 2017. Blood meal acquisition enhances arbovirus replication in mosquitoes through activation of the GABAergic system. *Nat. Commun.* 8, 1262. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01244-6>